



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**BEATRIZ LEITE NOGUEIRA**

**PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE UMA PROTEASE CISTEÍNICA DE *CALOTROPIS***  
***PROCERA* (APOCYNACEAE) E AVALIAÇÃO DA SUA FUNCIONALIDADE**

**FORTALEZA**

**2025**

BEATRIZ LEITE NOGUEIRA

PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE UMA PROTEASE CISTEÍNICA DE *CALOTROPIS*  
*PROCERA* (APOCYNACEAE) E AVALIAÇÃO DA SUA FUNCIONALIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica e Biologia molecular

Orientador: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- N71p Nogueira, Beatriz Leite.  
Produção heteróloga de uma protease cisteínica de *Calotropis procera* (Apocynaceae) e avaliação da sua funcionalidade. / Beatriz Leite Nogueira. – 2025.  
91 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2025.  
Orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.
1. CpCP3. 2. expressão heteróloga. 3. modelagem tridimensional. I. Título.

CDD 572

---

BEATRIZ LEITE NOGUEIRA

PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE UMA PROTEASE CISTEÍNICA DE *CALOTROPIS*  
*PROCERA* (APOCYNACEAE) E AVALIAÇÃO DA SUA FUNCIONALIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica e Biologia molecular

Aprovada em: 27/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Ednésio da Cruz Freire  
Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Ceará (IFCE)

A Deus.

Aos meus pais, Regireuda e Fábio.

A minha querida avó, Maria de Fátima.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e Nossa Senhora de Fátima, por nunca me deixarem desistir, sempre me acolhendo em momentos difíceis.

À minha família, por todo amor e empenho dedicado. Nada disso faria sentido e nem seria possível se não fosse por vocês. Em especial, minha mãe e avó, por cada oração, cuidado e compreensão. Sempre será para e por vocês.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela excelente orientação, paciência e carinho. Aos longos desses dois anos, pude perceber o quanto a atenção e cuidado fazem diferença para um aluno. Por me ensinar que quando se faz o que gosta, as horas são apenas detalhes. Todos os seus ensinamentos me ajudaram a ser uma profissional e ser humano melhor, muito obrigada.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro e ao Prof. Dr. José Ednésio da Cruz Freire pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À minha melhor amiga, Catarine, pela ajuda e apoio em todos os momentos, por segurar a minha mão em cada subida e principalmente em todos os recomeços. Obrigada pelo companheirismo, amizade, lealdade, sinceridade e ser a irmã que sempre desejei um dia. Você faz parte da minha família e da melhor versão que sempre serei.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular. Obrigada pela ajuda em todo o percurso acadêmico, nos experimentos e desesperos compartilhados. A cada reunião das 15 h para o lanche, foram momentos que esquecíamos os problemas.

Ao técnico e amigo Edvar. Obrigada por toda ajuda nesses anos, pela paciência e disposição. Obrigada pelos conselhos e visão de mundo que sempre me faziam enxergar fora da bolha.

<sup>1</sup>O senhor é meu pastor; de nada terei falta.

<sup>2</sup>Em verdes pastagens me faz repousar e me conduz a águas tranquilas; restaura-me o vigor.

<sup>3</sup>Guia-me nas veredas da justiça por amor do seu nome.

<sup>4</sup>Mesmo quando eu andar por um vale de trevas e morte, não temerei perigo algum, pois tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me protegem.

<sup>5</sup>Preparas um banquete para mim à vista dos meus inimigos. Tu me honras, ungindo a minha cabeça com óleo e fazendo transbordar o meu cálice.

<sup>6</sup>Sei que a bondade e a fidelidade me acompanharão todos os dias da minha vida, e voltarei à casa do Senhor enquanto eu viver.

**- Salmo 23:1-6**

## RESUMO

As proteases cisteínicas (EC 3.4.22.-) possuem um mecanismo catalítico que envolve o grupo tiol de um resíduo de cisteína com caráter nucleofílico, integrando uma díade catalítica (Cys/His). Dentro desse grupo, diversas enzimas foram identificadas, como aquelas presentes no látex de *Calotropis procera*. A protease CpCP3, do látex de *C. procera*, ainda não havia sido obtida de forma heteróloga em sua forma ativa. O objetivo deste trabalho foi expressar em *Escherichia coli* a peptidase cisteínica CpCP3 e demonstrar a sua funcionalidade. Para tal, a sequência da peptidase foi expressa fusionada a diferentes tags de solubilidade, tiorredoxina A (TrxA), glutatona S-transferase (GST) e a proteína de terminação/antiterminação de transcrição (NusA). Ao serem produzidas em *E. coli* BL21(DE3), as proteínas de fusão apresentaram massas moleculares iguais a 42,9 kDa (TrxA-CpCP3), 57,7 kDa (GST-CpCP3) e 85,9 kDa (NusA-CpCP3), quando analisadas por SDS-PAGE. Induções piloto revelaram que as proteínas de fusão, após lise das células em tampão padrão (Tris-HCl 50mM; NaCl 0,5M; EDTA 2mM; Glicerol 10% em pH 8,0) se acumulavam como corpos de inclusão insolúveis. Para tentar solubilizar as proteínas recombinantes, a incorporação do detergente CTAB no tampão de lise, em concentrações variando de 6% a 10%, não resultou em incremento na solubilidade. A solubilização dos pellets com soluções de ureia (2 M a 8 M, a pH8,0), também não foram eficientes. No entanto, ao incorporar ureia 8 M a pH 12,5 no tampão de lise, a análise por SDS-PAGE evidenciou a solubilização de uma fração considerável das proteínas de fusão. Apesar das diversas abordagens metodológicas empregadas, a purificação da proteína não foi alcançada, mesmo utilizando cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) com níquel e cobalto, cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose) e cromatografia de exclusão molecular. Os ensaios de atividade enzimática com os extratos proteicos demonstraram resultados positivos. A proteína fusionada a tag TrxA exibiu atividade mínima, evidenciada pela degradação *in vitro* de BSA. Em contraste, a proteína fusionada à tag NusA apresentou uma atividade significativamente maior, sendo capaz de degradar gelatina no zimograma e degradação *in vitro* de BSA. Na modelagem tridimensional, a estrutura nativa da proteína apresentou uma ótima conformação, exibindo alta similaridade com proteases cisteínicas já cristalizadas (proceraína, proceraína B e papaína). No docking molecular, observou-se que o sítio catalítico da protease interage significativamente com os ligantes, sendo inibida por E-64 e efetiva na quebra do substrato BANA.

**Palavras-chave:** CpCP3; expressão heteróloga; modelagem tridimensional.



## ABSTRACT

Cysteine proteases (EC 3.4.22.–) have a catalytic mechanism that involves the thiol group of a cysteine residue with a nucleophilic character, forming a catalytic dyad (Cys/His). Within this group, several enzymes have been identified, such as those present in the latex of *Calotropis procera*. The CpCP3 protease from *C. procera* latex had not yet been heterologously obtained in its active form. This study aimed to express the cysteine peptidase CpCP3 in *Escherichia coli* and demonstrate its functionality. To this end, the peptidase sequence was expressed fused to different solubility tags: thioredoxin A (TrxA), glutathione S-transferase (GST), and the transcription termination/antitermination protein (NusA). When produced in *E. coli* BL21(DE3), the fusion proteins exhibited molecular masses of 42.9 kDa (TrxA-CpCP3), 57.7 kDa (GST-CpCP3), and 85.9 kDa (NusA-CpCP3), as analyzed by SDS-PAGE. Pilot inductions revealed that the fusion proteins, after cell lysis in standard buffer (50 mM Tris-HCl; 0.5 M NaCl; 2 mM EDTA; 10% glycerol at pH 8.0), accumulated as insoluble inclusion bodies. Attempts to solubilize the recombinant proteins by incorporating the CTAB detergent into the lysis buffer at concentrations ranging from 6% to 10% did not improve solubility. Similarly, solubilizing the pellets with urea solutions (2 M to 8 M, at pH 8.0) was ineffective. However, when 8 M urea at pH 12.5 was incorporated into the lysis buffer, SDS-PAGE analysis showed significant solubilization of the fusion proteins. Despite the various methodological approaches employed, protein purification was not achieved, even using immobilized metal affinity chromatography (IMAC) with nickel and cobalt, ion exchange chromatography (DEAE-Sepharose), and size-exclusion chromatography. Enzyme activity assays with protein extracts showed positive results. The protein fused to the TrxA tag exhibited minimal activity, evidenced by the in vitro degradation of BSA. In contrast, the protein fused to the NusA tag showed significantly higher activity, being able to degrade gelatin in a zymogram and degrade BSA in vitro. In the three-dimensional modeling, the native structure of the protein exhibited an optimal conformation, showing high similarity to crystallized cysteine proteases (procerain, procerain B, and papain). In molecular docking, the catalytic site of the protease was observed to interact significantly with the ligands, being inhibited by E-64 and effectively cleaving the BANA substrate.

**Keywords:** CpCP3; heterologous expression.; three-dimensional modeling.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação da ação de exo e endopeptidases em cadeias polipeptídicas.....	19
Figura 2	– Mecanismo catalítico de proteases cisteínicas.....	21
Figura 3	– Substrato sintético N $\alpha$ -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida cloridrato (BANA).....	23
Figura 4	– Mecanismo de inibição do sítio ativo da papaína por E-64.....	24
Figura 5	– Estrutura química do Dithiothreitol (DTT).....	25
Figura 6	– <i>Calotropis procera</i> (Ainton).....	25
Figura 7	– Arquiteturas de domínios dos genes de proteases cisteínicas de <i>C. procera</i> .....	35
Figura 8	– Expressão de TrxA_CpCP3.....	47
Figura 9	– Expressão de GST_CpCP3.....	48
Figura 10	– Expressão de NusA_CpCP3.....	48
Figura 11	– Indução das diferentes proteínas recombinantes (TrxA_CpCP3, GST_CpCP3, NusA_CpCP3 e <i>E. coli</i> não transformada) .....	49
Figura 12	– Expressão de TrxA_CpCP3 utilizando tampão de lise contendo CTAB (6% - 10%) .....	51
Figura 13	– Solubilização de pellets de TrxA_CpCP3 com solução de ureia de 2 M a 8 M.....	52
Figura 14	– Frações solúveis dos extratos proteicos de TrxA_CpCP3 contendo soluções de ureia 2 M, 4 M, 6 M e 8 M.....	53
Figura 15	– Expressão das proteínas TrxA_CpCP3 e NusA_CpCP3 na fração solúvel contendo ureia 8 M no tampão de lise .....	54
Figura 16	– Expressão das proteínas recombinantes em diferentes temperaturas na fase de indução .....	56
Figura 17	– Remoção gradual de ureia 8 M da fração solúvel da proteína recombinante NusA_CpCP3.....	57
Figura 18	– Cromatografia de afinidade a íons metálicos (IMAC) utilizando resinas de níquel (Ni <sup>2+</sup> ) e cobalto (Co <sup>2+</sup> ) imobilizado.....	58
Figura 19	– Cromatografia DEAE – Sepharose.....	60

Figura 20	– Cromatografia de exclusão molecular.....	61
Figura 21	– Cromatograma da purificação de NusA_CpCP3 de exclusão molecular.....	62
Figura 22	– Gel de eletroforese do zimograma com a proteína recombinante NusA_CpCP3.....	64
Figura 23	– Digestão <i>in vitro</i> de BSA pelas diferentes proteínas recombinantes.....	66
Figura 24	– Predição do peptídeo sinal na sequência de SnuCalCp03 (CpCP3) ....	69
Figura 25	– Estrutura tridimensional de CpCP3.....	71
Figura 26	– Disposições dos ligantes BANA e E-64.....	72
Figura 27	– Interações proteína-ligante geradas pelo LigPlot+ entre BANA- CpCP3.....	75
Figura 28	– Interações proteína-ligante geradas pelo LigPlot+ entre E-64 e CpCP3.....	76
Figura 29	– Sobreposição de CpCP3 com as estruturas cristalizadas da papaína, proceraina e proceraina B.....	78
Figura 30	– Estrutura tridimensional das proteínas recombinantes.....	80

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– O gráfico mostra o percentual de degradação de BANA em relação à papáina.....	68
-----------	---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades biológicas descritas contra diferentes modelos e alvos utilizando o látex de <i>Calotropis procera</i> .....	27
Tabela 2 – Propriedades bioquímicas de proteínas purificadas de <i>Calotropis procera</i> .	30
Tabela 3 – Potencial biotecnológico de proteases cisteínicas purificadas de <i>Calotropis procera</i> .....	32
Tabela 4 – Propriedades bioquímicas das proteínas de fusão.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BANA	N $\alpha$ -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida cloridrato
BSA	Albumina sérica bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> ).
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio.
CDD	Conserved Domain Database
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DTT	Dithiothreitol
E-64	leucilamino-4-guanidinobutano
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	Ácido clorídrico
IAA	Ácido Iodoacético
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
(Mw)	Massa molecular
mM	Milimolar
mg/mL	Miligramas por mililitro
mg/kg	Miligramas por quilograma
NaCl	Cloreto de sódio
NEM	N-ethylmaleimide
PCMB	p-chloro Mercuri Benzoate
RMSD	Root Mean Square Deviation
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STT	Tetrationato de sódio

## LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
°C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1	Enzimas proteolíticas .....	19
2.2	<i>Calotropis procera</i> (Aiton).....	25
2.3	Proteínas purificadas e alguns genes descritos de <i>Calotropis procera</i> .....	28
2.4	CpCP3 ( <i>Calotropis procera</i> cysteine protease 3) .....	35
3	PERGUNTAS DE PARTIDA .....	37
4	OBJETIVOS.....	37
4.1	Objetivo geral.....	37
4.2	Objetivos específicos .....	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
5.1	Seleção de células hospedeiras e obtenção de plasmídeos heterólogos.....	38
5.2	Preparação de células quimicamente competentes de <i>Escherichia coli</i> por tratamento com cloreto de cálcio.....	38
5.3	Transformação de células quimicamente competentes de <i>Escherichia coli</i> usando o método do choque térmico.....	39
5.4	Indução e expressão de proteína recombinante em células de <i>Escherichia coli</i> transformadas.....	40
5.5	Lise de células transformadas .....	40
5.6	Eliminação da ureia e mudança de pH.....	40
5.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) .....	40
5.8	Protocolo 1 - Cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC)...	41
5.8.1	Níquel ( $Ni^{+2}$ ) .....	41
5.8.2	Cobalto ( $Co^{+2}$ ) .....	41
5.9	Protocolo 2 – Combinação de cromatografias por troca iônica e Exclusão molecular .....	41
5.9.1	Cromatografia de troca iônica em DEAE.....	41
5.9.2	Cromatografia de Exclusão Molecular.....	42
5.10	Detecção de Proteases por Zimograma.....	43
5.11	Atividade proteolítica <i>in vitro</i> .....	43



5.11.1	<i>Ensaio para Proteases Cisteínicas utilizando BANA.....</i>	43
5.11.2	<i>Ensaio de degradação in vitro utilizando BSA.....</i>	43
5.12	<b>Análise de sequência e predição das características moleculares da proteína.....</b>	45
5.13	<b>Modelagem.....</b>	45
5.14	<b>Análise da estrutura.....</b>	45
5.14.1	<i>Docking molecular.....</i>	45
5.14.2	<i>Análise das interações proteína-ligante.....</i>	46
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	47
6.1	<b>Transformação e indução piloto da expressão da proteína recombinante</b>	47
6.2	<b>Expressão da proteína recombinante em sua forma solúvel .....</b>	50
6.3	<b>Otimização dos protocolos de indução da expressão .....</b>	55
6.4	<b>Remoção de ureia e retorno ao pH 8,0.....</b>	56
6.5	<b>Protocolo 1 - Cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC)...</b>	58
6.6	<b>Protocolo 2 – Combinação de cromatografias por troca iônica e Exclusão molecular.....</b>	60
6.7	<b>Detecção de atividade proteolítica .....</b>	64
6.7.1	<i>Zimograma.....</i>	64
6.7.2	<i>Digestão in vitro de BSA.....</i>	65
6.7.3	<i>Ensaio colorimétrico com BANA.....</i>	67
6.8	<b>Propriedades bioquímicas e análises estruturais .....</b>	69
6.8.1	<i>CpCP3 (Calotropis procera cysteine protease 3).....</i>	69
6.8.1.1	<i>Análise da sequência.....</i>	69
6.8.1.2	<i>Modelagem da estrutura tridimensional.....</i>	70
6.8.1.3	<i>Docking molecular.....</i>	71
6.8.1.4	<i>Análise das Interações Proteína-Ligante pelo LigPlot<sup>+</sup>.....</i>	74
6.8.1.5	<i>Análise comparativa da estrutural tridimensional por sobreposição estrutural.....</i>	77
6.9.2	<i>CpCP3 recombinantes.....</i>	79
6.9.2.1	<i>Análise das sequências.....</i>	79
6.9.2.2	<i>Modelagem da estrutura tridimensional.....</i>	79
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	82
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	83

<b>ANEXO A – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO.....</b>	<b>91</b>
---	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

Proteases (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas; EC 3.4.-.-) representam uma classe de enzimas com a habilidade intrínseca de catalisar a hidrólise das ligações entre aminoácidos, denominadas ligações peptídicas. Estas enzimas são classificadas em exopeptidases (quando sua ação ocorre sobre aminoácidos localizados nas extremidades *N* ou *C*-terminal) ou endopeptidases (quando atuam no interior da molécula). Dentro da categorização das endopeptidase, ocorre uma divisão em subclasses, que apresentam como característica comum e distintiva a presença de um resíduo específico de aminoácido no seu sítio ativo. Algumas dessas divisões são: peptidases do tipo glutâmicas, peptidases serínicas, peptidases cisteínicas, peptidases asparagínica, peptidases aspárticas, peptidases de treonina e metalopeptidases (ARGÜELLO-GARCÍA; CARRERO; ORTEGA-PIERRES, 2023; DOMSALLA; MELZIG, 2008; LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008; TAVARES *et al.*, 2021).

As peptidases cisteínicas são enzimas proteolíticas que compartilham um mecanismo catalítico comum que envolve um grupo tiol de um resíduo de cisteína, com caráter nucleofílico, fazendo parte de uma díade catalítica (RAWAT *et al.*, 2021). De acordo com a classificação do banco de dados MEROPS, as proteases cisteínicas são agrupadas em 84 famílias, cada família constituindo um grupo de proteínas homólogas, e essas famílias são agrupadas em 14 clãs, cada clã reunindo duas ou mais famílias com origens evolutivas (RAWLINGS *et al.*, 2018a). A papaína, obtida do mamoeiro (*Carica papaya*), foi à primeira peptidase cisteínica isolada e caracterizada. Outra peptidase da mesma classe também foi isolada e caracterizada, agora do látex de *Calotropis procera*, denominada CpCP3, e mostrou-se promissora como substituinte da quimosina na fabricação de queijos, em condições de laboratório (SILVA *et al.*, 2020).

A *C. procera* é uma planta que pertence à família das Apocynaceae e é originária das regiões do Norte da África e Sudoeste da Ásia. No entanto, essa espécie se espalhou por diversos locais tropicais ao redor do mundo, incluindo o Nordeste do Brasil. Ela se destaca principalmente por sua notável capacidade de adaptação e desenvolvimento em ambientes com condições pouco favoráveis, como a falta de água e solos com salinidade e pH alcalino, sendo capaz de prosperar mesmo em tais ambientes adversos (HASSAN *et al.*, 2015; RABELO *et al.*, 2023). Além disso, o látex extraído dessa planta tem se revelado uma rica fonte de várias proteínas, incluindo osmotinas, quitinases e proteases, as quais tem sido amplamente estudadas

devido ao fato de apresentarem grande potencial para aplicações no campo da biotecnologia (FREITAS *et al.*, 2016a; KWON *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2011).

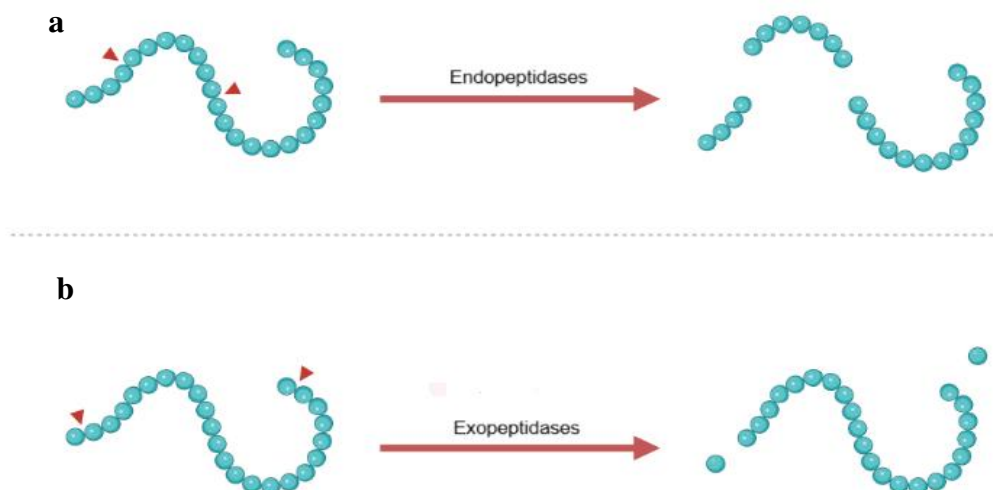
A purificação da protease CpCP3, proveniente do látex da *C. procera*, demanda a implementação de procedimentos meticulosos, compreendendo diversas fases, que vão desde a coleta inicial do látex até a obtenção de amostras integralmente purificadas utilizando técnicas e processos específicos, além da necessidade de condições ambientais adequadas para o crescimento da planta. Adicionalmente, a utilização de uma grande quantidade de material vegetal é necessária para que seja alcançado rendimento satisfatório nestas condições que demanda tempo e recursos ao longo do desenvolvimento do processo. Neste sentido, a implementação da produção heteróloga de CpCP3 em células de *Escherichia coli* emerge como uma estratégia alternativa e promissora para a obtenção rápida e em grandes quantidades de amostras de CpCP3 purificadas, proporcionando, assim, uma maior amplitude de análises experimentais. Vale ressaltar que o sistema de expressão em microrganismo aumenta as chances de facilitar o processo de purificação, estabilidade e resistência, mediante uma projeção da proteína recombinante (KWON *et al.*, 2015). A viabilidade dessa abordagem reside, dentre outros aspectos, na perspectiva de produção em larga escala, favorecendo a obtenção de maiores rendimentos e, por conseguinte, ampliando a capacidade de condução de ensaios subsequentes.

A protease CpCP3 ainda não foi obtida de forma heteróloga em sua forma ativa, tornando essencial o desenvolvimento de um protocolo eficiente para sua produção solúvel e funcional. A expressão heteróloga bem-sucedida permitirá estudos detalhados sobre suas propriedades bioquímicas, com ênfase na atividade proteolítica frente a diferentes substratos. Além disso, a investigação das interações enzima-substrato e enzima-inibidor será fundamental para elucidar seu mecanismo de ação, fornecendo subsídios para explorar seu potencial em diversas aplicações biotecnológicas e terapêuticas.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas, também denominadas proteases, proteinases ou peptidases (EC 3.4.-.-), constituem uma classe fundamental de biomoléculas amplamente distribuídas em organismos de todos os reinos da natureza. Essas enzimas são responsáveis pela catalisação da hidrólise das ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos, desempenhando papéis cruciais em uma vasta gama de processos biológicos, como a digestão de proteínas, a ativação de precursores proteicos e a regulação de diversas vias celulares. A maioria dessas proteases é produzida inicialmente como formas inativas, conhecidas como proenzimas ou zimogênios, que necessitam de uma ativação específica para exercer sua atividade catalítica. A classificação dessas enzimas pode ser baseada em três critérios, como a reação a qual catalisam; a natureza do seu sítio ativo; e as relações evolutivas a qual sua estrutura esteja relacionada. De acordo com a reação catalítica, são classificadas na subclasse 3.4: grupo 3 - hidrolases, visto que utilizam uma molécula de água para realizar a quebra da ligação, e subgrupo 4, pois realizam a quebra das ligações peptídicas entre os aminoácidos. Ainda dentro desta subclasse 3.4, essas enzimas podem ser classificadas em exopeptidases, que agem nas extremidades *N* ou *C*-terminal das ligações peptídicas externas, ou endopeptidases, que atuam no interior das ligações peptídicas da proteína, como demonstrado na figura 1 (DAVID TRONCOSO; ALBERTO SÁNCHEZ; LUJÁN FERREIRA, 2022).



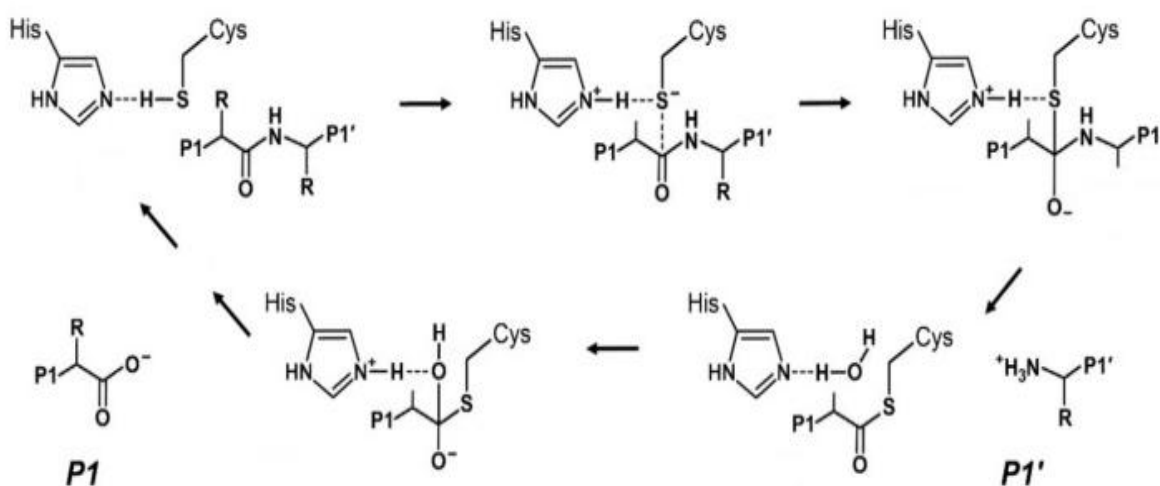
**Figura 1:** Representação da ação de exo e endopeptidases, enfatizando o local da clivagem na cadeia polipeptídica. a) endopeptidases e b) exopeptidases. Fonte: Elaborada pela autora utilizando o servidor BioRender Template (<https://app.biorender.com/biorender-templates/figures>).

De acordo com o banco de dados MEROPS, relacionadas a natureza do seu sítio ativo, elas podem ser agrupadas em oito principais famílias: Peptidases Aspárticas (A); Peptidases Cisteínicas (C); Peptidases Glutâmicas (G); Peptidases Metálicas (M); Peptidases Asparagínicas (N); Peptidases Mistas (P); Peptidases Serínicas (S); Peptidases de treonina (T); Peptidases de Tipo Catalítico Desconhecido (RAWLINGS *et al.*, 2018a). Baseadas em relações evolutivas de estrutura, proteínas com homologia de sequência de aminoácidos pertencem à mesma família, enquanto clãs incluem famílias com um ancestral comum. O banco de dados MEROPS contém 281 famílias e 64 clãs, com nomes baseados nas letras A, C, G, M, N, P, S, T e U, conforme o mecanismo catalítico. Famílias com mecanismos diferentes são identificadas pela letra "P". As peptidases cisteínicas atualmente estão agrupadas em 11 principais CLÃ (CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO, CP, CQ e CR) e 84 famílias (DAVID TRONCOSO; ALBERTO SÁNCHEZ; LUJÁN FERREIRA, 2022; RAWLINGS *et al.*, 2018a). Sendo a papaína (*Carica papaya*), a primeira peptidase cisteínica isolada e caracterizada, muitos estudos foram desenvolvidos no intuito de demonstrar propriedades bioquímicas e biológicas dessa classe de enzimas (RAWAT *et al.*, 2021).

As proteases cisteínicas da família da papaína são inicialmente produzidas como pré-proenzimas. Essas pré-proenzimas são compostas por um peptídeo sinal, um propeptídeo e um domínio catalítico. Cada componente da cadeia polipeptídica desenvolve um papel importante no processo de maturação da enzima. O peptídeo sinal é essencial para o direcionamento da proteína a locais de clivagem. O propeptídeo, além de auxiliar no dobramento adequado do domínio catalítico, também pode ser responsável por inibir a atividade da protease. E o domínio catalítico responsável por promover a atividade enzimática. A ativação dessa enzima geralmente ocorre em ambientes ácidos, onde o propeptídeo pode ser removido de forma autocatalítica ou por ação de outras proteases (PETUSHKOVA; SAVVATEEVA; ZAMYATNIN, 2022).

Além da denominação “peptidases cisteínicas”, essas enzimas também são conhecidas como ‘proteases de tiol’, pois utilizam um tiol nucleofílico de uma cisteína para realizar a quebra de uma ligação peptídica. Seu mecanismo catalítico é baseado naquele descrito para a papaína, envolvendo processos de acilação e desacilação, além de um intermediário acil relativamente estável (Evidenciado na Figura 2). O processo de catálise começa com a ativação do grupo sulfidríla da Cys (Cys<sup>25</sup> na papaína) pela His (His<sup>159</sup> na papaína), removendo um próton para tornar o enxofre nucleofílico. Após ativado, o enxofre começa com o ataque

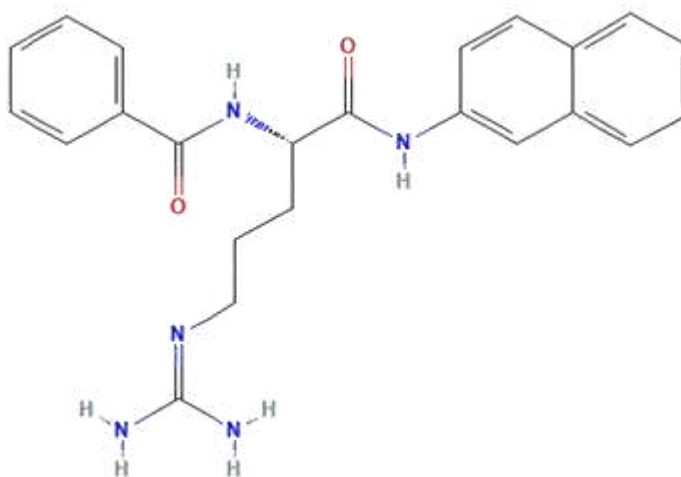
nucleofílico no carbono carbonílico do substrato, quebrando a ligação peptídica e formando um intermediário acil. A protonação da amida do substrato ocorre antes do ataque nucleofílico, o que facilita a formação do intermediário acil. Essa protonação é mediada por His<sup>159</sup>, um resíduo crucial para a reação, especialmente na etapa de desacilação. Durante essa fase, His<sup>159</sup> estabiliza o intermediário acil e facilita a liberação do produto da reação. A estabilização do intermediário acil é realizada por um "buraco oxianion", uma região do sítio ativo que contém interações específicas, como a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo NH da cadeia principal de Cys<sup>25</sup> e a carboxamida lateral de Gln<sup>19</sup>. Essa estrutura proporciona uma estabilização adicional ao intermediário instável durante a reação, justificada por alguns autores como a tríade catalítica Cys-His-Asn/Gln. A transição entre os estados de acilação e desacilação é crucial para a atividade enzimática, e a liberação do produto é facilitada pela ação de His<sup>159</sup>, que induz a desacilação do intermediário acil (ELSÄSSER; GOETTIG, 2021a).



**Figura 2:** Mecanismo catalítico de proteases cisteínicas (modelo da papaína), evidenciando a presença do sítio catalítico, substrato, ataque nucleofílico da Cys a ligação peptídica do substrato, formação do primeiro intermediário, clivagem de uma porção do substrato e regeneração da enzima com a liberação da segunda porção do substrato, sequencialmente. Fonte: (ELSÄSSER; GOETTIG, 2021a), adaptado pela autora.

As peptidases da subfamília C1 possuem um subsítio de especificidade dominante em S2, que prefere a ocupação por cadeias laterais hidrofóbicas volumosas em vez de carregadas. A papaína, é um exemplo dessa classe e apresenta uma preferência moderada por resíduos P1-Arg, com um padrão de especificidade para a sequência P2-P4' Leu/Val-Arg/Lys↓Gln-Gln-Xaa-Asp, semelhante à tripsina (ELSÄSSER; GOETTIG, 2021a; RAWLINGS *et al.*, 2018a).

Como exemplo, o substrato sintético N $\alpha$ -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida cloridrato (BANA) é utilizado para detectar a presença de proteases cisteínicas (FREITAS, 2006), visto que em sua composição há a presença de resíduos que essa classe de enzimas possui afinidade, como a Arg. Na figura 3 é evidenciado os grupos funcionais presentes no BANA. A hidrólise desse substrato ocorre por meio de um mecanismo clássico envolvendo as mesmas etapas principais no mecanismo catalítico referenciado para proteases cisteínicas: ligação do substrato ao sítio catalítico da enzima, ataque nucleofílico do resíduo de Cys, formação do intermediário acil-enzima e desacilação para regeneração da enzima. Nesse processo, inicialmente, o BANA se liga ao sítio ativo da protease por meio da interação entre seu grupo benzoilarginina. Em seguida, a cisteína catalítica da protease realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da ligação amida do BANA, promovendo a clivagem do substrato e a liberação de  $\beta$ -naftilamida, que pode ser detectada espectrofotometricamente. A parte remanescente do substrato forma um intermediário acil-enzima e a entrada de moléculas de água promove a hidrólise do intermediário, liberando o grupo benzoilarginina e regenerando a enzima para novos ciclos catalíticos (CHIRGWIN; PARSONS; NOLTMANN, 1975; WAKABAYASHI *et al.*, 1978).



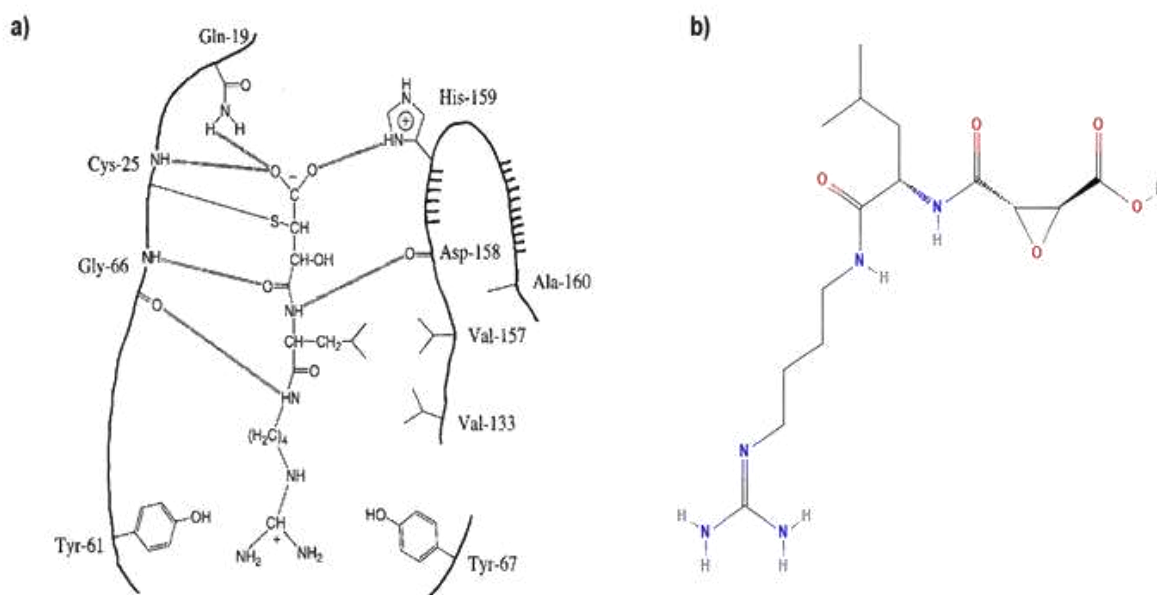
**Figura 3:** Substrato sintético N $\alpha$ -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida cloridrato (BANA), evidenciando sua composição estrutural. Fonte: The Pubchem Project (PubChem).

O mecanismo de regulação das proteases é altamente sofisticado e multifacetado, englobando diferentes níveis de controle. Em termos de ativação, essas enzimas frequentemente dependem de mudanças conformacionais induzidas por modificações pós-traducionais, como clivagens proteolíticas, que transformam as proenzimas em suas formas ativas. Além disso, o controle da atividade enzimática também é mediado por ativadores e inibidores, que podem se



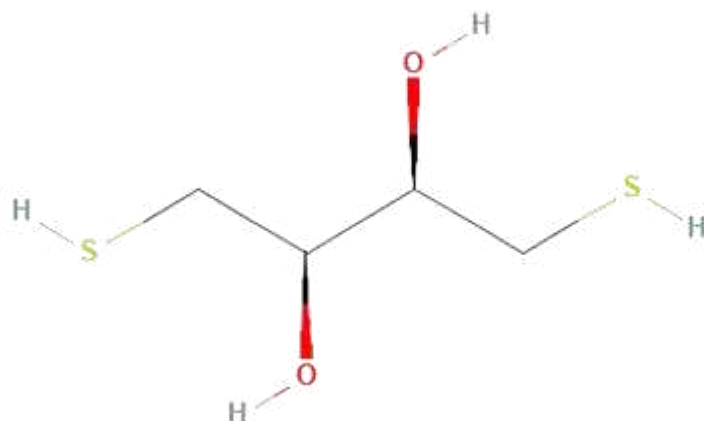
ligar ao sítio ativo das proteases, regulando sua função de acordo com as necessidades celulares (DAVID TRONCOSO; ALBERTO SÁNCHEZ; LUJÁN FERREIRA, 2022; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; STAEL; VAN BREUSEGEM, 2023). Em estudos anteriores, foram relatados diversos inibidores específicos para proteases cisteínicas, como o tetrionato de sódio (STT), ácido iodoacético (IAA), *trans*-Epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano (E-64), cloreto de mercúrio ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ), ácido p -cloromercuribenzoico (PCMB) e N-Etilmaleimida (NEM). Além disso, também foram descritos ativadores dessas enzimas, incluindo  $\beta$ -mercaptoetanol, Ditioneitol (DTT) e L-cisteína (FREITAS *et al.*, 2016a, 2020; KUMAR DUBEY; JAGANNADHAM, 2003; RAMOS *et al.*, 2013b; SINGH *et al.*, 2010).

Na figura 4 é evidenciado a interação do inibidor E-64 no sítio ativo da papaína. O E-64 é um inibidor competitivo irreversível de proteases cisteínicas, sendo composto por um ácido trans-epoxissuccínico ligado a um dipeptídeo modificado [(leucilamino)-4-guanidinobutano]. Seu mecanismo de ação envolve a formação de uma ligação covalente entre o grupo epóxido da sua estrutura e a cisteína catalítica ativa das proteases, por meio de um ataque nucleofílico do grupo -SH da cisteína ativa. Além disso, o E-64 estabiliza sua interação com as proteases por meio de pontes de hidrogênio e contatos eletrostáticos realizados dentro do sítio ativo com outros resíduos. Como exemplo, o grupo carboxila N-terminal do E-64 forma três ligações de hidrogênio com os resíduos Gln<sup>19</sup>, Cys<sup>25</sup> e His<sup>159</sup> (numeração de referência a papaína). Adicionalmente, o subsítio S2 da enzima é formado pelos resíduos Val<sup>133</sup>, Val<sup>157</sup> e Ala<sup>160</sup>, que fazem contato de Van der Waals com a cadeia lateral do resíduo de leucina (porção P2) do E-64 (MATSUMOTO *et al.*, 1999). Além da regulação por inibição, a regulação transcricional e pós-transcricional, também desempenham um papel importante na homeostase da reação proteolítica ((DAVID TRONCOSO; ALBERTO SÁNCHEZ; LUJÁN FERREIRA, 2022; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; STAEL; VAN BREUSEGEM, 2023).



**Figura 4:** Mecanismo de inibição do sítio ativo da papaína por E-64, evidenciado a estrutura química do E-64 e seu mecanismo de inibição no sítio catalítico da papaína. a) evidencia as interações que ocorrem dos resíduos do sítio catalítico com os átomos do E-64. O grupo tiol da Cys catalítica ataca o carbono C2 no anel epóxido do E-64, estabelecendo uma ligação covalente. b) estrutura química do inibidor E-64. Fonte: (MATSUMOTO *et al.*, 1999); The Pubchem Project (PubChem).

Na figura 5 é evidenciado a estrutura e composição química do DTT. O reagente é comumente utilizado como um agente redutor para manter proteínas em sua forma reduzida, prevenindo e/ou quebrando pontes dissulfeto indesejadas na cadeia polipeptídica da proteína ou entre outras cadeias. Essa reação é baseada na quebra de ligações dissulfeto e restauração da conformação ativa da proteína, onde o DTT realiza um ataque nucleofílico a ligação dissulfeto e desfaz a ligação. Esse reagente, quando utilizado com proteases, assegura que os resíduos de cisteína no sítio ativo estejam na forma tiol livre (-SH), essencial para a atividade catalítica da enzima (ALLIEGRO, 2000; LUKESH; PALTE; RAINES, 2012). No contexto das proteases cisteínicas, o DTT desempenha um papel crucial na manutenção da atividade enzimática, mantendo os resíduos de Cys livres para desempenhar seu papel catalítico.



**Figura 5:** Dithiothreitol (DTT), evidenciando sua estrutura química. Fonte: The Pubchem Project (PubChem).

## 2.2 *Calotropis procera* (Aiton)

A *Calotropis procera* (Aiton) é uma espécie vegetal nativa da África, pertencente à família Apocynaceae e à subfamília Asclepiadoideae, conhecidas como serralhas (Figura 6). Amplamente distribuída, essa planta perene adapta-se a ambientes áridos e semiáridos (xerófita), sendo encontrada no Norte da África, Oriente Médio, América Latina e Ásia. O nome do gênero *Calotropis* tem origem no grego e significa “bonito”, em referência à aparência de suas flores. Já o epíteto específico *procera* deriva do latim, aludindo à cera presente nas folhas e no caule da planta. Essa espécie recebe diferentes denominações regionais, como maçã-de-sodoma e calótropo. Além disso, é geneticamente próxima de *C. gigantea*, outra representante do mesmo gênero (KAUR *et al.*, 2021) .



**Figura 6:** *Calotropis procera* (Aiton). Espécimes fotografadas na Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici. Fonte: Elaborado pela autora.

Do ponto de vista morfológico, a *C. procera* apresenta características diversas, tais como caules que se assemelham a arbustos e atingindo alturas que variam de 2 a 6 metros. Suas raízes, por sua vez, desenvolvem-se em extensão, alcançando até 4 metros de profundidade. As folhas são simples, espessas e terminam em pontas agudas. Seus caules jovens são verde-acinzentados e pubescentes, enquanto os maduros têm casca fissurada. As folhas são grandes, suculentas, verde-claras e cobertas por cera cuticular (HASSAN *et al.*, 2015; KAUR *et al.*, 2021; RABELO *et al.*, 2023). Quando submetida a cortes ou lesões, a planta demonstra a capacidade de liberar um fluido leitoso e esbranquiçado, conhecido como látex. Este composto é amplamente reconhecido na literatura como uma substância potencialmente tóxica, constituída por diversos elementos nocivos, incluindo glicosídeos, fenóis, flavonoides, terpenóides e proteínas. É plausível inferir que essa complexa composição desempenhe variados papéis na defesa e preservação da planta (DHILEEPAN, 2014; WADHWANI *et al.*, 2021). Al Sulaibi *et al.*, também fornecem informações sobre o potencial dos extratos metanólicos provenientes das flores, destacando atividade esquistossomicida. Do látex, evidenciaram as propriedades anti-helmínticas (AL SULAIBI; THIEMANN; THIEMANN, 2020).

Estudos recentes evidenciaram também diversos potenciais terapêuticos e aplicações biotecnológicas associadas a espécie, seja por meio de extratos ou de moléculas isoladas provenientes do látex. Pesquisas experimentais destacaram várias atividades biológicas vinculadas às moléculas isoladas do látex, com ênfase nas peptidases. Essas enzimas demonstraram atividade de coagulação plasmática, potencial como substitutos da quimosina na fabricação de queijos, além de apresentarem utilidade como agentes detergentes e antifúngicos contra fungos alimentares e fitopatogênicos (FREITAS *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2013b; SILVA *et al.*, 2020). Na Tabela 1, estão detalhados os resultados de uma série de ensaios de atividades biológicas realizados com o látex de *C. procera*, evidenciando propriedades terapêuticas e funcionais dessa substância. Esses testes abrangem uma variedade de áreas, desde atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias até efeitos no tratamento de doenças, inflamações e processos de cicatrização. Além disso, os resultados provenientes desses ensaios reforçam a versatilidade do látex dessa planta, sugerindo que ele pode ser utilizado em diferentes contextos terapêuticos.

**Tabela 1** – Atividades biológicas descritas contra diferentes modelos e alvos utilizando o látex de *Calotropis procera*.

<b>Atividade</b>	<b>Faixa de dosagem</b>	<b>Modelo / Ensaio</b>	<b>Referências</b>
<b>Citotoxicidade</b>	0,02 – 25,0 µg /mL	<i>In vitro</i> , contra diferentes linhagens celulares de Câncer humano: HL-60 (promielocítica leucemia), HCT-8 (cólon), MDA-MB-435 (mama) e SF295 (cérebro).	(SOARES DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007)
<b>Inibição da eclosão de ovos e larvas em desenvolvimento</b>	10 – 1000 mg/mL	<i>In vitro</i> , usando <i>Aedes aegypti</i> (Linn).	(RAMOS <i>et al.</i> , 2006)
<b>Inibição do desenvolvimento larval</b>	0,1 – 2 mg/mL	<i>In vitro</i> , usando <i>Aedes aegypti</i> .	(RAMOS <i>et al.</i> , 2009)
<b>Atividade antibacteriana</b>	1 mg/mL	<i>In vitro</i> , contra Gram-positivo ( <i>Streptococcus piogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> ) e Gram-negativo bactérias ( <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) bem como <i>Candida albicans</i>	(SAHER <i>et al.</i> , 2023)
<b>Atividade antifúngica</b>	20,7 – 1,368 µg /mL	<i>In vitro</i> , contra <i>Coletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Neurospora sp</i> e <i>Aspergillus niger</i> .	(SOUZA <i>et al.</i> , 2011)
<b>Propriedade anti-inflamatória e antipirética</b>	5 e 25 mg/kg	<i>In vivo</i> , usando ratos Wistar.	(KUMAR <i>et al.</i> , 2017)

<b>Proteção de inflamação induzida</b>	30 e 60 mg /kg	<i>In vivo</i> , contra <i>Salmonella entérica</i> em homem adulto suíço e ratos Wistar.	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2012)
<b>Controle da inflamação</b>	10 mg /kg	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> , contra <i>Salmonella entérica</i> e rato suíço.	(TAVARES <i>et al.</i> , 2021)
<b>Coagulação de leite</b>	20 – 100 µg /200 µL	<i>In vitro</i> , usando leite desnatado.	(FREITAS <i>et al.</i> , 2016b)
<b>Amaciante de carne</b>	0% – 0,5% (p/p)	<i>In vitro</i> , usando carne de vaca, carne de porco e frango.	(RAWDKUEN; JAIMAKREU; BENJAKUL, 2013)
<b>Redução da alergenicidade de proteínas do leite de vaca.</b>	1 µg/µL	<i>In vivo</i> , usando camundongos machos e leite bovino.	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019)
<b>Atividade antifúngica e retardo do crescimento.</b>	100 µL e 0,1 – 0,3 g/kg	<i>In vitro</i> , usando farinha de trigo comercial e <i>Aspergillus Níger</i> , <i>A. chevalieri</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Pythium oligandrum</i> , <i>Penicillium sp</i> e <i>Lasiodiplodia</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	(FREITAS <i>et al.</i> , 2022)

Fonte: Elaborada pela autora.

### 2.3 Proteínas purificadas e alguns genes descritos de *Calotropis procera*

Ao longo das últimas décadas, diversos pesquisadores têm se dedicado ao estudo de *C. procera*, com o objetivo de identificar seus compostos bioativos, investigar possíveis atividades biológicas, bem como explorar aplicações biotecnológicas. Apesar de ser amplamente utilizada na medicina tradicional desde a antiguidade, os primeiros avanços significativos na purificação das proteínas presentes no látex de *C. procera* ocorreram apenas nos anos 2000. Esse período marcou o início de um entendimento mais aprofundado das

propriedades enzimáticas dessa planta, o que abriu caminho para a investigação de suas possíveis aplicações terapêuticas e industriais.

O primeiro estudo relevante foi conduzido por Kumar *et al.*, que conseguiram isolar do látex de *C. procera* uma protease citseínica, a qual foi nomeada de proceraina. Os pesquisadores avaliaram a atividade ótima da enzima em termos de sua capacidade de digerir azoalbumina, encontrando condições ideais de temperatura entre 55 – 60°C e pH variando de 7,0 a 9,0. Além disso, a enzima demonstrou atividade de hidrólise sobre proteínas como caseína e azocaseína. Esse estudo foi fundamental para estabelecer o potencial biológico das proteínas extraídas do látex e ampliou o conhecimento sobre suas possíveis utilidades em processos biotecnológicos (KUMAR DUBEY; JAGANNADHAM, 2003).

Em 2010, Singh *et al.*, isolaram uma outra proteína do látex, que apresentava características semelhantes à poceraina. Essa nova proteína foi denominada de proceraina B. Os pesquisadores caracterizaram a atividade ótima dessa enzima, que ocorreu em uma faixa de pH entre 6,5 e 8,5 e em temperaturas de 40 – 60°C. Além disso, proceraina B demonstrou uma atividade notável na hidrólise de manchas de sangue. Isso sugeriu uma possível utilização dessa enzima na indústria de detergentes, visto sua capacidade de degradar proteínas em substâncias como o sangue, uma aplicação importante para processos de limpeza (SINGH *et al.*, 2010).

Em 2013, Ramos *et al.*, realizaram um estudo aprofundado e purificaram três novas proteínas do látex, que foram denominadas *C. procera* cisteína protease 1, 2 e 3 (CPCP-1, CPCP-2 e CPCP3). No decorrer da pesquisa, os autores observaram que as condições ideais de pH e temperatura para essas enzimas eram semelhantes entre si, com faixas de pH ótimas e temperaturas ideais que variavam de 6,0 a 7,5 e 30 – 50°C. Mediante ensaios de ativação e inibição com substratos específicos, essas proteínas foram identificadas como proteases cisteínicas. Atividades importantes como fibrinólise e coagulante plasmático foram evidenciadas, indicando seu potencial para aplicações terapêuticas, especialmente em processos relacionados à coagulação sanguínea (RAMOS *et al.*, 2013b). Além disso, outros estudos apresentaram outras aplicações biotecnológicas, como a fabricação de queijo (FREITAS *et al.*, 2016b), depilação de couro (LOPÉZ *et al.*, 2017) e modulação da cicatrização de feridas (RAMOS *et al.*, 2016).

Na Tabela 2 é apresentado um resumo das propriedades bioquímicas das proteases cisteínicas purificadas da *C. procera*. Essas enzimas distinguem-se pelo ponto isoelétrico (pI),

pH ótimo de atividade, massa molecular, temperatura ótima e ampla faixa de estabilidade. Além disso, como mencionado em outras sessões desse trabalho, suas atividades catalíticas são significativamente moduladas por inibidores específicos, como E-64 e IAA, evidenciando o papel essencial do resíduo de cisteína no sítio ativo (NOGUEIRA; VIEIRA; GRANGEIRO, 2024).

**Tabela 2** – Propriedades bioquímicas de proteínas purificadas de *Calotropis procera*.

Proteína	Mr (kDa)	pI	pH ótimo (substrato)	Temperatura ótima (°C) (substrato)	Faixa de estabilidade		Inibidores
					pH	T (°C)	
<b>Proceraina</b>	28.79	9.3	7.0 - 9.0 (azoalbumina)	55 - 60 (azoalbumina)	3.0 - 12	até 70°C	E-64, IAA, PCMB, HgCl <sub>2</sub> , STT
<b>Proceraina B</b>	25.7	9.5	6.5 - 8.5 (azoalbumina; hemoglobina)	40 - 60 (azocaseína)	6.5 - 8.5	até 75°C	E-64, HgCl <sub>2</sub> , NEM, PCMB, IAA, leupeptin a, STT
<b>CpCP-1</b>	26.21	4.2	6.0 - 7.0 (azocaseína)	30 - 50 (azocaseína)	até 7.5	até 50°C	E-64, IAA, PMSF, EDTA, Pepstatina A
<b>CpCP-2</b>	26.13	4.1	6.0 - 7.0	30 - 50	até	até	E-64,



			(azocaseína)	(azocaseína)	7.5	50°C	IAA, PMSF, EDTA, Pepstatina A
<b>CpCP3</b>	25.08	9.2	6.0-7.5 (azocaseína)	30-50 (azocaseína)	até 7.5	até 50°C	E-64,  IAA,  PMSF, EDTA, Pepstatina A

Fonte: (NOGUEIRA *et al.*, 2024).

Na Tabela 3, são apresentadas as diversas atividades biotecnológicas das proteases cisteínicas purificadas da *C. procera*. Essas enzimas demonstram ação semelhante a detergente na hidrólise de manchas de sangue, além de alta eficiência na digestão de proteínas dietéticas. No contexto da coagulação do leite, observou-se inibição dessa atividade na presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , enquanto os íons  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  aumentaram significativamente a eficiência do processo. As proteases também exibem atividades de coagulação plasmática, fibrinolítica e fibrinogenolítica, tornando-se relevantes no tratamento de distúrbios trombóticos. Além disso, apresentaram atividade antifúngica e são eficazes na coagulação do leite para a produção de queijos, destacando seu potencial em aplicações industriais e biomédicas (NOGUEIRA; VIEIRA; GRANGEIRO, 2024).

**Tabela 3** – Potencial biotecnológico de proteases cisteínicas purificadas de *Calotropis procera*.

<b>Proteína</b>	<b>Atividade</b>	<b>Substrato /Alvo</b>	<b>Condições dos ensaios</b>	<b>Referências</b>
Proceraina B	Detergente	Manchas de sangue	Algodão manchado com sangue, incubado com 1% de detergente contendo 0,1 mg/mL de proceraina B purificada.	(SINGH <i>et al.</i> , 2010)
Proceraina B	Digestão de proteínas dietéticas.	Albumina	Pedaços de ovos cozidos incubados contendo proceraina B, tampão Tris-HCl 50 mM pH7,5 e $\beta$ - mercaptoetanol	(SINGH <i>et al.</i> , 2011)
Proceraina B	Coagulação na presença de íons metálicos	Leite desnatado	Leite desnatado 10% (p/v) em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH7,5 contendo 0,01 M de $\text{CaCl}_2$ , variando concentrações de íon ( $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ ), 50 $\mu\text{l}$ (2 mg/mL) de proceraina B.	(SINGH <i>et al.</i> , 2011)
CpCP1 CpCP2 CpCP3	Coagulação plasmática	Plasma humano	Proteases em diferentes concentrações incubadas com amostras de plasma humano em Tris- HCl, pH 7,5 contendo 3 mM DTT.	(RAMOS <i>et al.</i> , 2013b)
CpCP1	Fibrinolítica	Fibrinogênio	Peptidases purificadas,	

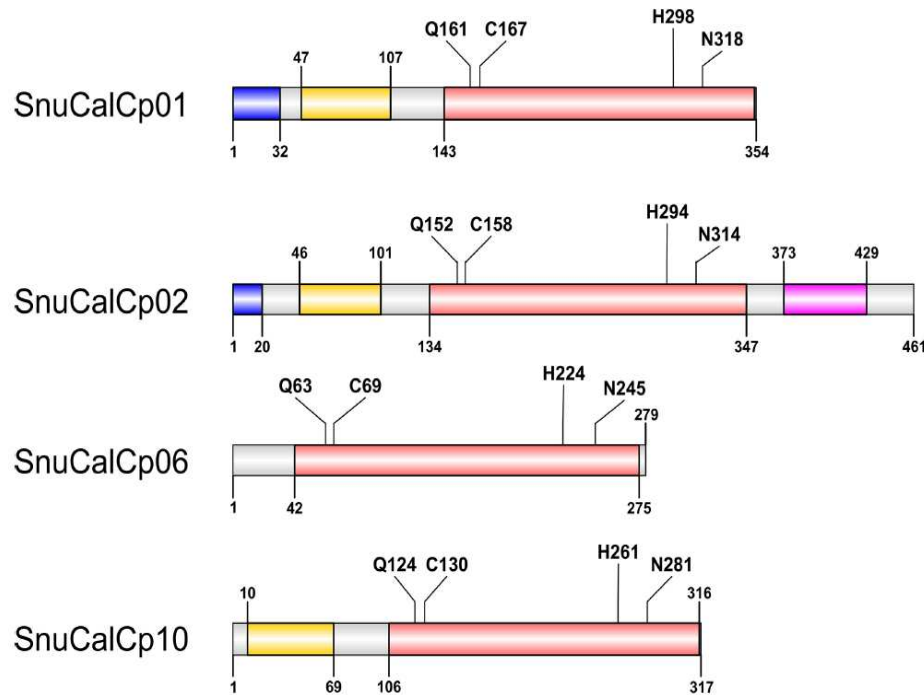
CpCP2 CpCP3			incubadas com fibrinogênio contendo tampão Tris-HCl e 3 mM DTT em diferentes intervalos de tempo (0 – 30 minutos) a 37°C.	
CpCP1 CpCP2 CpCP3	Fibrinogenolítica	Fibrinogênio	Aplicação das proteases purificadas em poços de gel de fibrinogênio-agarose preparado e solidificado sobre placas de vidro, incubadas por 24 horas.	
CpCP1 CpCP2 CpCP3	Antifúngico	<i>Fusarium oxisporum</i> e <i>Coletotrichum acutatum</i>	Peptidases dissolvidas em 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,0, contendo 1 mM de L-cisteína) e misturado com suspensões de esporo ( $2 \times 10^5$ esporos / mL).	(FREITAS <i>et al.</i> , 2020)
CpCP3	Coagulação de queijo	Leite desnatado	Diferentes quantidades de CpCP3 dissolvidas em tampão Tris- HCl 50 mM contendo 1 mM de L-cisteína (pH 6,5), incubadas com leite desnatado contendo 50 mM de CaCl <sub>2</sub> a 37°C.	(SILVA <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: (NOGUEIRA *et al.*, 2024), adaptado.

Em novos estudos, Know *et al.*, estudaram o perfil de proteases cisteínicas da *C. procera* utilizando a análise do transcriptoma *de novo*. O objetivo do estudo foi identificar as

sequências completas de mRNA de proteases cisteínicas por RNA-Seq e determinar seus níveis de expressão. Foram obtidas um total de 20 sequências genéticas distintas que codificam para proteases cisteínicas, sendo estas moléculas nomeadas consecutivamente de SnuCalCp01 a SnuCalCp20. No trabalho foi visto que a CpCP3 foi 99% idêntica a sequência de SnuCalCp03, com um peso molecular equivalente e um maior nível de expressão. Decorrente disso, a SnuCalCp03 foi expressa, purificada e redobrada, mas não foi possível obtê-la em sua forma ativa. Esse achado foi justificado devido à ausência de condições adequadas para seu dobramento (KWON *et al.*, 2015). As proteínas codificadas apresentaram diferentes comprimentos e quatro tipos de arquitetura de domínio, todos contendo o domínio de cisteína endopeptidase da família da papaína (Peptidase\_C1). SnuCalCp01 foi altamente semelhante a proceraina (90,3%) e proceraina B (96,8%), enquanto SnuCalCp16 apresentou maior identidade com CpCP1 (88%) e CpCP2 (98%). Esses resultados indicam que o genoma de *C. procera* apresenta pelo menos 27 genes que codificam CPs semelhantes a papaína, o que está de acordo com estudos prévios que demonstram a existência de grandes famílias de genes codificando CPs em plantas (KWON *et al.*, 2015; NOGUEIRA; VIEIRA; GRANGEIRO, 2024).

Na figura 7 é apresentado a arquitetura de domínios dos genes descritos por Know *et al.*, (KWON *et al.*, 2015). As sequências de aminoácidos das pré-pró-proteínas foram previamente identificadas, e os peptídeos sinais foram previstos utilizando o programa SignalP. A pesquisa no *Conserved Domain Database* (CDD), por meio do serviço CD-Search, permitiu a identificação de domínios conservados e sítios funcionais. Os diagramas dos domínios foram elaborados com o auxílio do software IBS (NOGUEIRA; VIEIRA; GRANGEIRO, 2024). É visto que de fato todos os genes possuem a região do propeptídeo identificado pelo inibidor I29 e o domínio catalítico C1 das proteases. Foi identificado um domínio denominado Granulina, pertencente à família de peptídeos ricos em cisteína. Esse domínio é frequentemente encontrado no terminal C de proteases cisteínicas da família de peptidases C1, sendo comumente observado em plantas (NAKAKURA *et al.*, 1992).



**Figura 7:** Arquiteturas de domínios dos genes de proteases cisteínicas de *C. procera*. Na figura é evidenciada a arquitetura de domínio proteicos de alguns genes descritos por KWON *et al.*, 2015. Nesses domínios são mostrados a região do peptídeo sinal (cor roxa), inibidor (cor amarela), C1 (cor bege) e Granulina (cor rosa). Fonte: (NOGUEIRA; VIEIRA; GRANGEIRO, 2024).

Em um estudo mais recente Freitas *et al.*, realizaram a identificação e a caracterização de cinco genes de cisteína peptidase (CpCP A, CpCP B, CpCP C, CpCP D e CpCP E) em *C. procera*. Esses genes, que ainda não haviam sido descritos anteriormente, foram não apenas identificados, mas também parcialmente caracterizados, revelando informações importantes sobre suas propriedades. Além disso, os pesquisadores realizaram a purificação de três proteínas (CpCP1, CpCP2 e CpCP3) e investigaram suas atividades antifúngicas. As massas moleculares dos produtos gênicos variaram entre 21 e 24,8 kDa, o que forneceu dados relevantes sobre sua estrutura. No contexto das atividades antifúngicas relacionadas as proteínas purificadas, os resultados experimentais destacaram a ação eficaz de CpCP1, CpCP2 e CpCP3, que demonstraram serem ativas contra dois fitopatógenos de importância agrícola: *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum* (FREITAS *et al.*, 2020).

## 2.4 CpCP3 (*Calotropis procera* cysteine protease 3)

A CpCP3 foi purificada inicialmente por Ramos *et al.*, a partir da fração proteica do látex de *C. procera* (*Apocynaceae*). Essa proteína está inserida na classificação de peptidases cisteínicas e incluída na família C1 (família da papaína) (RAMOS *et al.*, 2013b). Seu

mecanismo catalítico envolve processos de acilação e desacilação com um resíduo de Cys em seu sítio ativo, semelhante os descritos para papaína. Investigações minuciosas conduzidas por pesquisadores têm fornecido achados valiosos sobre a estrutura da CpCP3. Sua composição em termos de estrutura secundária, a qual foi revelada por meio de análises avançadas de dicróismo circular e espectroscopia de fluorescência, indicam que a organização secundária da enzima é distribuída entre diferentes elementos, tais como hélice- $\alpha$  (constituindo 15,1%), volta- $\beta$  (representando 21,3%), folha- $\beta$  (abrangendo 30,2%) e estruturas de ordem aleatória (contribuindo com 33,4%) (FREITAS *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2013a, 2013b). Conforme mencionado anteriormente, estudos com a CpCP3 purificada do látex demonstraram sua atividade anticoagulante e fibrinogenolítica (RAMOS *et al.*, 2013a), seu potencial como coagulante na produção de queijo (FREITAS *et al.*, 2020) e coagulante (OLIVEIRA *et al.*, 2023).

A purificação da proteína CpCP3, embora realizada por metodologias relativamente simples, apresenta um rendimento de aproximadamente 20,4% a partir do látex de *C. procera* (RAMOS *et al.*, 2013a). Além disso, até o momento, a obtenção da CpCP3 recombinante biologicamente ativa ainda não foi alcançada, o que abre espaço para novos estudos voltados à superação dessa limitação e à exploração do potencial biotecnológico da enzima. Com o desenvolvimento de novas abordagens e metodologias, espera-se que a CpCP3 possa ser purificada em quantidades satisfatórias, possibilitando sua aplicação em estudos bioquímicos e biológicos, com potencial para o controle de fitopatógenos, infecções bacterianas e desenvolvimento de novas terapias.

### 3 PERGUNTAS DE PARTIDA

- i) A protease cisteínica CpCP3 de *Calotropis procera* pode ser produzida em níveis satisfatórios em células de *Escherichia coli* e obtida de forma solúvel?
- ii) A proteína recombinante é capaz de apresentar atividade proteolítica?

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo geral

Expressar uma protease cisteínica de *Calotropis procera* (CpCP3) de forma heteróloga em *Escherichia coli* e verificar a funcionalidade da proteína recombinante.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Obter células de *E. coli* BL21(DE3) carregando um plasmídeo de expressão contendo um fragmento de DNA codificando CpCP3.
- Determinar as melhores condições (tempo de indução, temperatura durante o processo de indução) para a produção de CpCP3 recombinante.
- Purificar CpCP3 recombinante.
- Avaliar a funcionalidade da CpCP3 recombinante.
- Produzir e publicar em revistas científicas indexadas, artigos científicos relacionados ao trabalho.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### **Etapas 1 – Expressão da proteína recombinante em três construções distintas**

#### **5.1 Seleção de células hospedeiras e obtenção de plasmídeos heterólogos**

De acordo com as sequências gênicas disponibilizadas no trabalho de Kwon *et al.*, o gene SnuCalCp03 corresponde a protease CpCP3 (KWON *et al.*, 2015). Dessa forma, a protease CpCP3 foi produzida de forma heteróloga em células de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas com plasmídeos de expressão carregando a sequência codificadora da enzima, utilizando como base a sequência gênica de SnuCalCp03. O plasmídeo contendo a sequência codificadora foi adquirido da empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A partir dos vetores pET-32a(+); pET-41a(+) e pET-43.1a(+) contendo sequência codificadora, a proteína CpCP3 foi produzida fusionadas aos tags tiorredoxina (TrxA), glutathione S-transferase (GST) e a proteína de terminação/antiterminação de transcrição NusA, respectivamente. Além dos tags, que permitiu melhor solubilidade, a proteína recombinante foi fusionada a uma cauda de histidina na tentativa de facilitar sua purificação (HARA *et al.*, 2021).

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético de *Calotropis procera* (Apocynaceae), com finalidade de Pesquisa Científica, foi cadastrada no SisGen (Cadastro nº A582302), em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

#### **5.2 Preparação de células quimicamente competentes de *Escherichia coli* por tratamento com cloreto de cálcio**

Seguindo o protocolo descrito por Sambrook *et al.*, os vetores de expressão contendo a sequência de interesse foram inseridos em células de *E. coli* BL21(DE3). As células de *E. coli* BL21(DE3) foram cultivadas em placas contendo LB ágar em estufa a 37°C por 16 horas. Após o crescimento em placa, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de LB caldo e incubada a 37°C sob agitação de 180 rpm por uma noite. No dia seguinte, foi transferido 1 mL da cultura overnight para um frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB caldo e incubado a 37°C sob agitação vigorosa de 180 rpm, até atingir uma densidade óptica de 0,4 a 0,6 em uma leitura espectrofotométrica de 600 nm. Após atingir a densidade de células apropriada, a cultura foi centrifugada (*Eppendorf Centrifuge* 5810 R) a 3000 x g por 10 minutos a 4°C. Em sequência, as células foram ressuspensas em 20 mL (1/5 do volume da cultura) de CaCl<sub>2</sub> 50 mM gelado e incubadas em gelo por 30 minutos. Posteriormente, as células foram



centrifugadas nas mesmas condições anteriores e ressuspensas novamente em 2 mL (1/10 do volume da suspensão de células) de  $\text{CaCl}_2$  50 mM gelado (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### **5.3 Transformação de células quimicamente competentes de *Escherichia coli* usando o método do choque térmico**

Seguindo o protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 200  $\mu\text{L}$  da suspensão de células preparadas quimicamente na etapa anterior (5.2) foram adicionados a microtubos estéril combinado a 10  $\mu\text{L}$  da solução de plasmídeo recombinante. A mistura foi primeiramente incubada em gelo por 30 minutos, posteriormente em banho-maria a 42°C por 3 minutos, e em seguida, incubadas novamente em gelo por 2 minutos. Após o processo de choque térmico, foram adicionados 800  $\mu\text{L}$  de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) a cada microtubo e incubados em banho-maria a 37°C por 90 minutos. Em seguida, foram plaqueados 200  $\mu\text{L}$  de cada transformação em placas de LB ágar contendo o antibiótico apropriado para cada construção (Ampicilina para pET-32a(+) e pET-43.1a(+); Kanamicina para pET-41a(+)) a uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 12 horas e, em seguida, estoques em glicerol foram preparados e armazenados em ultrafreezer a - 80°C (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### **5.4 Indução e expressão de proteína recombinante em células de *Escherichia coli* transformadas**

A indução da expressão da proteína recombinante seguiu o protocolo descrito por Sambrook *et al.*, com adaptações para as condições a serem testadas da proteína estudada. Os estoques em glicerol contendo células de *E. coli* BL21(DE3), transformadas com o plasmídeo recombinante, conforme item 5.5, foram utilizados para semeadura em placas contendo meio LB ágar com antibiótico em uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  e posteriormente incubadas a 37°C por 16 horas. Em seguida, uma colônia isolada de cada placa foi inoculada em 5 mL de meio LB caldo novamente contendo antibiótico apropriado para cada construção e incubadas a 37°C com agitação orbital de 180 rpm por uma noite. No dia seguinte, foi transferido 1 mL da cultura *overnight* para um frasco Erlenmeyer contendo 250 mL de meio LB caldo contendo antibiótico, seguido de uma incubação a 37°C sob agitação vigorosa de 180 rpm, até atingir uma densidade óptica de 1.0. O crescimento foi monitorado por meio de leituras espectrofotométricas a 600 nm. Após atingir a densidade de células apropriada, IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo) a 0,4 mM foi adicionado ao meio e incubado por um período de

1 hora a 30°C sob agitação orbital vigorosa de 180 rpm. Após 1 hora de indução, as células foram coletadas por centrifugação a 6.000 x g por 20 minutos a 4°C, descartando o sobrenadante e o precipitado resultante submetido ao processo de lise (SAMBROOK *et al*, 1989).

### **5.5 Lise de células transformadas**

A lise das células por sonicação seguiu o protocolo segundo Nascimento (2014), com modificações. Os precipitados resultantes da etapa anterior (5.4) foram transferidos para falcons de 15 mL para garantir um bom acesso da sonda ao material. Os precipitados foram pesados e em sequência adicionado tampão de lise contendo PBS 50 mM; NaCl 0,5 M; EDTA 2 mM; Ureia 8 M; Glicerol 10% em pH 12,5, onde para cada 1 grama de precipitado foram adicionados 10 mL de tampão. As células foram mantidas em gelo e a sonicação para a lise celular foi conduzida em pulsos de 135 W por 15 segundos e intervalos de 30 segundos no sonicador Branson Digital Sonifier 450 na proporção de 1 ciclo a cada 2 mL de amostra. Ao final, as células sonicadas foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante (extrato proteico) submetido as etapas posteriores (ABDEL-MONAIM; ABO-ELYOUSR; MORSY, 2011; NASCIMENTO, 2014).

### **5.6 Eliminação da ureia e mudança de pH**

O extrato proteico obtido na etapa anterior (5.5) foi submetido a diálises exaustivas em duas etapas, primeiro para remover a ureia e posteriormente para redução do pH. Na primeira etapa, a ureia foi removida dialisando contra tampão PBS 50 mM, pH 12,5 contendo concentrações decrescentes de ureia (6 M, 4 M, 2 M e ausência de ureia). Na segunda etapa, a diálise ocorreu contra tampão PBS 50 mM em valores decrescentes de pH (11; 9,5; 8,0) e por último com água destilada.

### **5.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Laemmli, adaptado para géis montados entre placas de vidro. Após serem misturadas com tampão apropriado, as amostras foram aquecidas a 100°C por 10 min. A corrida eletroforética foi conduzida sob uma tensão inicial de 80 V por 30 min e posteriormente a 120 V em uma corrente de 40 mA. As bandas proteicas foram visualizadas com Comassie Coloidal com CBB250 (LAEMMLI, 1970).

## **Etapa 2 – Tentativas de purificação de CpCP3 recombinante**

### **5.8 Protocolo 1 - Cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC)**

#### **5.8.1 Níquel ( $\text{Ni}^{+2}$ )**

O extrato solúvel contendo as proteínas totais foi submetido a cromatografia em matriz de Ni *Sepharose*<sup>TM</sup> 6 *Fast Flow* contendo níquel imobilizado, equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), contendo 0,5 M de NaCl e 10 mM imidazol. Proteínas que não se ligaram a matriz foram eluídas com tampão de equilíbrio em um fluxo de 1mL por minuto, sendo coletadas frações de 4 mL por tubo, até que a absorbância a 280 nm do material eluído atingisse valor próximo ou inferior a 0,050. Após isso, o material retido na coluna foi eluído com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contendo 0,5 M de NaCl e concentrações crescentes de imidazol (10 mM, 40 mM, 150 mM, 250 mM e 500 mM).

#### **5.8.2 Cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ )**

O extrato solúvel, contendo as proteínas totais, foi aplicado a uma coluna de *Chelating Sepharose Fast Flow* carregada com cobalto, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), acrescido de 0,5 M de NaCl e 10 mM de imidazol. As proteínas não ligadas à matriz foram removidas com o mesmo tampão de equilíbrio, sob um fluxo de 1 mL/min, e coletadas em frações de 4 mL por tubo, até que a absorbância da leitura a 280 nm se aproximasse ou ficasse abaixo de 0,050. Em seguida, as proteínas retidas na coluna foram eluídas utilizando tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), 0,5 M de NaCl e concentrações crescentes de imidazol (40 mM, 150 mM, 250 mM e 500 mM).

### **5.9 Protocolo 2 – Combinação de cromatografias por troca iônica e Exclusão molecular**

#### **5.9.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE**

O extrato solúvel contendo as proteínas totais foi submetido a uma cromatografia de troca iônica utilizando a matriz de DEAE-Sepharose (HiTrap<sup>TM</sup> 5mL DEAE FF) equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Em cada corrida foi injetado no sistema 25 mL de amostra, o fluxo foi ajustado para 2 mL/min e as frações foram coletadas em um volume de 2 mL por tubo. As proteínas retidas na coluna foram, então, eluídas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 em um gradiente de 0-500 mM de NaCl. Posteriormente, as frações coletadas foram dialisadas contra água destilada para remoção do sal utilizado durante o processo de lavagem da coluna e

sequencialmente concentradas por liofilização e solubilizadas com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 a uma concentração de 2 mg/mL.

### **5.9.2 Cromatografia de Exclusão Molecular**

O material liofilizado foi solubilizado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 a uma concentração de 10 mg/mL de proteína e submetido a uma cromatografia de exclusão molecular (*HiPrep*<sup>TM</sup> 16/60 *Sephacryl*<sup>TM</sup> S-300 HR) equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 contendo NaCl 150 mM. Em cada corrida foi injetado um volume de 5 mL de amostra, o fluxo foi ajustado para 2 mL/min e as frações coletadas em um volume de 2 mL tubo. A lavagem da coluna foi realizada com o mesmo tampão de equilíbrio. Após a purificação, os tubos correspondentes aos picos obtidos foram analisados separadamente por eletroforese em gel.

### **Etapa 3 – Atividade proteolítica dos extratos proteicos com substratos**

#### **5.10 Detecção de Proteases por Zimograma**

Uma metodologia para detecção de atividade proteolítica foi realizada por ‘Zimograma’, conforme descrito por Freitas *et al.*, com adaptações para as condições da proteína investigada neste estudo. Os extratos proteicos foram misturados em tampão de amostra Tris-HCl 200 mM (pH 6,8) contendo SDS 8%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,4%, sendo separadas em géis de poliacrilamida (12,5%) contendo 0,1% de gelatina por eletroforese em gel. Após a eletroforese, os géis foram incubados em Triton X-100 2,5% por 30 min a 25°C, sob agitação constante. Posteriormente, os géis foram incubados em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contendo DTT 3 mM por 16 horas a 37°C. Após este período, os géis foram corados com solução de *coomassie brilliant blue* G-250 – CBB (80%) e, posteriormente, descorados com lavagens sucessivas em água destilada. Como controle positivo foi utilizada a papaína a 0,1 mg/mL e a atividade enzimática foi detectada como bandas transparentes nos géis (FREITAS, 2006).

#### **5.11 Atividade proteolítica *in vitro***

##### **5.11.1 Ensaio para Proteases Cisteínicas utilizando BANA**

Os ensaios específicos para proteases cisteínicas foram realizados conforme descrito por Freitas *et al.*, utilizando N $\alpha$ -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida cloridrato (BANA) como substrato. A reação foi produzida em triplicata, consistindo em 260  $\mu$ L do extrato proteico pré incubado em banho maria por 30 min a 37°C com 40  $\mu$ L de uma solução contendo DTT 3 mM e EDTA 2 mM, 200  $\mu$ L de BANA 1 mM, totalizando um volume de reação de 500  $\mu$ L. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 500  $\mu$ L de HCl 2%, em etanol, e 500  $\mu$ L de DMCA 0,06%, em etanol. Foi cronometrado um tempo de 40 min para o desenvolvimento de cor e em seguida foi medida absorbância de cada amostra a 540 nm. Como controle positivo, foi utilizada a papaína a 0,1 mg/mL e como controle negativo o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de proteína capaz de aumentar a absorbância em 0,01 em 30 min de reação (FREITAS, 2006).

### 5.11.2 Ensaio de degradação *in vitro* utilizando BSA

O ensaio foi realizado conforme Singh *et al.*, com adaptações. Os testes foram conduzidos utilizando vários valores de pH (6,0; 7,0; 8,0) e DTT em uma concentração de 3 mM (SINGH *et al.*, 2010). A solução de BSA foi preparada na concentração de 5 mg/ml em água destilada e posteriormente submetida a 95°C por 15 min para realizar a desnaturação. Como controle positivo, foi utilizado a enzima papaína na concentração de 0,1 mg/mL em água destilada. A reação de degradação foi conduzida misturando-se 150 µL de extrato proteico pré incubado em banho maria por 1 hora a 37°C com DTT 3 mM, 50µL de BSA e tampão com os respectivos valores de pH no volume de 1/10 do volume do extrato proteico. Para interromper a reação enzimática, adicionou-se tampão de amostra 4x concentrado para SDS-PAGE. Por fim, as amostras obtidas foram analisadas por SDS-PAGE para verificar a extensão da degradação da BSA.

## Etapa 4 – Análise *in silico*

### 5.12 Análise de sequência e predição das características moleculares da proteína

Foram utilizadas as ferramentas do ProtParam disponíveis no ExPASy (<https://www.expasy.org/>) para estimar algumas informações: massa molecular (Mw) e ponto isoelétrico (pI). Para visualização da presença do peptídeo sinal foi utilizado a plataforma SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>). Para visualização dos domínios presentes na proteína, foi utilizado o Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

### 5.13 Modelagem

A estrutura tridimensional da proteína fusionada as tags e em sua forma nativa foi produzida utilizando o servidor Alphafold 3 (<https://alphafoldserver.com/>), a partir das sequências disponíveis. Posteriormente, cada estrutura gerada foi analisada e validada usando os servidores QMEAN (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>) e MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/index.php>). Os modelos finais e edições subsequentes foram visualizados e editados usando PyMOL (<https://www.pymol.org/>). Para verificar a modelagem realizada pelo servidor, papaína, proceraina e proceraina B disponível no Protein Data Bank (PDB) foi utilizada para comparação.

### 5.14 Análise da estrutura

#### 5.14.1 Docking molecular

Os experimentos de docking molecular foram conduzidos utilizando o programa AutoDock Vina (EBERHARDT *et al.*, 2021), um software que emprega algoritmos para prever interações entre proteínas e ligantes. O docking foi realizado considerando as conformações mais favoráveis dos ligantes no sítio ativo da proteína (docking sítio dirigido). A estrutura da proteína foi mantida rígida e os resíduos catalíticos (Cys<sup>150</sup> e His<sup>280</sup>) e ligantes foram tratados como flexíveis, visto que já se sabe os resíduos envolvidos nas interações proteína-ligante com base na classificação enzimática da proteína, permitindo assim a exploração de diversas conformações possíveis. Os ligantes utilizados foram o E-64 como inibidor e BANA como substrato sintético. Para realizar os encaixes, a estrutura do E-64 foi obtida do PDB. A do BANA, como não estava disponível no PDB, foi obtida do PubChem - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (*The Pubchem Project*).

O centro da caixa de docking foi estabelecido nas coordenadas ( $x = 9.438$ ,  $y = -8.782$ ,  $z = -7.789$ ), garantindo que a região de interação fosse devidamente explorada. As dimensões da caixa foram ajustadas para  $16 \times 18 \times 16 \text{ \AA}$  ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ), permitindo uma cobertura adequada do sítio ativo e possíveis conformações do ligante. O número de modos de ligação gerados foi definido como 10, assegurando que diferentes poses do ligante fossem avaliadas. Além disso, a exaustividade do docking foi configurada com um valor de 32, garantindo uma busca mais detalhada e abrangente no espaço conformacional, aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos.

Os parâmetros do espaço de busca foram definidos com base na identificação do sítio catalítico da proteína, levando em conta informações estruturais disponíveis na literatura. Para a preparação das moléculas, os ligantes foram convertidos para o formato adequado utilizando o software AutoDock Vina, e as cargas parciais foram ajustadas para pH 7,0 no PDB2PQR (JURRUS *et al.*, 2018), garantindo compatibilidade com o protocolo de docking. Para validar a acurácia dos experimentos de docking, foi realizado um processo de redocking, utilizando a estrutura da proceraina (PDB: 8JCQ), no qual o ligante cristalizado E-64 foi reposicionado no sítio ativo da proteína utilizando o mesmo protocolo de docking adotado para os demais ligantes. Esse procedimento permite comparar a posição prevista pelo software com a posição real do ligante na estrutura cristalográfica, servindo como um controle interno para a confiabilidade do docking. A precisão do redocking foi avaliada por meio do cálculo do *Root Mean Square Deviation* (RMSD) entre a conformação experimental e a conformação prevista pelo AutoDock Vina. O RMSD também foi estabelecido como parâmetro no docking.

#### **5.14.2 Análise das interações proteína-ligante**

Para complementar a análise das interações proteína-ligante, foi utilizado o software LigPlot<sup>+</sup> (LASKOWSKI *et al.*, 2011) para gerar representações bidimensionais das interações moleculares, destacando os resíduos de aminoácidos que participam dos processos e as ligações intermoleculares entre os ligantes e resíduos da proteína.

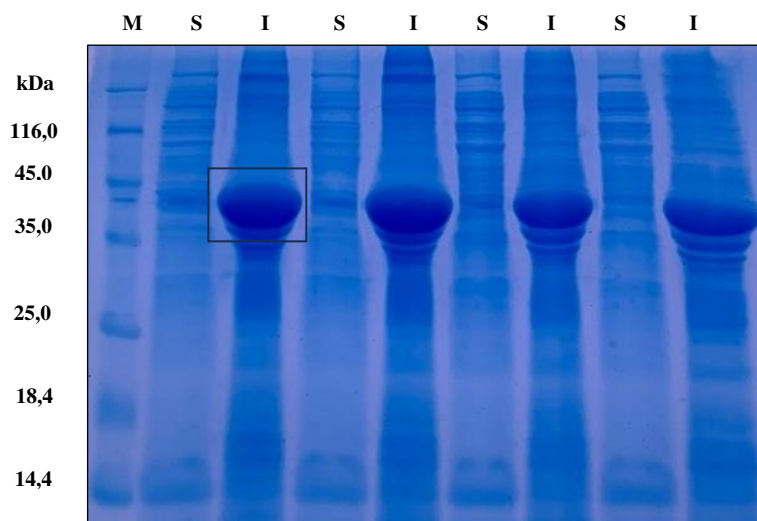


## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

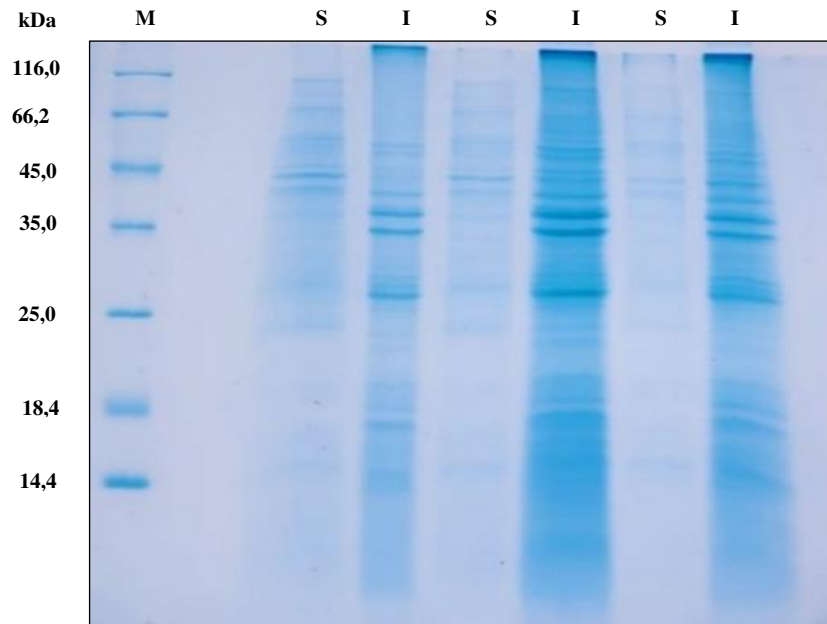
### Etapa 1 – Expressão da proteína recombinante

#### 6.1 Transformação e indução piloto da expressão da proteína recombinante

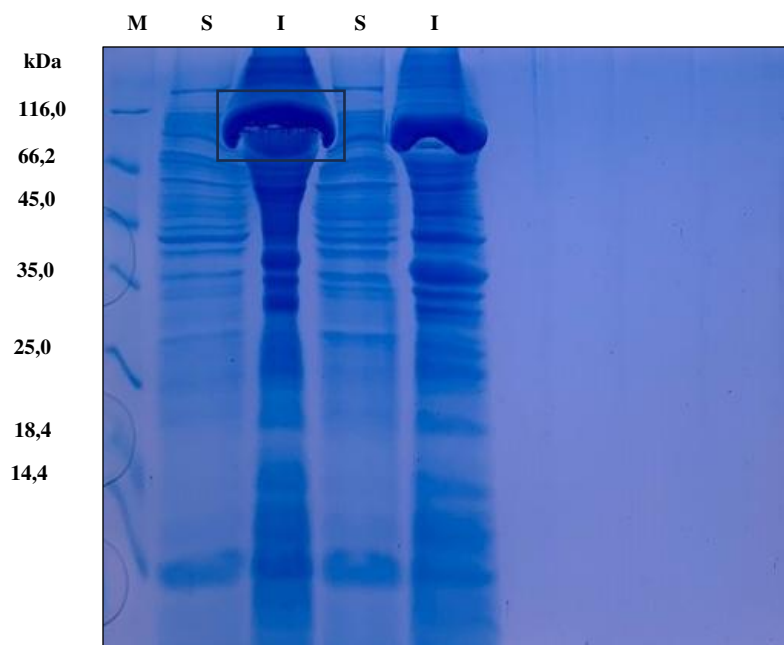
Os plasmídeos recombinantes pET32(a)-CpCP3, pET41(a)-CpCP3 e pET43.1(a)-CpCP3 foram introduzidos em células de *Escherichia coli* BL21(DE3) com sucesso, utilizando o método de choque térmico. A proteína codificada em cada uma das construções foi denominada TrxA\_CpCP3, GST\_CpCP3 e NusA\_CpCP3, respectivamente, de acordo com o plasmídeo utilizado. A indução piloto da expressão das proteínas recombinantes fora realizada por 3 horas, a 37°C e utilizando IPTG a uma concentração final de 0,4 mM. Após esse período, as células foram coletadas, lisadas com tampão de lise padrão (Tris-HCl 50 mM; NaCl 0,5 M; EDTA 2 mM; Glicerol 10% em pH 8,0) e analisadas. No entanto, ao realizar a análise das amostras por SDS-PAGE, observou-se que as proteínas recombinantes TrxA\_CpCP3 e NusA\_CpCP3 estavam predominantemente localizadas na fração insolúvel do extrato total, formando corpos de inclusão. Esse resultado é visualizado nas Figuras 8 e 10 que mostram claramente a presença de bandas correspondentes às proteínas expressas na fração insolúvel. A expressão da GST\_CpCP3 não foi detectada nas colônias induzidas (Figura 9). Para fins de controle, um extrato de células de *E. coli* BL21(DE3) não transformadas foi submetido aos mesmos procedimentos, garantindo a validação da expressão das proteínas de fusão (Figura 11).



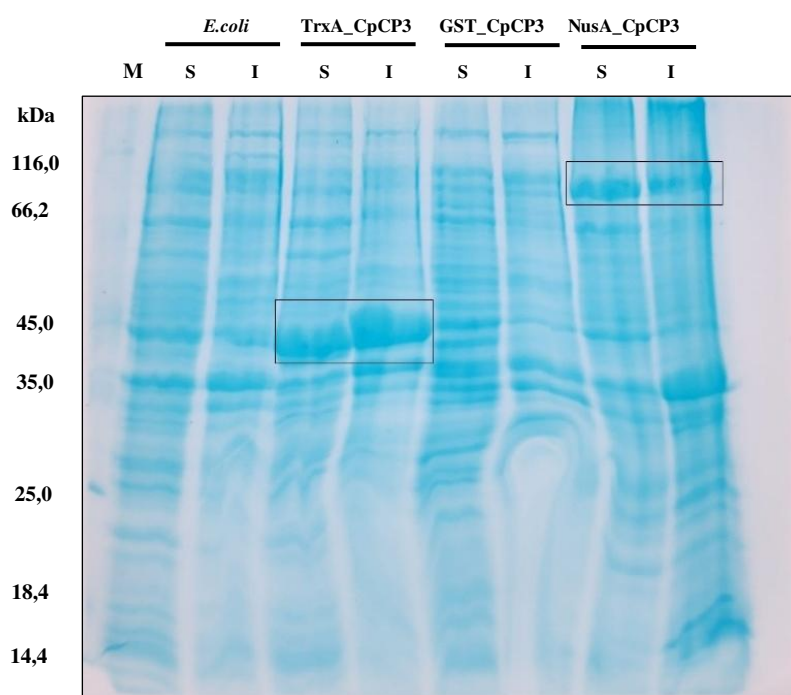
**Figura 8:** Expressão de TrxA\_CpCP3. A imagem mostra as frações proteicas obtidas após a lise de células de *E. coli* transformadas com o pET32(a)+ contendo a proteína de fusão TrxA, com a massa molecular total de 43,9 kDa. Da esquerda para a direita, é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), fração solúvel (S) e insolúvel (I) de quatro repetições. Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 9:** Expressão de GST\_CpCP3. A imagem mostra as frações proteicas obtidas após a lise de células de *E. coli* transformadas com o pET41(a)+ contendo proteína de fusão GST, com a massa molecular total de 57,7 kDa. Da esquerda para a direita, é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), fração solúvel (S) e insolúvel (I) de três repetições. Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 10:** Expressão de NusA\_CpCP3. A imagem mostra as frações proteicas obtidas após a lise de células de *E. coli* transformadas com o pET43.1(a)+ contendo proteína de fusão NusA, com a massa molecular total de 85,9 kDa. Da esquerda para a direita, é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), fração solúvel (S) e insolúvel (I) de três repetições. Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 11:** Indução das diferentes proteínas recombinantes (TrxA\_CpCP3, GST\_CpCP3 e NusA\_CpCP3) e proteínas da *E. coli* não transformada. No primeiro poço é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), seguido pela fração solúvel e insolúvel do extrato de *E. coli* não transformado, proteína de fusão TrxA\_CpCP3, GST\_CpCP3 e NusA\_CpCP3, sequencialmente. Fonte: Elaborado pela autora.

O uso de proteínas de fusão com *tags* para aumentar a solubilidade do produto recombinante, em sistemas de expressão heteróloga, é uma metodologia bastante utilizada para a produção de proteínas que necessitam de uma atenção especial no quesito solubilidade. Algumas proteínas (*tags*) de fusão para essa finalidade, como glutationa-S-transferase (GST), tiorredoxina (TrxA) e proteína de terminação/antiterminação de transcrição (NusA), desempenham papéis importantes na solubilização e estabilidade de proteínas recombinantes expressas em *E. coli*. A GST, por exemplo, não apenas facilita a purificação por meio de afinidade, mas também protege contra a proteólise intracelular e contribui para a manutenção da proteína na fração solúvel. A NusA, por sua vez, desacelera a tradução, proporcionando mais tempo para que o dobramento da proteína ocorra corretamente, aumentando assim a solubilidade. Já a TrxA auxilia no redobramento de proteínas que dependem de um ambiente redutor para sua estruturação adequada (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018).

Porém, apesar de a glutationa-S-transferase (GST) ser frequentemente utilizada para aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes, sua eficácia nesse quesito pode ser limitada em determinadas proteínas. Em alguns casos, as proteínas fusionadas à GST podem ainda ser parcialmente ou totalmente insolúveis, formando corpos de inclusão em *E. coli* (FRANGIONI; NEEL, 1993; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Esse achado corrobora com o resultado obtido da tentativa de expressar a CpCP3 com a *tag* GST. A ausência de uma banda

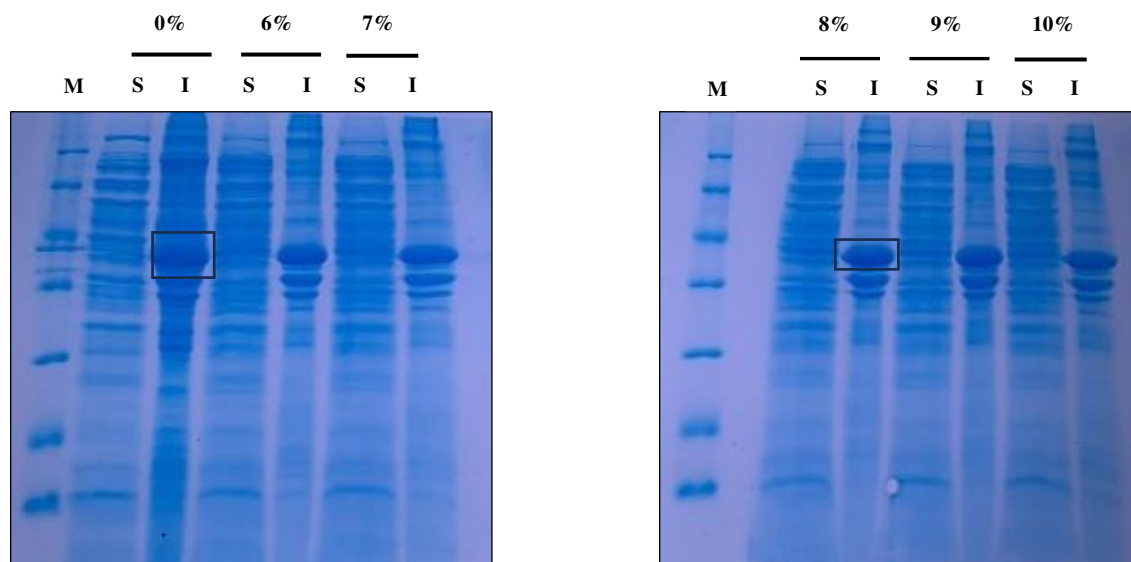
específica na SDS-PAGE pode indicar que a proteína provavelmente possa ter sofrido baixa expressão, degradação proteolítica ou formação de agregados insolúveis. Por outro lado, a proteína CpCP3 fusionada a TrxA e NusA foi expressa de forma satisfatória, embora ainda na fração insolúvel do extrato celular em forma de corpos de inclusão.

Como é descrito em vários experimentos, a expressão de proteínas heterólogas em *Escherichia coli* BL21(DE3) pode resultar na formação de corpos de inclusão, especialmente quando as condições de expressão são subótimas ou quando a proteína é altamente expressa. Esses corpos de inclusão são agregados de proteínas mal dobradas ou mal processadas, que se acumulam na fração insolúvel da célula bacteriana. Esse fenômeno ocorre porque, quando a proteína heteróloga é superexpressa, as vias celulares de dobramento proteico da *E. coli* muitas vezes não conseguem acompanhar a demanda de produção da proteína. Como resultado, a proteína não consegue se dobrar corretamente e forma agregados insolúveis. Esses agregados podem ser visualizados como grandes massas dentro da célula e geralmente contêm proteínas que não estão no seu estado funcional ativo. Essa formação de corpos de inclusão não é incomum em experimentos de expressão de proteínas recombinantes, e embora as proteínas presentes nesses agregados não possam ser usadas diretamente para aplicações que dependem de sua conformação ativa, é possível solubilizá-las utilizando detergentes ou agentes redutores para recuperar a proteína funcional posteriormente (BHATWA *et al.*, 2021; JÄGER *et al.*, 2020).

Diante desse desafio, algumas estratégias foram testadas para melhorar a solubilidade da proteína recombinante e possibilitar sua recuperação na forma ativa. Para isso, foram realizadas modificações no tampão de lise celular, incluindo a adição de agentes solubilizantes e desnaturantes, além de variações no pH da solução.

## **6.2 Expressão da proteína recombinante em sua forma solúvel**

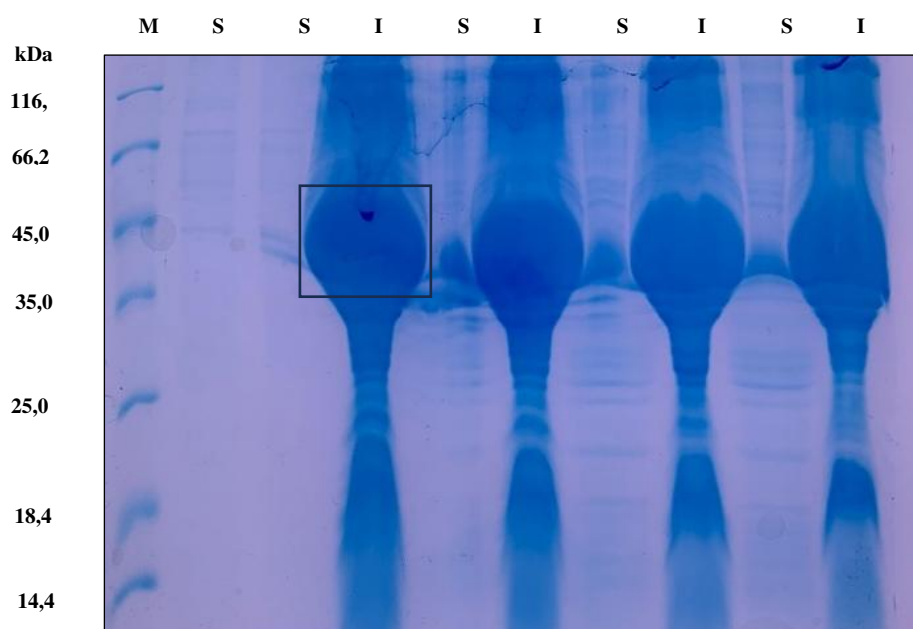
Inicialmente, o tampão de lise padrão (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, EDTA 2 mM, Glicerol 10%, pH 8,0) foi suplementado, individualmente, com o detergente CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) em concentrações finais de 6% a 10%. No entanto, essa estratégia não foi eficaz na solubilização dos corpos de inclusão, uma vez que a proteína recombinante permaneceu predominantemente na fração insolúvel. A Figura 12 apresenta a análise por SDS-PAGE da expressão da proteína de fusão TrxA\_CpCP3, evidenciando o padrão de bandas obtido após modificação do tampão de lise.



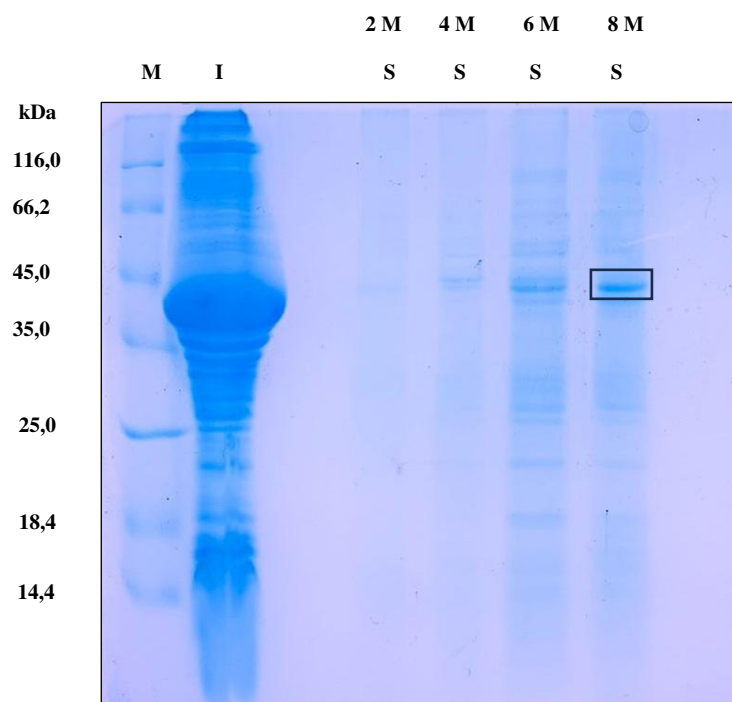
**Figura 12:** Expressão de TrxA\_CpCP3 utilizando tampão de lise contendo CTAB em concentrações variando de 6 – 10%. A imagem mostra a expressão de TrxA\_CpCP3 na fração insolúvel. No primeiro gel são evidenciadas as frações obtidas com tampão de lise contendo CTAB nas concentrações de 0%, 6% e 7%. O segundo gel, mostra as frações obtidas com tampão de lise contendo CTAB nas concentrações de 8%, 9% e 10%. Em cada coluna no gel segue o seguinte padrão: no primeiro poço é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), seguido da fração solúvel (S) e insolúvel (I) nas diferentes concentrações de CTAB. Fonte: Elaborada pela autora.

O CTAB é um detergente catiônico amplamente utilizado para a solubilização de biomoléculas devido à sua capacidade de interagir com membranas celulares e proteínas por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Sua estrutura anfifílica permite a formação de micelas, que podem envolver proteínas agregadas e promover sua solubilização ao interagir com resíduos carregados negativamente na superfície proteica. No entanto, a eficiência do CTAB na solubilização de corpos de inclusão depende da natureza das interações estabilizadoras desses agregados. Em casos em que as proteínas nos corpos de inclusão são mantidas por interações hidrofóbicas intensas ou pontes dissulfeto, o CTAB pode não ser suficientemente disruptivo para liberar a proteína de forma solúvel. Além disso, altas concentrações do detergente podem induzir mudanças conformacionais na proteína, levando à sua precipitação em vez de solubilização (KHAN *et al.*, 2019). Diante disso, é provável que os corpos de inclusão formados por diferentes construções das proteínas de fusão tenham sido estabilizados por interações hidrofóbicas intensas, tornando o CTAB incapaz de rompê-las e solubilizar a proteína. Além disso, por se tratar de uma protease cisteínica, a formação de pontes dissulfeto era esperada, o que dificultou ainda mais a solubilização, pois essas ligações covalentes exigem condições específicas para serem rompidas.

Posteriormente, em uma segunda tentativa de solubilizar os corpos de inclusão e recuperar a proteína recombinante em sua forma ativa, a fração insolúvel do extrato (*pellet*) foi tratada com soluções de ureia em diferentes concentrações (2 M a 8 M) a pH 8,0. A solução foi pré-incubada em banho-maria por 1 hora a 45°C, visando promover a dissolução das proteínas agregadas. A concentração de ureia foi gradualmente aumentada para identificar a concentração ideal que promovesse a solubilização da proteína sem comprometer sua estrutura funcional. No entanto, apesar da aplicação dessa metodologia, observou-se que boa parte das proteínas permaneceram na fração insolúvel, conforme mostrado na Figura 13. Entretanto, notou-se um aumento na quantidade de proteínas nas frações solúveis com o aumento da concentração de ureia (Figura 14). Isso sugere que, embora nem toda a proteína tenha sido completamente recuperada na fração solúvel sob as condições aplicadas, a ureia foi eficaz na solubilização parcial.



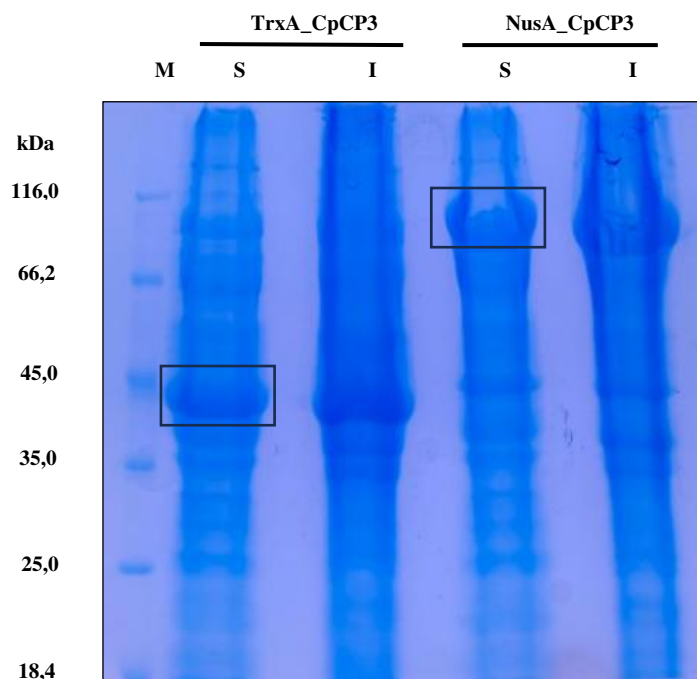
**Figura 13:** Solubilização dos pellets de TrxA\_CpCP3 com soluções de ureia de 2 M a 8 M. No primeiro poço é visualizado o marcador molecular (kDa), seguido da fração solúvel (S) não contendo ureia, posteriormente a fração solúvel e insolúvel (I) do extrato proteico contendo as proteínas em soluções com diferentes concentrações de ureia (2 M, 4 M, 6 M e 8 M, sequencialmente). Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 14:** Frações solúveis dos extratos proteicos de TrxA\_CpCP3 contendo soluções de Ureia 2 M, 4 M, 6 M e 8 M. Um acúmulo progressivo de proteínas nas frações solúveis foi observado à medida que concentrações maiores de ureia foram utilizadas. No primeiro poço é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), seguido da fração insolúvel (para efeito de comparação) e frações solúvel (S) dos extratos contendo diferentes concentrações de ureia. Fonte: Elaborado pela autora.

Com base nesses resultados, um novo protocolo foi proposto, otimizando o uso de ureia a 8 M, ajustando o pH (de 8,0 para 12,5) e incorporando o desnaturante no tampão de lise. Conforme mostrado na Figura 14, a banda correspondente à solubilização com 8 M de ureia apresentou um maior acúmulo de proteínas na fração solúvel, sugerindo que essa concentração foi mais eficaz para promover a solubilização. A indução da expressão das proteínas recombinantes TrxA\_CpCP3 e NusA\_CpCP3 em células de *E. coli* BL21(DE3) foi realizada com IPTG na concentração final de 0,4 mM por 3 horas a 37°C. A lise celular foi realizada por meio de ultrasonicação e tampão de lise contendo ureia 8 M a pH 12,5. Após aplicar o tampão modificado no processo de lise celular, observou-se uma melhoria significativa nos resultados, com maior acúmulo da proteína na fração solúvel, indicando que as condições de alta concentração de ureia em pH mais alcalino favorecem a solubilização eficiente de uma parte dos corpos de inclusão. A Figura 15 demonstra que a proteína foi expressa em quantidades significativas na fração solúvel do extrato total, reforçando a aplicabilidade do protocolo adaptado para a recuperação de proteínas de corpos de inclusão.





**Figura 15:** Expressão das proteínas TrxA\_CpCP3 e NusA\_CpCP3 na fração solúvel contendo ureia 8 M no tampão de lise, demonstrando a solubilização eficiente de uma parte dos corpos de inclusão. No primeiro poço é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), seguido da fração solúvel (S) e insolúvel (I) do extrato contendo TrxA\_CpCP3 e NusA\_CpCP3, sequencialmente. Fonte: Elaborado pela autora.

A ureia é amplamente utilizada para solubilizar proteínas agregadas, pois desnatura essas moléculas ao interagir com resíduos polares e hidrofóbicos. Ela forma pontes de hidrogênio com grupos polares, competindo com as interações intramoleculares da proteína, e reduz a estabilidade do efeito hidrofóbico, expondo regiões apolares ao meio aquoso (FREGNAN *et al.*, 2020). De acordo com Esmali *et al.*, o uso de ureia em altas concentrações e pH alcalino demonstrou ser eficaz para romper interações intermoleculares, aumentando a solubilidade das proteínas presentes em corpos de inclusão. O pH alcalino facilita a quebra das pontes dissulfeto intermoleculares, promovendo a solubilização dos agregados proteicos. Essa condição também favorece o *refolding* de proteínas ricas em resíduos de cisteína, uma vez que reduz a formação de ligações dissulfeto incorretas e previne o enovelamento inadequado. Nesse estudo, os autores solubilizam a proteína reteplase, utilizando ureia como agente desnaturante. A reteplase é uma forma recombinante não glicosilada do ativador de plasminogênio tecidual, produzida em *Escherichia coli*, cuja superexpressão geralmente resulta na formação de agregados inativos ou corpos de inclusão. Para solubilizar esses corpos de inclusão, os pesquisadores utilizaram diferentes agentes desnaturantes e determinaram que a melhor condição foi o uso de 6 M de ureia em pH 12,3 (ESMAILI; MOHAMMAD SADEGHI;

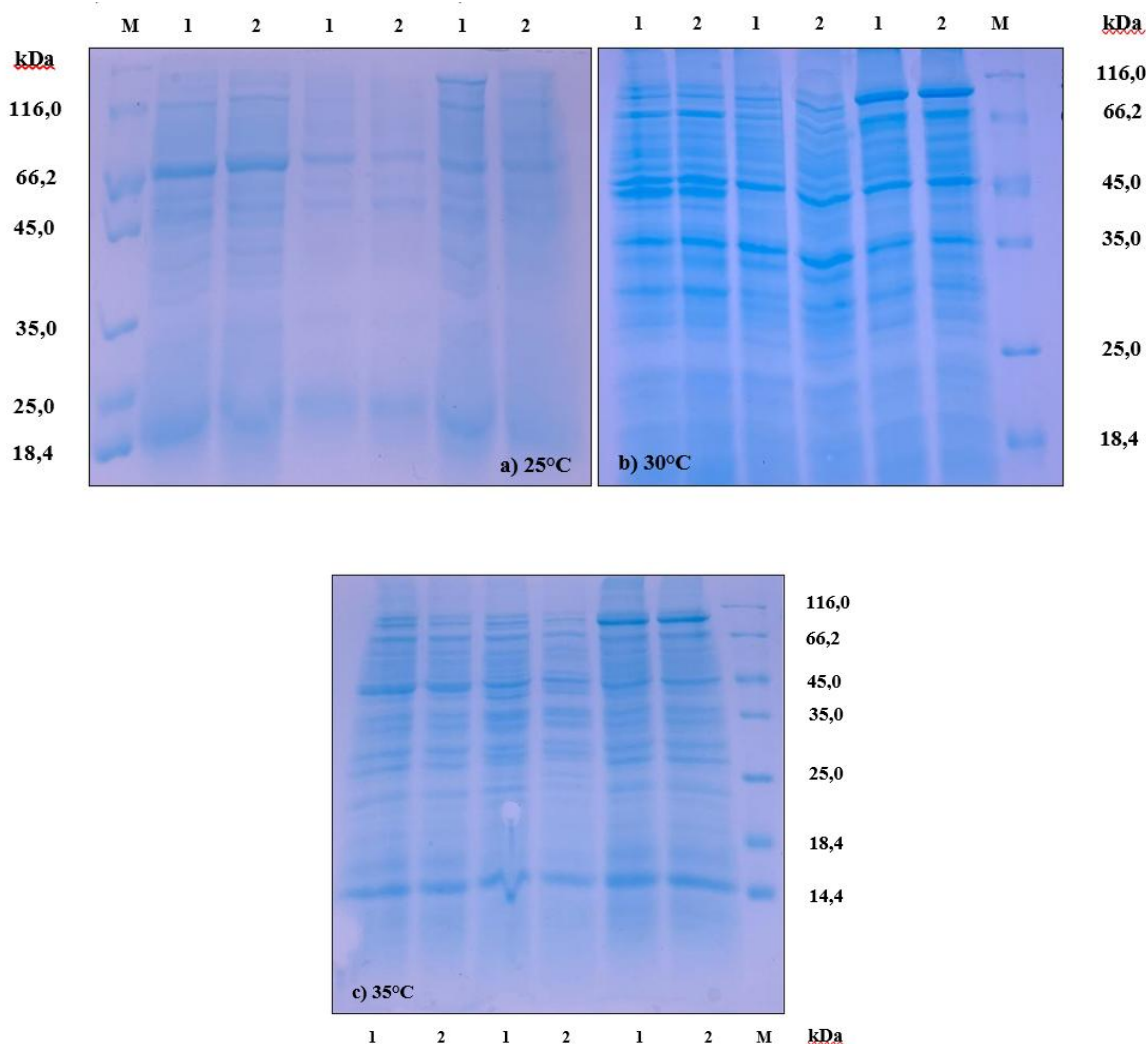


AKBARI, 2018). Dessa forma, utilizando a metodologia abordada pelo autor anterior (ureia em altas concentrações e em pH alcalino), mas adicionando o desnaturante ao tampão de lise, foi possível solubilizar grande parte da proteína presente nos corpos de inclusão. Isso indica que a agregação da proteína era mantida, em grande parte, por interações não covalentes, as quais foram eficazmente dissociadas pelo tratamento desnaturante, permitindo sua recuperação na fração solúvel. Com o protocolo de solubilização definido, otimizar as condições de indução e expressão, tornaram-se necessários para aumentar a produção da proteína recombinante na forma solúvel.

### **6.3 Otimização dos protocolos de indução da expressão**

Nos testes piloto a expressão das proteínas foi realizada a 37°C e com um tempo de indução de 3 horas. Assim, a fim de otimizar a expressão da proteína recombinante, foram avaliados diferentes tempos de indução (1 e 2 horas) e temperaturas (25, 30 e 35°C).

A análise do gel de SDS-PAGE (Figura 16) mostrou que, nessas condições, a construção TrxA\_CpCP3 manteve um padrão de expressão consistente, enquanto a construção NusA\_CpCP3 apresentou um maior acúmulo de proteína nas temperaturas de 30 e 35°C, sugerindo que a temperatura influenciou positivamente a eficiência da expressão. Por outro lado, a construção GST\_CpCP3 continuou apresentando um padrão de expressão baixo e não detectável. Mühlmann *et al.*, demonstraram que a temperatura tem um impacto direto na expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, com temperaturas mais altas aumentando o fardo metabólico e reduzindo a expressão proteica, enquanto temperaturas mais baixas favorecem a produção de proteína solúvel e minimizam a formação de corpos de inclusão. Com base nesses resultados, a proteína de fusão NusA\_CpCP3 parece ter alcançado uma expressão mais eficiente a 30°C, e o tempo de indução testado não afetou significativamente o padrão de expressão (MÜHLMANN *et al.*, 2017).

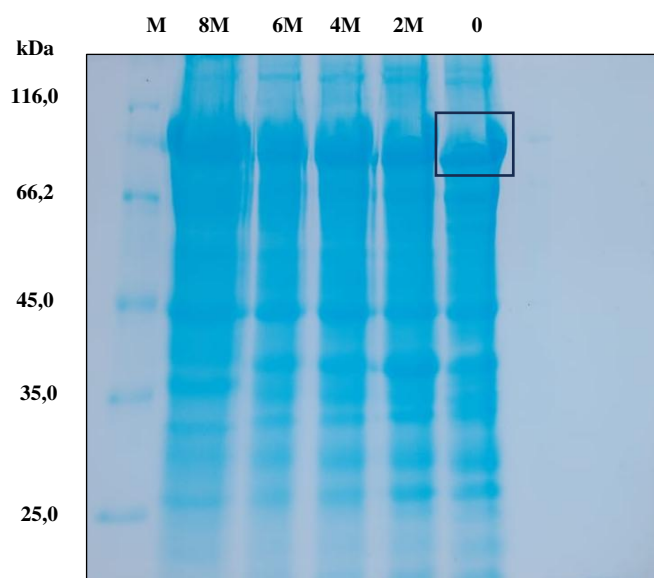


**Figura 16:** Expressão das proteínas em diferentes temperaturas na fase de indução, evidenciando as frações solúveis (S) e insolúveis (I) dos extratos proteicos contendo ureia 8 M no tampão de lise. a) indução a 25°C, b) indução a 30°C e c) indução a 35°C. No gel a, no primeiro poço é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), seguido da fração solúvel contendo os extratos induzidos em 1 e 2 horas, seguindo a sequência das construções em TrxA\_CpCP3, GST\_CpCP3 e NusA\_CpCP3. Nos geis b e c, o marcador se encontra no último poço. Fonte: Elaborado pela autora.

#### 6.4 Remoção de ureia e retorno ao pH 8,0

Após o estabelecimento de um protocolo que permitiu a obtenção da proteína recombinante na fração solúvel e em condições ideais, foi necessário remover a ureia 8 M da solução e ajustar o pH do tampão de lise (inicialmente em pH 12,5) para que os procedimentos subsequentes pudessem ser realizados de maneira adequada. Para isso, foi realizado um procedimento de diálise sucessiva contra tampões com concentrações progressivamente decrescentes de ureia e valores de pH (para 8,0). A Figura 17 demonstra que a proteína permaneceu solúvel após o procedimento, indicando a eficácia do processo na manutenção da

solubilidade da proteína recombinante após o tratamento. Esse resultado corrobora com os estudos realizados por Maksum *et al.*, no qual relata que a diminuição da concentração de agentes desnaturantes facilita o processo de *refolding* da proteína. Assim, a redução gradual da ureia permite que a proteína passe por um processo controlado de *refolding*, minimizando a formação de agregados insolúveis, enquanto o ajuste gradual do pH proporciona à proteína mais tempo para adotar conformações solúveis antes de atingir um ponto crítico de agregação, permitindo a formação ordenada de ligações (MAKSUM *et al.*, 2022). Dessa forma, foram iniciados os testes subsequentes para sua purificação.

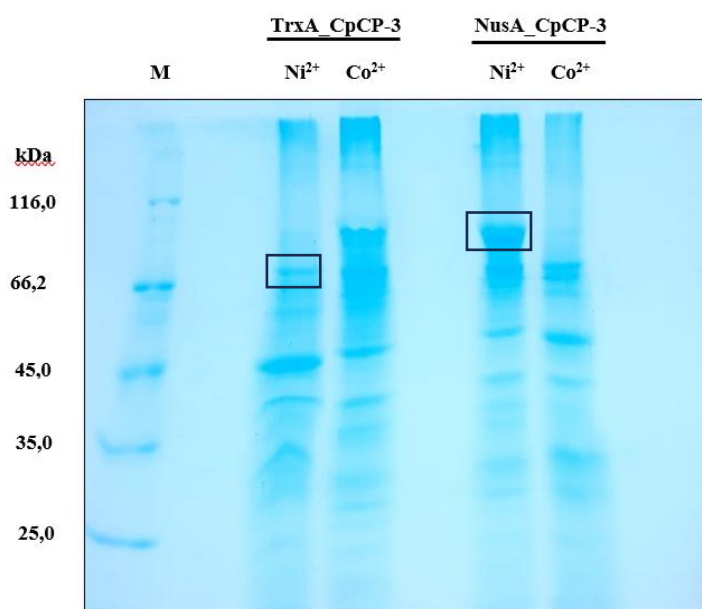


**Figura 17:** Remoção gradual de ureia 8 M da fração solúvel da proteína recombinante NusA\_CpCP3. A imagem mostra as frações dos extratos proteicos correspondentes a cada etapa de redução gradual de ureia. No primeiro poço é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), seguido da fração 8 M, 6 M, 4 M, 2 M e sem ureia. Fonte: Elaborada pela autora.

## Etapa 2 – Tentativas de Purificação de CPCP3 recombinante

### 6.5 Protocolo 1 - Cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC)

Durante o processo de purificação da proteína recombinante, utilizando cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC) com resinas contendo níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) e cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ), diversas tentativas de eluição foram realizadas utilizando um gradiente de concentração de imidazol que variou de 10 mM a 500 mM. No entanto, a proteína não se ligou de forma eficiente às resinas. A proteína NusA\_CpCP3, utilizando a matriz contendo  $\text{Co}^{2+}$  imobilizado, não foi visualizada no pico não retido, bem como no pico retido, sugerindo possivelmente sua autoproteólise no processo de purificação. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 18, evidenciando a presença da proteína no pico não obtido em cada cromatografia.



**Figura 18:** Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) utilizando resinas de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) e cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ). A imagem mostra a presença da proteína nas frações do pico não retido coletadas durante cada cromatografia. No primeiro poço é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), seguido do pico não retido de TrxA\_CpCP3 da cromatografia com níquel e cobalto e pico não retido de NusA\_CpCP3 (na mesma ordem).

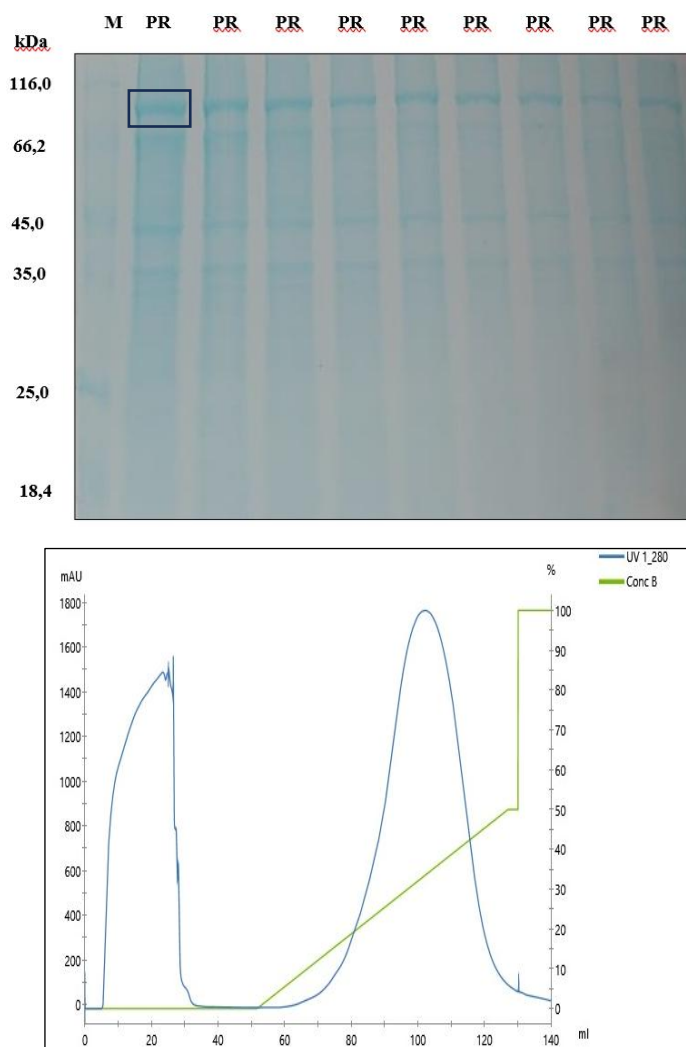
O imidazol compete com a cauda de histidina (His-tag) pelos sítios de ligação na resina, deslocando a proteína de interesse e permitindo sua eluição. Este método é amplamente utilizado devido à sua eficiência e especificidade na purificação de proteínas recombinantes (KIELKOPF; BAUER; URBATSCH, 2020b; LOUGHRAN; BREE; WALLS, 2023). Uma possível explicação para a não aderência das proteínas de fusão a matriz cromatográfica pode

ser atribuída a inacessibilidade da cauda de histidina na superfície da proteína. A eficiência da IMAC depende da exposição adequada da His-tag que interage com os íons metálicos da resina. Se a His-tag estiver em uma conformação desfavorável ou não suficientemente exposta, a interação com a resina é prejudicada, impedindo a purificação desejada. Alguns autores indicam que o posicionamento e a acessibilidade da His-tag são cruciais para a eficiência da purificação (KIELKOPF; BAUER; URBATSCH, 2020b; LOUGHRAN; BREE; WALLS, 2023).

Esses resultados estão alinhados com outros estudos que relataram dificuldades na purificação de proteínas recombinantes utilizando IMAC. Por exemplo, Lima relatou a expressão e purificação da proteína recombinante Fh8MolA em *Escherichia coli*, observando que grande parte da proteína não se ligou à coluna de níquel, indicando uma possível inacessibilidade da His-tag ou condições de purificação inadequadas (LIMA, 2013). Em outro estudo, pesquisadores relatam as dificuldades encontradas na purificação da proteína recombinante Nectina (rNec) também expressa em *Escherichia coli*. Apesar de testar diferentes condições de purificação por IMAC, incluindo variações nos tampões de ligação e eluição, os autores relataram que a proteína de interesse não foi obtida em sua forma completa, sendo detectadas apenas versões truncadas, e que a proteína pode ter tornado a cauda de histidina inacessível, impedindo sua ligação à coluna de  $\text{Ni}^{2+}$  (BATISTA, 2020).

## 6.6 Protocolo 2 – Combinação de cromatografias por troca iônica e exclusão molecular

O extrato total contendo as proteínas recombinantes fusionada a *tag* NusA foi utilizada para testar a segunda metodologia, utilizando a combinação de duas técnicas eletroforéticas. Após a etapa de purificação com a matriz DEAE-Sepharose, a análise por SDS-PAGE revelou a presença da protease no pico retido (PR), juntamente com outras proteínas (Figura 19).

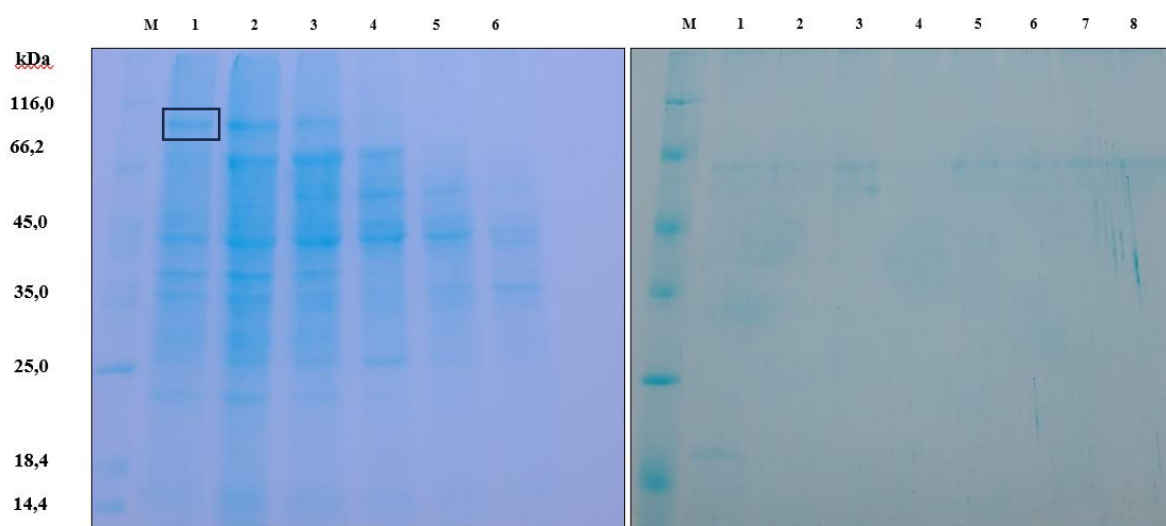


**Figura 19:** Cromatografia em DEAE-Sepharose. A imagem do gel SDS-PAGE apresenta, no primeiro poço, o marcador de massa molecular (kDa), seguido das frações correspondentes ao pico retido, coletadas em diferentes tubos após a eluição com um gradiente de 0 - 500 mM de NaCl. A segunda imagem exibe o cromatograma da cromatografia de troca iônica em DEAE-sepharose, destacando dois picos distintos: o não retido e o retido. Fonte: Elaborada pela autora.

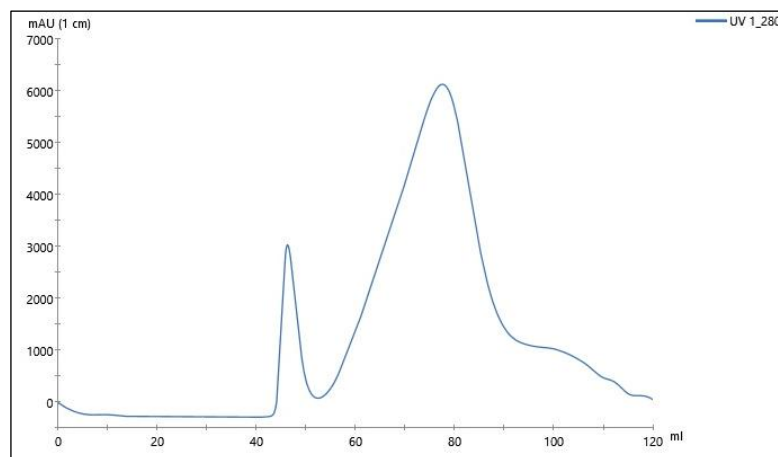
A matriz de DEAE-Sepharose possui carga positiva e interage seletivamente com proteínas carregadas negativamente, promovendo sua retenção. O extrato proteico contendo a proteína de fusão NusA\_CpCP3 foi preparado em pH 8,0, condição na qual a proteína assumiu

carga negativa, uma vez que seu ponto isoelétrico é de 5,17. Dessa forma, a proteína interagiu com a matriz e pôde ser eluída gradualmente com um gradiente de NaCl de 0 a 500 mM. No entanto, devido à alta concentração de proteínas presentes no extrato celular, é provável que tenha ocorrido saturação da coluna, o que pode ter comprometido a eficiência da separação. Como consequência, proteínas foram detectadas tanto na fração retida quanto na não retida, indicando que parte da proteína de interesse pode não ter sido completamente capturada pela matriz ou que houve coeluição com outras proteínas do extrato. Dessa forma, as frações contendo as bandas mais intensas da proteína no pico retido foram reunidas, liofilizadas e posteriormente solubilizadas a uma concentração de 2 mg/mL para injeção na coluna de exclusão molecular.

A cromatografia de exclusão molecular resultou na separação de dois picos distintos, conforme observado no gel de SDS-PAGE (Figura 20) e no cromatograma (Figura 21). A proteína recombinante foi detectada no primeiro pico, correspondente à fração de proteínas de maior peso molecular. No segundo pico, foram eluídas proteínas de menor peso molecular, sem a presença detectável da protease.



**Figura 20:** Cromatografia em Exclusão molecular. Frações correspondentes ao primeiro e segundo pico na purificação de NusA\_CpCP3 em Exclusão molecular - Sephacryl. No primeiro gel, no primeiro poço é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), seguido das amostras dos tubos obtidos no primeiro pico. No segundo gel, no primeiro poço é visualizado o marcador de massa molecular (kDa), seguido das amostras dos tubos obtidos no segundo pico cromatográfico. Fonte: Elaborado pela autora.



**Figura 21:** Cromatograma da purificação de NusA\_CpCP3 em exclusão molecular. O primeiro pico corresponde ao gel 1 da imagem 14. O segundo pico corresponde ao gel 2 da imagem 14.

A análise da cromatografia de exclusão molecular revelou que a proteína recombinante foi eluída principalmente no primeiro pico, correspondente a proteínas de maior massa molecular. Considerando que a proteína de interesse possui 85,9 kDa e que a coluna utilizada possui uma faixa de separação de 10 a 1.500 kDa, é esperado que proteínas de maior massa molecular ou a formação de complexos oligoméricos ocorram.

A proteína de maior massa molecular é a NusA\_CpCP3, mas como demonstrado na Figura 20, ela não foi purificada. Esse resultado apesar de estar de acordo com o princípio da separação cromatográfica da coluna utilizada, demonstrando que, dentre as diversas proteínas presentes no extrato proteico, a construção da proteína de fusão foi eluída primeiro, a coluna possui uma faixa de eluição bem ampla, também sendo apropriada a esse tipo de separação. No entanto, a presença de outras proteínas de menor massa molecular juntamente com NusA\_CpCP3 pode sugerir que possivelmente houve a formação de complexos entre as proteínas, e assim, ocasionou problemas na purificação. No entanto, fragmentos menores também foram observados no segundo pico. A presença desses fragmentos também pode indicar uma possível autodegradação da protease, pois a degradação enzimática resultaria em produtos de menor massa molecular.

Essa hipótese, bem como o não aparecimento da proteína nos picos da cromatografia por IMAC utilizando  $\text{Co}^{2+}$ , pode ser atribuída à autoproteólise da enzima durante o processo de purificação. Proteases, por sua natureza catalítica, podem hidrolisar suas próprias cadeias polipeptídicas ou outras proteínas presentes na amostra, especialmente na ausência de inibidores específicos ou sob condições não ideais de pH e temperatura. Essa autoproteólise resulta na formação de fragmentos peptídicos de menor massa molecular, que podem não ser



detectados nas análises subsequentes devido à sua baixa concentração ou tamanho reduzido. Estudos indicam que a estabilidade de proteases pode ser comprometida durante a purificação, levando à perda de atividade enzimática e à dificuldade na detecção da proteína intacta (SILVEIRA, 2015). Esse problema é bem documentado para as proteases Procerain e Procerain B, isoladas do látex de *C. procera*. Estudos demonstraram que essas enzimas permanecem estáveis sob condições normais, mas tornam-se altamente susceptíveis à degradação na presença de agentes desnaturantes ou redutores. No entanto, a adição de inibidores foi essencial para prevenir a autodigestão e permitir a visualização das bandas em SDS-PAGE, indicando que a degradação ocorre rapidamente em condições adversas se a enzima não estiver protegida (SRIVASTAVA *et al.*, 2022). De acordo com Costa, ao purificar proteases do besouro *Ulomoides dermestoides*, foi observada a necessidade de otimizar as condições de purificação para evitar a autodegradação enzimática (COSTA, 2014). Estudos evidenciam que desafios na purificação de IMAC podem surgir da autodegradação de proteínas, ligação ineficiente a matrizes cromatográficas ou competição com impurezas por sítios de ligação. Esses problemas podem resultar na perda de marcadores de histidina ou seletividade reduzida, impactando potencialmente a eficiência da purificação (KIELKOPF; BAUER; URBATSCH, 2020a; RIGUERO *et al.*, 2020).

Esses resultados sugerem que a proteína recombinante pode ter passado por um processo de autoproteólise e/ou não interagiu de forma eficiente com as matrizes cromatográficas utilizadas. Além disso, a resolução da coluna de exclusão molecular pode ter comprometido a separação adequada da proteína, resultando em sua coeluição com outras proteínas presentes no extrato. A presença de fragmentos menores no segundo pico reforça a hipótese de que a protease tenha sofrido autodegradação ao longo do processo de purificação, dificultando sua obtenção na forma íntegra. Diante desses desafios, torna-se essencial a adoção de estratégias adicionais para aprimorar a purificação da proteína recombinante, como a otimização das condições cromatográficas, o uso de inibidores de protease para minimizar a degradação e a aplicação de outras técnicas de separação com maior resolução.

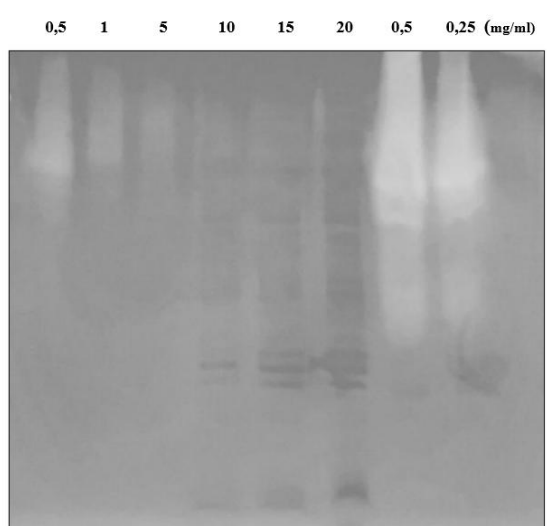
### Etapa 3 – Atividade proteolítica dos extratos proteicos

#### 6.7 Detecção de atividade proteolítica

##### 6.7.1 Zimograma

Diante das dificuldades encontradas na purificação da proteína recombinante, optou-se por realizar os ensaios de atividade proteolítica utilizando os extratos celulares contendo as proteínas de fusão. Essa abordagem permitiu avaliar preliminarmente a funcionalidade da enzima, mesmo na presença de outras proteínas da célula hospedeira.

Inicialmente, a atividade proteolítica foi avaliada por zimografia, utilizando gelatina a 0,1% como substrato. Os extratos celulares contendo as diferentes construções recombinantes da CpCP3 foram testados para verificar sua capacidade de degradação proteica, utilizando diferentes concentrações (0,5, 1, 5, 10, 15 e 20 mg/mL). A papaína foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,5 e 0,25 mg/mL. Após a eletroforese e a incubação a 37°C em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contendo DTT 3 mM, apenas o extrato contendo a construção NusA\_CpCP3 (Figura 22) apresentou atividade detectável, evidenciada pela degradação da gelatina incorporada no gel. Como esperado, a papaína também digeriu a gelatina, reforçando a confiabilidade do experimento.



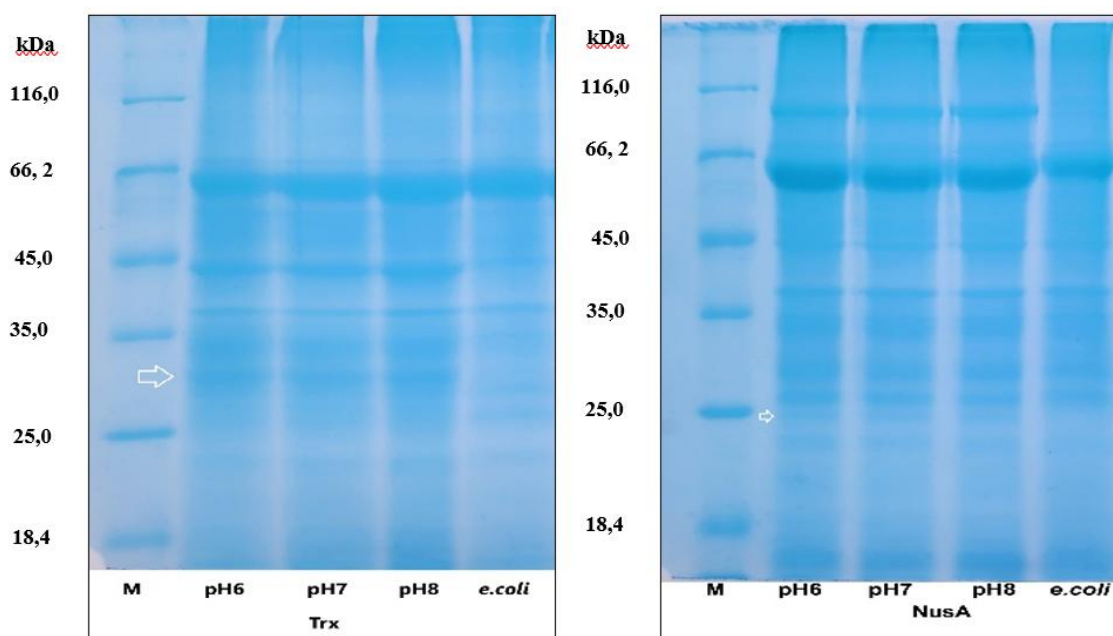
**Figura 22:** Gel de eletroforese do zimograma com a proteína recombinante NusA\_CpCP3. No primeiro poço é visualizado o extrato na concentração 0,5 mg/mL, seguida da concentração 1, 5, 10, 15 e 20 mg/mL. Logo após, a papaína também está presente na concentração de 0,5 e 0,25 mg/mL. Fonte: Elaborado pela autora.

Essa técnica eletroforética é amplamente utilizada para detectar e caracterizar atividades proteolíticas gerais, pois o gel nativo (*Native-PAGE*) é preparado com substrato específico para a enzima de interesse (MARTINEZ-CASTILLO *et al.*, 2024). Khadka *et al.*, também utilizaram zimografia como um dos métodos para confirmar a atividade de protease, utilizando diferentes concentrações do extrato e obtendo resultados promissores (KHADKA *et al.*, 2024), corroborando com a metodologia utilizada para o experimento realizado.

A detecção de atividade enzimática apenas na proteína recombinante fusionada à *tag* NusA durante a zimografia sugere que essa fusão foi essencial para a expressão e funcionalidade da CpCP3. A presença da *tag* pode ter contribuído para uma maior estabilidade estrutural da enzima, reduzindo sua susceptibilidade à proteólise por outras proteases do extrato de *E. coli* e/ou à autoproteólise. Além disso, a fusão com NusA pode ter facilitado o correto dobramento da proteína, garantindo uma melhor acessibilidade ao sítio ativo e, consequentemente, preservando sua atividade enzimática. Esse resultado corrobora com estudos realizados por De Marco *et al.*, no qual o uso da *tag* NusA fusionada a sua proteína de estudo melhorou a solubilidade e estabilidade da molécula, reduzindo a formação de corpos de inclusão e protegendo contra degradação proteolítica, e consequentemente refletindo na atividade da proteína (DE MARCO *et al.*, 2004).

#### **6.7.2 Digestão *in vitro* de BSA**

Uma segunda abordagem foi empregada para avaliar a capacidade de digestão proteica dos extratos contendo as diferentes proteínas recombinantes. Para isso, a albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como substrato na concentração de 5 mg/mL, na presença de 3 mM de DTT e tampões com diferentes valores de pH (6–8). As reações foram incubadas a 40°C por 24 horas, permitindo a análise do padrão de degradação proteica, conforme apresentado na Figura 23.



**Figura 23:** Digestão *in vitro* de BSA pelas diferentes proteínas recombinantes. No primeiro gel é evidenciado o ensaio enzimático com TrxA\_CpCP3 e extrato de *E. coli* como controle. No segundo gel, é evidenciado a NusA\_CpCP3 e o extrato de *E. coli* como controle. Fonte: Elaborado pela autora.

No gel correspondente à construção TrxA\_CpCP3, observa-se o aparecimento de uma banda inferior à marcação do marcador molecular de 35 kDa, ausente no controle contendo o extrato de *E. coli* não transformada. Esse achado sugere que ocorreu uma digestão discreta da BSA. No gel referente NusA\_CpCP3, a banda correspondente à BSA apresenta um tamanho menor em comparação ao controle de *E. coli* não transformada, indicando uma possível degradação, ainda que em menor grau. Além disso, uma banda de aproximadamente 25 kDa, de acordo com o marcador molecular, também foi visualizada no mesmo gel, reforçando a hipótese de digestão parcial da BSA pela proteína de fusão. Esses resultados sugerem que, embora a atividade proteolítica tenha sido limitada, houve alguma degradação da BSA nos ensaios realizados.

A atividade enzimática observada com TrxA\_CpCP3 foi um resultado que não foi detectado no zimograma. Uma hipótese para essa diferença pode ser atribuída à especificidade de substrato da CpCP3, pois proteases cisteínicas exibem preferências distintas por sequências de aminoácidos em seus substratos, influenciando assim na sua eficiência catalítica (RAWLINGS *et al.*, 2018b). A gelatina, utilizada no zimograma, e a BSA, empregada no ensaio subsequente, embora ambas sejam proteínas, possuem composições e estruturas diferentes. A gelatina é derivada do colágeno e consiste principalmente em sequências repetitivas de glicina-

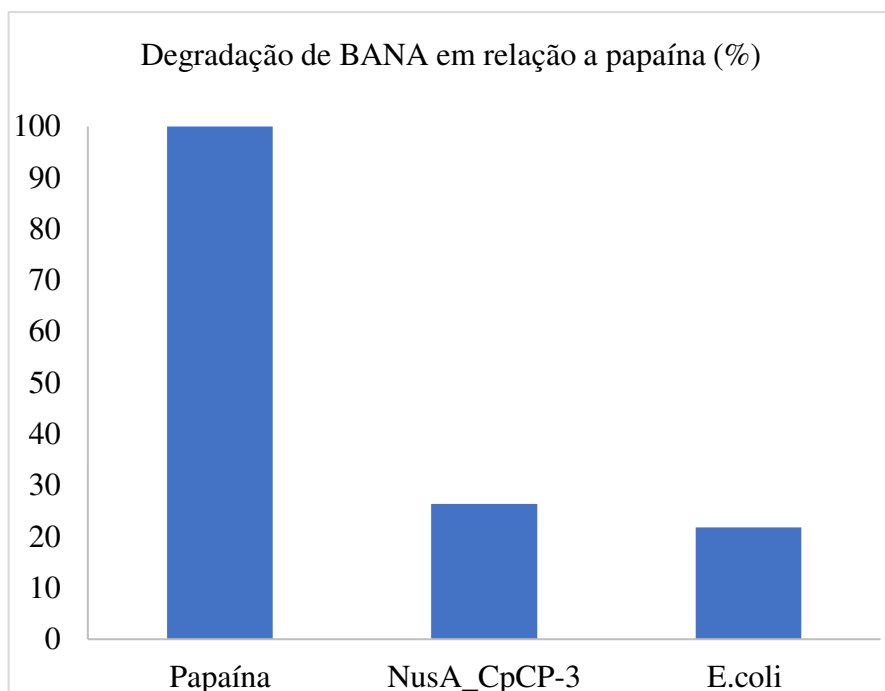
prolina-hidroxiprolina, resultando em uma estrutura menos ordenada (RATHER *et al.*, 2022). Em contraste, a BSA é uma proteína globular com uma conformação tridimensional bem definida e uma composição de aminoácidos mais diversificada, sendo rica em valina (Val), arginina (Arg), ácido aspártico (Asp) e outros aminoácidos (YILDIZ; KARA; ACARTÜRK, 2020). Proteases cisteínicas, como as semelhantes à papaína, costumam apresentar uma preferência por substratos que contêm cadeias laterais hidrofóbicas e resíduos de aminoácidos diversificados, como leucina (Leu), valina (Val), arginina (Arg), lisina (Lys), glutamina (Gln) e ácido aspártico (Asp) (RAWLINGS *et al.*, 2018b). Além disso, o ensaio com BSA, apesar de revelar uma atividade proteolítica mínima, sugere que a composição de aminoácidos desse substrato facilita a ligação da protease nas duas construções, ao contrário da gelatina utilizada no zimograma, que provavelmente favoreceu apenas a construção NusA\_CpCP3. A abundância desses resíduos interativos pode ter proporcionado um maior número de sítios de afinidade e assim a atividade enzimática da construção TrxA\_CpCP3 pôde ser evidenciada, reforçando a hipótese de que a especificidade enzimática é influenciada pela composição do substrato e pela complementaridade com o sítio ativo da protease.

### 6.7.3 Ensaio colorimétrico com BANA

O ensaio colorimétrico utilizando BANA foi empregado para avaliar a atividade enzimática das proteínas de fusão, uma vez que este substrato sintético é amplamente utilizado na detecção de proteases cisteínicas (ARAÚJO, 2009). Como mencionado anteriormente, essas enzimas possuem especificidade por substratos contendo resíduos de arginina ou lisina próximos ao sítio de clivagem, sendo o BANA um substrato que apresenta essa composição. A hidrólise do BANA resulta na liberação da  $\beta$ -naftilamida, que aumenta a absorbância em 540 nm, permitindo a quantificação da atividade enzimática da protease recombinante (ARAÚJO, 2009).

O extrato total de *E. coli* expressando NusA\_CpCP3 apresentou apenas uma atividade discreta quando submetido à ensaio de degradação proteolítica do substrato BANA, quando comparado a extrato oriundo de células de *E. coli* não transformadas, com NusA\_CpCP3 apresentando 79,3 unidades de atividade e *E. coli* 65,4 unidades de atividade, o que corresponde a um percentual de hidrólise relativo à papaína de 26,43 e 21,8%, respectivamente (Gráfico 1). Este resultado se opõe ao achado de que o extrato contendo NusA\_CpCP3 apresentou-se ativo contra gelatina (zimograma – Figura 22) e BSA (digestão *in vitro* – Figura 23), enquanto o extrato de *E. coli* não.

**Gráfico 1:** O gráfico mostra o percentual de degradação de BANA em relação à papaína.



Fonte: Elaborado pela autora. No eixo x é evidenciado a papaína, NusA\_CpCP3 e extrato de *E.coli* não transformada. No eixo y, unidade de atividade.

Deste modo, a baixa atividade da construção NusA\_CpCP3 com o substrato BANA pode estar relacionada à dependência de uma conformação correta para a interação eficiente. O BANA, por ser um substrato mais simples e específico, requer um contato otimizado com o sítio ativo da enzima para que a hidrólise ocorra de maneira eficiente, conforme demonstrado nos testes *in silico* (próxima etapa de resultados). Assim, qualquer alteração na estrutura da proteína recombinante pode comprometer essa interação com BANA e reduzir sua atividade. Esse resultado corrobora com estudos que demonstraram que a estrutura de uma enzima e as mudanças conformacionais desempenham um papel crucial na especificidade do substrato e na eficiência catalítica, particularmente para substratos pequenos que dependem de interações precisas do sítio ativo (POST; RAY, 1995).

Por outro lado, substratos maiores e mais complexos, como BSA e gelatina, possuem maior diversidade de aminoácidos e múltiplos sítios de interação, aumentando a probabilidade de clivagens proteolíticas bem-sucedida. Dessa forma, mesmo que a proteína recombinante tenha sofrido um possível dobramento não ideal, a atividade enzimática ainda pôde ser detectada visualmente nesses substratos. Esse efeito não foi observado no extrato de *E. coli*, reforçando a ideia de que a conformação da proteína influencia diretamente sua

especificidade e eficiência catalítica, especialmente em substratos pequenos e altamente dependentes da interação precisa com o sítio ativo

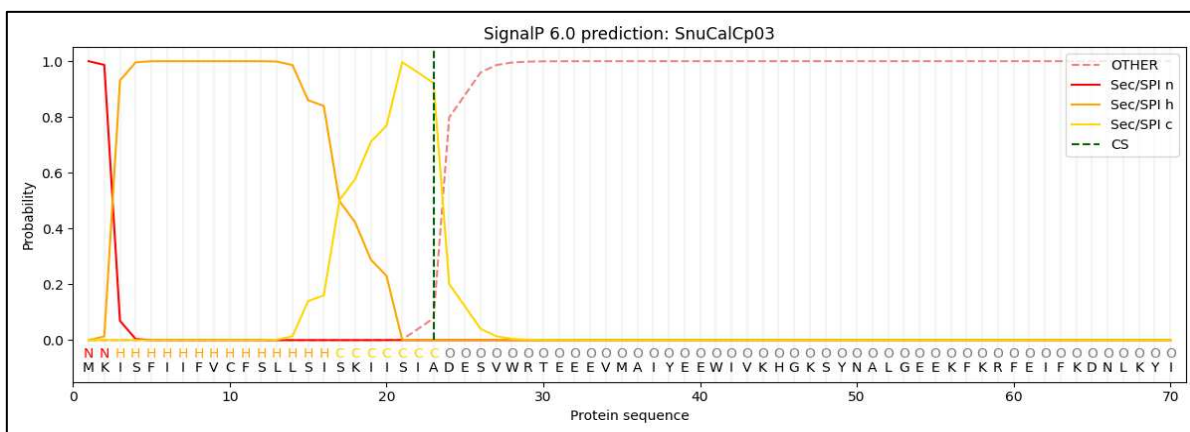
#### Etapa 4 – Estudos de *in silico*

### 6.8 Propriedades bioquímicas e análises estruturais

#### 6.8.1 CpCP3 (*Calotropis procera* cysteine protease 3)

##### 6.8.1.1 Análise da sequência

A partir das sequências gênicas disponibilizadas no trabalho de Kwon *et al.*, o gene SnuCalCp03 corresponde a protease CpCP3 (KWON *et al.*, 2015). A análise da sequência de aminoácidos no SignalP 6.0 indicou que a proteína apresenta um possível peptídeo sinal putativo na região *N*-terminal (Figura 24). Essa região é composta de 23 resíduos de aminoácidos em sua extremidade *N*-terminal, iniciando-se em Met<sup>1</sup> e terminando em Ala<sup>23</sup>. A predição da sequência primária do peptídeo sinal foi fundamental na projeção das etapas posteriores, visto que pode ser removido para modelar a proteína em sua forma mais real no ambiente celular.



**Figura 24:** Predição do peptídeo sinal na sequência de SnuCalCp03 (CpCP3). Fonte: Elaborado pela autora utilizando o Servidor SignalP 6.0.

A busca por domínios conservados no CDD (*Conserved Domain Database*) com a sequência primária da proteína madura mostrou que SnuCalCp03 (CpCP3) apresenta um propeptídeo denominado Inhibitor\_I29 (número de acesso no CDD: smart00848) referente aos resíduos compreendidos na posição 39 a 95 na região *N*-terminal, seguido por um domínio catalítico denominado Peptidase\_C1 (número de acesso no CDD: pfam00112) referente aos resíduos na posição de 126 a 335. Adicionalmente, as análises no ProtParam revelaram que

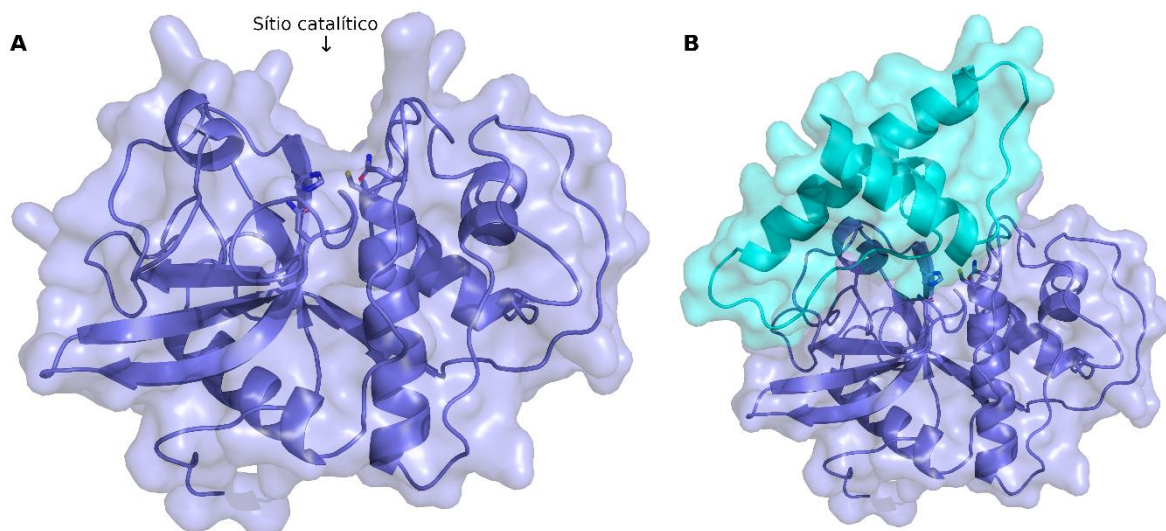
SnuCalCp03 (CpCP3) apresenta ponto isoelétrico e a massa molecular monoisotópica teórica de 7,67 e 39 kDa, respectivamente, sem a presença do peptídeo sinal.

#### 6.8.1.2 Modelagem da estrutura tridimensional

A modelagem da estrutura tridimensional de CpCP3 foi realizada utilizando a sequência da proteína sem o peptídeo sinal, sem o propeptídeo e com o propeptídeo (Figura 25). O modelo gerado apresentou alto grau de confiabilidade, conforme indicado pelos valores de *Predicted Local Distance Difference Test* (pLDDT), que ultrapassaram o valor de 90 para a maior parte da estrutura. Segundo os critérios do AlphaFold3, valores de pLDDT superiores a 90 indicam regiões estruturalmente bem definidas e altamente confiáveis, enquanto valores entre 70 e 90 podem representar regiões de menor estabilidade ou flexibilidade conformacional (ABRAMSON *et al.*, 2024). A análise do mapa de confiança revelou que as regiões centrais da proteína, particularmente aquelas associadas aos resíduos catalíticos, exibiram elevada previsibilidade, sugerindo que a conformação dessa área é bem definida.

A qualidade do modelo estrutural avaliada pelo QMEAN4, uma métrica que compara o modelo gerado com estruturas cristalográficas depositadas no PDB, foi 0,94, indicando alta qualidade estrutural. Na avaliação utilizando o MolProbity, o Clashscore obtido foi 2,46, indicando que a estrutura apresenta poucos choques estéricos em comparação com outras proteínas cristalográficas de resolução semelhante. A análise de rotâmeros mostrou que 99,43% dos resíduos estão em conformações favorecidas. Além disso, o MolProbity score foi 1,03, o que indica uma excelente qualidade geométrica. Não foram identificadas ligações ruins, desvios significativos ou ângulos inadequados, sugerindo que a estrutura modelada é altamente confiável e estável. A análise do gráfico de Ramachandran revelou que 98,1% (206/210) dos resíduos estavam localizados em regiões favorecidas, enquanto 100% (210/210) dos resíduos estavam em regiões permitidas. Esses valores sugerem que a estrutura modelada apresentou uma conformação bem definida e estavelmente dobrada, indicando alta confiabilidade do modelo gerado. Dessa forma, o modelo gerado foi considerado adequado para análises estruturais subsequentes de docking molecular com substratos selecionados.

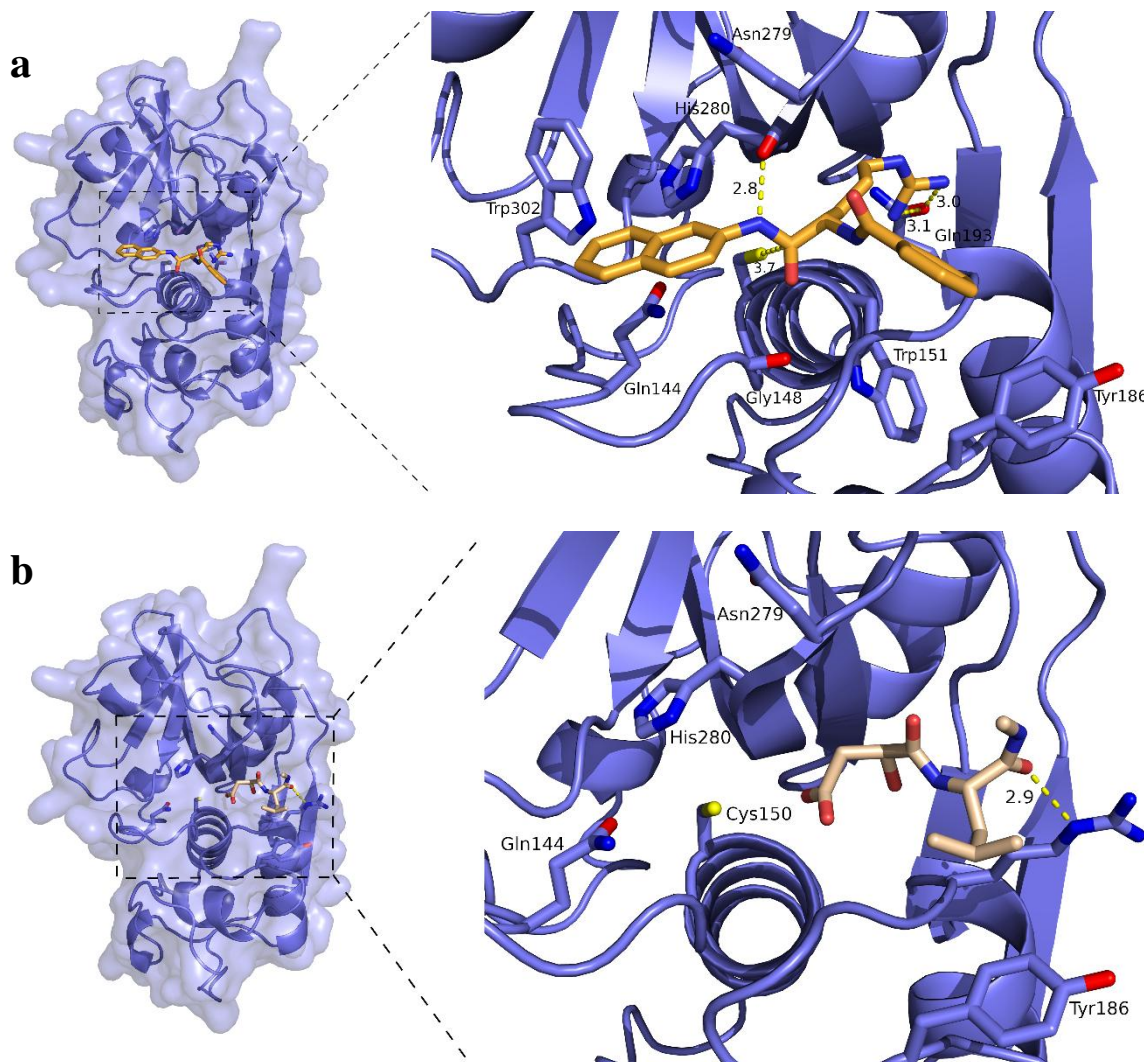




**Figura 25:** Estrutura tridimensional de CpCP3. a) estrutura de CpCP3 sem o propeptídeo, b) estrutura de CpCP3 ligada ao propeptídeo. Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Pymol.

#### 6.8.1.3 Docking molecular

Para entender melhor os tipos de interações que os inibidores e substratos estabelecem com a estrutura de CpCP3 e procurando estudar a possível geometria que esses ligantes adquirem durante essas ligações, foram realizadas análises de docking molecular utilizando os substratos BANA e E-64 (Figura 26). O docking foi conduzido com a estrutura modelada pelo AlphaFold3 e validado pelo redocking com o inibidor E-64, cuja estrutura complexada com uma protease da mesma família (proceraina: 8JCQ) já estava disponível no Protein Data Bank (PDB). O substrato BANA, por não possuir uma estrutura previamente cristalizada, foi utilizada sua conformação disponível no PubChem.



**Figura 26:** Disposições dos ligantes BANA e E-64. a) disposição das interações entre CpCP3 e BANA, b) disposição das interações entre CpCP3 e E-64. Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software PyMol.

Como mostrado na Figura 26a, o substrato sintético BANA (representado em amarelo) foi corretamente inserido no sítio ativo da protease CpCP3, com seu anel aromático posicionado de maneira favorável para interações adjacentes. A análise retornou 50 poses e todas foram analisadas. As distâncias observadas para as interações estão dentro dos valores esperados para interações estáveis entre proteína e ligante, sugerindo um encaixe adequado do substrato na cavidade ativa da protease. Os resíduos Trp<sup>151</sup>, Trp<sup>302</sup> e Tyr<sup>186</sup> foram identificados como pontos de contato importantes, auxiliando na estabilização do ligante. Os resíduos Trp<sup>151</sup> e Trp<sup>302</sup> parecem estabelecer interações  $\pi$ - $\pi$  com o anel aromático do ligante, contribuindo para a o reconhecimento molecular e estabilidade do complexo enzimático. Essa interação pode facilitar o posicionamento adequado do substrato no sítio ativo, favorecendo seu reconhecimento pela enzima e potencialmente influenciando a afinidade de ligação. Além

disso, o empilhamento  $\pi$ - $\pi$  pode auxiliar na orientação precisa do substrato para a clivagem catalítica, reforçando a importância dessas interações na especificidade enzimática. O Tyr<sup>186</sup> provavelmente atua como um ponto adicional de reconhecimento do substrato pela enzima. A interação estabelecida entre Gln<sup>193</sup> e o ligante (3.1 Å e 3.0 Å) também pode indicar um possível envolvimento na estabilização do complexo enzimático. A interação estabelecida entre o resíduo Cys<sup>150</sup> e o ligante (3.7 Å) está coerente com aquele esperado para uma protease cisteínica da família C1, sugerindo um reconhecimento apropriado do substrato pela enzima e atividade catalítica favorecida (CHIRGWIN; PARSONS; NOLTMANN, 1975; WAKABAYASHI *et al.*, 1978). Foram identificadas pontes de hidrogênio entre His<sup>280</sup> e o ligante (2.8 Å), resultado também coerente com aquele disponível na literatura, visto que esse resíduo participa diretamente do mecanismo catalítico, auxiliando na estabilização do substrato durante a hidrólise. Assim, todas as possíveis interações indicadas no encaixe molecular entre a proteína e o ligante reforçam a estabilidade do complexo e confiança do experimento, de modo que os dados obtidos corroboram com aqueles descritos na literatura para essa classe de enzimas.

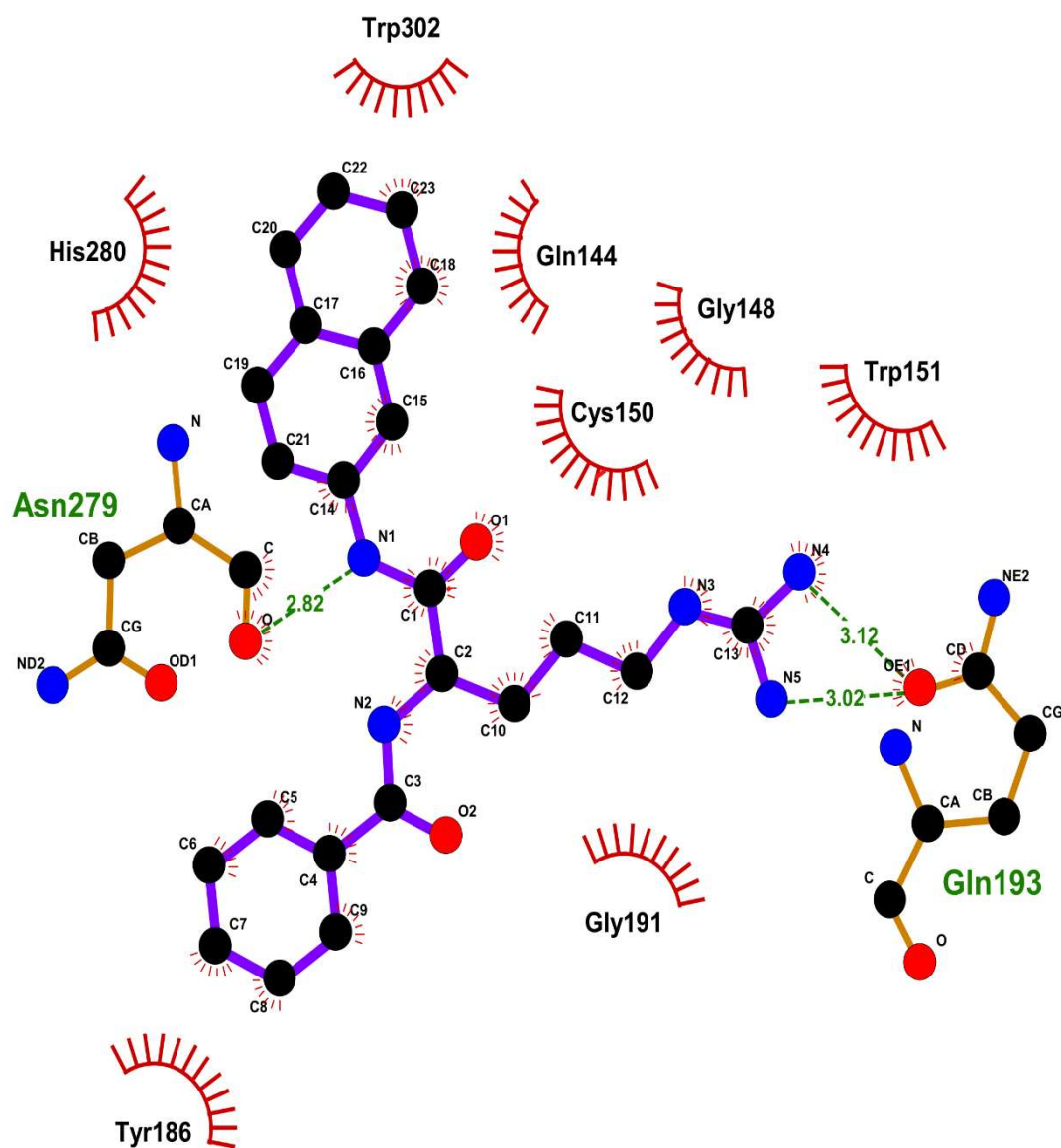
O docking molecular realizado entre a CpCP3 e o inibidor E-64 (Figura 26b) revelou interações fundamentais que indicam alto grau de afinidade e especificidade pelo sítio ativo da enzima. A análise estrutural demonstrou que o E-64 se acomoda de maneira precisa nesse sítio, sugerindo que sua ligação ocorre de forma estável e eficiente. A visualização espacial evidenciou que o inibidor está orientado de maneira favorável para interagir com os principais resíduos catalíticos da protease, indicando um possível mecanismo de inibição irreversível. Dentre as interações observadas, destaca-se a possível ligação direta entre Cys<sup>150</sup> e o E-64, estabelecendo uma interação essencial com o resíduo catalítico da enzima. Com base na disposição desses resíduos, o resultado obtido no encaixe sugere um possível mecanismo de inibição covalente, em concordância com dados previamente descritos na literatura para essa classe de inibidores e nas respectivas posições (MATSUMOTO *et al.*, 1999). Além disso, a interação Arg<sup>192</sup> – E-64 (2.9 Å) pode contribuir para a estabilização do complexo enzima-inibidor, favorecendo um encaixe firme do E-64 no sítio ativo. O resíduo His<sup>280</sup> aparentemente desempenha um papel crucial na estabilização da interação proteína-ligante, reforçando a especificidade da inibição. Resíduos adicionais, como Gln<sup>144</sup> e Asn<sup>279</sup>, podem atuar indiretamente na acomodação do inibidor dentro do sítio ativo, enquanto Tyr<sup>186</sup> parece estar envolvido na estabilização hidrofóbica do E-64 no ambiente catalítico. A proximidade do inibidor com Cys<sup>150</sup>, resíduo essencial para a hidrólise do substrato, sugere que a inibição ocorre

por um bloqueio direto do sítio ativo, impedindo o acesso a substratos naturais da enzima. Esses achados corroboram com os mecanismos de inibição já descritos para essa classe de enzimas, reforçando a especificidade do E-64 como inibidor de proteases cisteína.

Esses resultados reforçam a confiabilidade do modelo e sugere que a região identificada no docking corresponde ao sítio ativo funcional da enzima. Os valores de RMSD do E-64 quando comparado com a estrutura cristalizada foi de 1.061 Å, o que indica uma reprodução precisa da pose do ligante cristalizado. Valores de RMSD abaixo de 2.0 Å são geralmente considerados aceitáveis para validação do protocolo de docking (THAKUR *et al.*, 2024). Para o BANA, que foi gerado a partir de sua estrutura no PubChem (sem referência cristalográfica), apresentou um RMSD de 1.765 Å. Embora esse valor seja um pouco maior que o observado para E-64 (1.061 Å), ele ainda está dentro dos limites considerados aceitáveis para esse tipo de modelagem. Isso sugere que, apesar da ausência de uma estrutura cristalográfica para o BANA, a modelagem foi bem-sucedida e o complexo gerado é confiável para a análise das interações proteína-ligante. No entanto, como a enzima foi travada para se aproximar da conformação do cocrystal com E-64, isso pode ter influenciado a previsão da interação com BANA, já que não há uma estrutura cristalográfica de referência para esse ligante. Ainda assim, a similaridade dos resíduos envolvidos na interação sugeriu que a modelagem foi bem-sucedida e que o complexo gerado é confiável para a análise das interações proteína-ligante.

#### 6.8.1.4 Análise das Interações Proteína-Ligante pelo LigPlot+

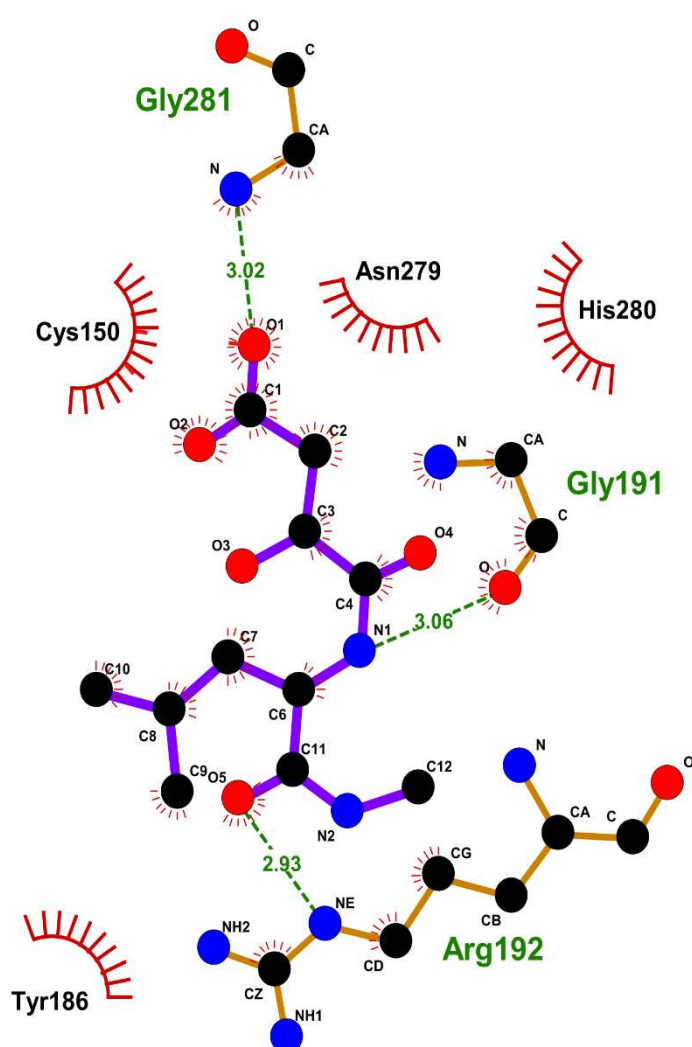
Para complementar a análise estrutural do docking molecular, foi utilizada a ferramenta LigPlot<sup>+</sup>, um software amplamente empregado na bioinformática para a visualização bidimensional das interações entre proteínas e ligantes. A análise realizada gerou representações esquemáticas que evidenciam a contribuição de cada resíduo na estabilização dos ligantes dentro do sítio ativo da enzima. Essas representações são essenciais para compreender a afinidade e seletividade dos ligantes, fornecendo informações valiosas para a interpretação dos resultados do docking. Nas Figuras 27 e 28, são apresentados os mapas de interações gerados, onde é possível observar os resíduos críticos que participam da interação e as forças intermoleculares predominantes na estabilização dos complexos.



**Figura 27:** Interações proteína-ligante geradas pelo LigPlot<sup>+</sup> entre BANA-CpCP3, destacando os resíduos envolvidos nas interações estabelecidas. Fonte: Elaboradas pelo autor utilizando o software LigPlot<sup>+</sup>.

A visualização das interações intermoleculares por meio do software LigPlot<sup>+</sup> revelou que o substrato BANA estabelece três pontes de hidrogênio principais: uma com Asn<sup>279</sup>, a uma distância de 2.82 Å, e duas com Gln<sup>193</sup>, a 3.02 Å e 3.12 Å. Essas interações são essenciais para o posicionamento adequado do substrato no sítio ativo, favorecendo sua estabilização e possível hidrólise enzimática. Além das pontes de hidrogênio, os resíduos Trp<sup>302</sup> e Trp<sup>151</sup> possivelmente formam interações  $\pi$ - $\pi$ , dados em acordo com o docking anterior. O aminoácido Tyr<sup>186</sup> possivelmente interage com regiões apolares do substrato, enquanto os resíduos polares e de superfície, como Gln<sup>144</sup>, Gly<sup>148</sup> e Gly<sup>191</sup>, podem estabelecer interações de van der Waals e outros tipos de interações, auxiliando na estabilidade do complexo. A presença dos resíduos

pertencente ao sítio catalítico como Cys<sup>150</sup> (3.02 Å) e His<sup>280</sup> nas proximidades do substrato reforça o posicionamento adequado do BANA para a catálise, visto que esses são elementos-chave da díade catalítica de proteases cisteínicas (ELSÄSSER; GOETTIG, 2021b). A energia de ligação obtida no docking molecular ( $-6.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) confirma a forte interação entre BANA e CpCP3, sugerindo uma afinidade significativa do substrato pela enzima. Essas interações complementam os resultados obtidos no encaixe molecular, reforçando a ideia de que o BANA está firmemente acomodado no sítio ativo, favorecendo um reconhecimento eficiente e possivelmente aumentando a especificidade enzimática.



**Figura 28:** Interações proteína-ligante geradas pelo LigPlot<sup>+</sup> entre E-64 e CpCP3, destacando os resíduos envolvidos nas interações estabelecidas. Fonte: Elaboradas pelo autor utilizando o software LigPlot<sup>+</sup>.

A análise das interações entre o inibidor irreversível E-64 e CpCP3 evidenciou que o inibidor possivelmente se acomoda de maneira favorável no sítio ativo da protease,

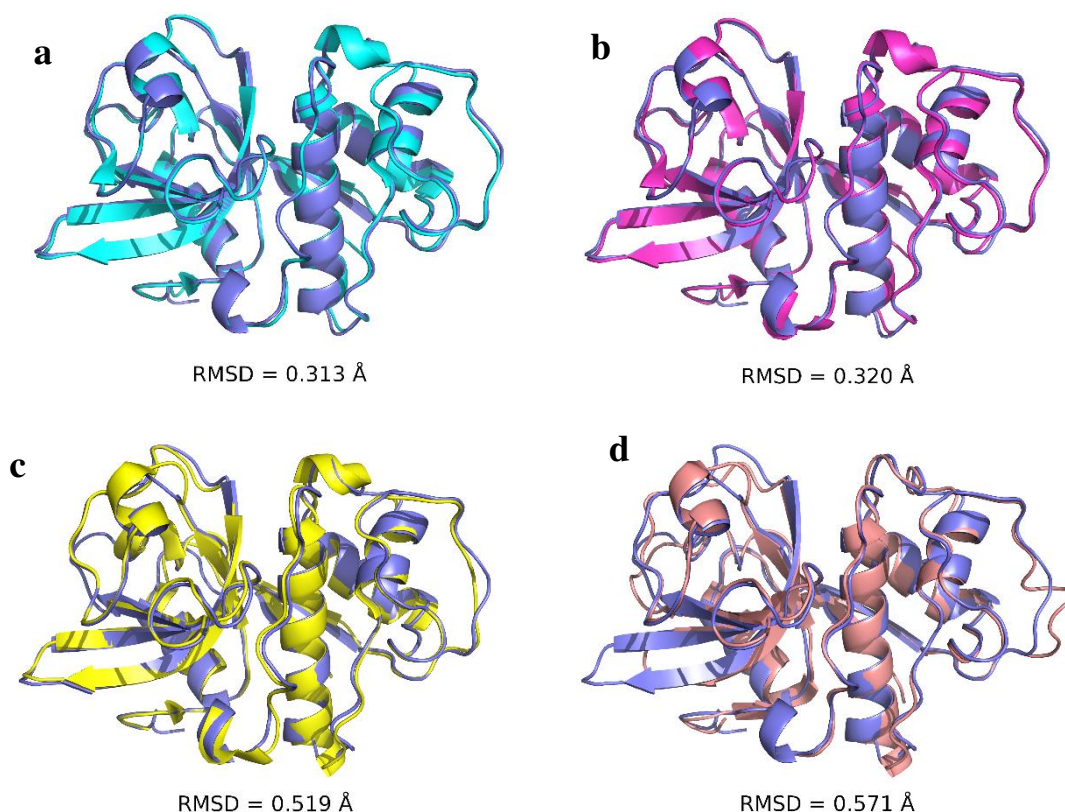


estabelecendo interações específicas que justificam sua alta afinidade e mecanismo de inibição. O resíduo Cys<sup>150</sup>, essencial para a catálise enzimática, possivelmente interage diretamente com o carbono C2 do E-64, formando uma ligação covalente. Esse resultado está de acordo com a aquele disponível na literatura (MATSUMOTO et al., 1999). Essa interação é característica do mecanismo irreversível de inibição, impedindo a regeneração do sítio ativo e resultando na inativação completa da enzima. Além da ligação covalente, o inibidor estabelece três pontes de hidrogênio principais com resíduos próximos ao sítio catalítico, auxiliando na sua estabilização, sendo eles Gly<sup>281</sup> (3.02 Å) que possivelmente contribui para a fixação do inibidor, Gly<sup>191</sup> (3.06 Å) que ajuda a posicionar o E-64 no sítio ativo e Arg<sup>192</sup> (2.93 Å) reforçando o ancoramento do inibidor à enzima. Ainda de acordo com a literatura, os resíduos Gln<sup>281</sup> e His<sup>280</sup> interagem diretamente com o oxigênio da carbonila do E-64, estabilizando sua posição e fortalecendo o bloqueio da atividade enzimática (MATSUMOTO *et al.*, 1999). Essas interações são essenciais para garantir o alinhamento correto do inibidor dentro do sítio ativo, maximizando sua eficiência inibitória. Além disso, o resíduo Tyr<sup>186</sup> possivelmente contribui com interações hidrofóbicas, favorecendo o encaixe de E-64. Asn<sup>279</sup> e His<sup>280</sup> possivelmente também participam da estabilização do complexo, reforçando a especificidade do inibidor para essa classe de proteases, além da participação direta de His<sup>280</sup> na reação catalítica.

Essas análises reforçam que a modelagem forneceu ótimas estruturas, bem como o encaixe molecular foi bem-sucedido na predição das interações proteína-ligante, fornecendo informações detalhadas sobre os resíduos envolvidos e permitindo a comparação com dados experimentais da literatura.

#### 6.8.1.5 *Análise comparativa da estrutural tridimensional por sobreposição estrutural*

Para avaliar a similaridade estrutural da protease modelada com outras enzimas da mesma família, foi realizada uma sobreposição estrutural utilizando as proteínas papaína (9PAP), proceraina (8JCQ), proceraina (8JCR) e proceraina B (8JCS) como referência (Figura 29).



**Figura 29:** Sobreposição de CpCP3 com as estruturas cristalizadas da papaína, proceraina e proceraina B. a) sobreposição com proceraina (8JCQ), b) sobreposição com proceraina (8JCR), c) sobreposição com proceraina B (8JCS) e d) sobreposição com papaína (9PAP).

Essas proteínas pertencem a classe de proteases cisteínicas, compartilhando o mesmo mecanismo de catálise enzimática, tornando-as modelos adequados para comparação. Os resultados demonstraram uma elevada similaridade estrutural entre a protease modelada e as proteínas de referência, sugerindo uma conservação significativa da arquitetura do sítio ativo e do dobramento global da proteína. A análise quantitativa revelou que as estruturas sobrepostas apresentaram um baixo RMSD, considerando que valores abaixo de 2.0 Å são geralmente considerados aceitáveis (THAKUR *et al.*, 2024), indicando desta forma uma variação mínima entre os modelos e reforçando a robustez da predição estrutural realizada pelo AlphaFold3.

A conservação dos principais resíduos catalíticos nas estruturas comparadas reforça a hipótese de que a protease estudada compartilha mecanismos de reconhecimento de substrato e atividade catalítica semelhantes aos das proteínas de referência. Essa similaridade estrutural sugere que a enzima segue um padrão funcional já estabelecido para as proteases cisteínicas, fortalecendo a validade do modelo gerado. Além disso, a análise de sobreposição estrutural não apenas confirma a confiabilidade do modelo predito, mas também corrobora as interações



observadas no docking molecular, demonstrando coerência com o comportamento dessas enzimas amplamente caracterizadas na literatura. Dessa forma, os dados obtidos fornecem um suporte robusto para a funcionalidade da protease e sua relação com outras da mesma família.

## 6.9.2 CpCP3 recombinantes

### 6.9.2.1 Análise das sequências

As análises no ProtParam revelaram que as proteínas recombinantes TrxA, GST e NusA\_CpCP3 apresentam ponto isoelétrico e a massa molecular monoisotópica teórica distintas (Tabela 4). Esse resultado é consistente, pois as moléculas foram expressas a partir de diferentes construções, refletindo suas particularidades estruturais e bioquímicas. Essas características podem influenciar a estabilidade, solubilidade e desempenho das proteínas em experimentos subsequentes.

**Tabela 4** – Propriedades bioquímicas das proteínas de fusão

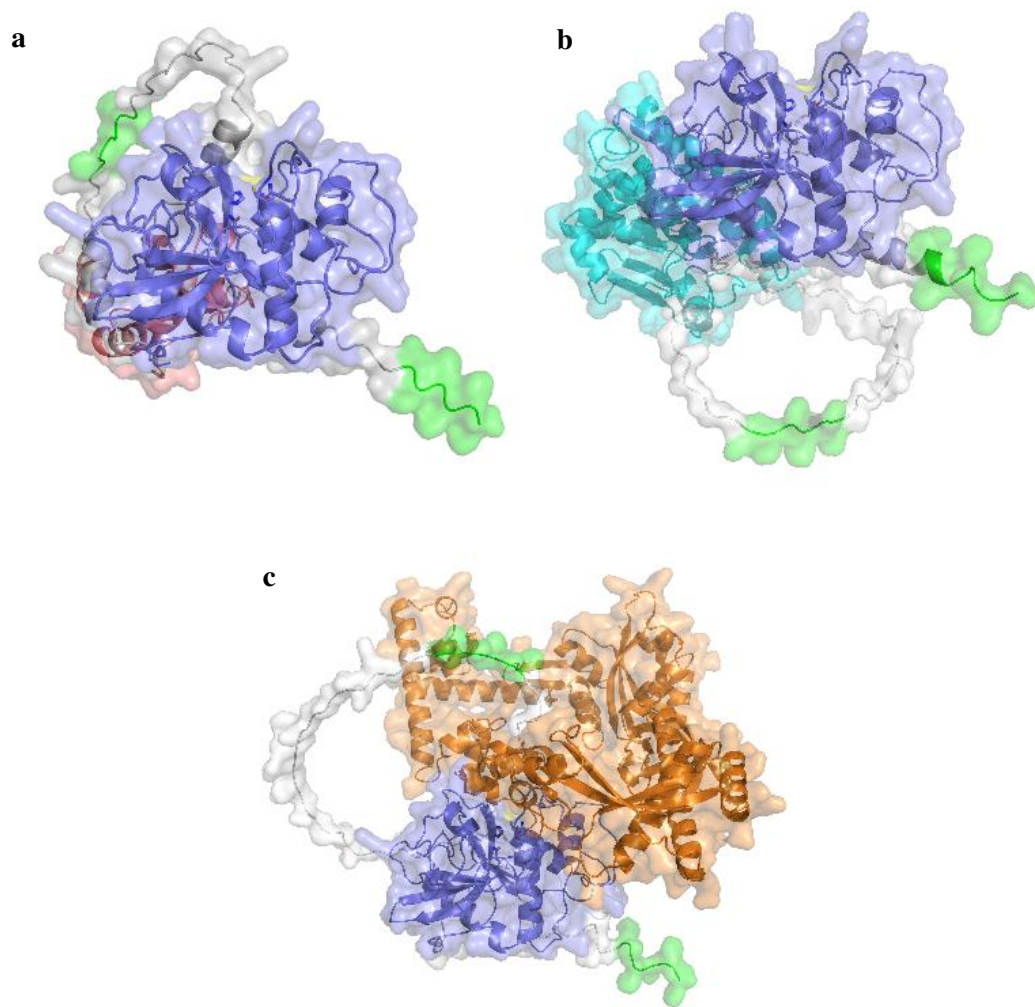
Proteína	Ponto isoelétrico	Massa molecular (kDa)
TrxA_CpCP3	7,02	42,9
GST_CpCP3	7,91	57,7
NusA_CpCP3	5,17	85,9

Fonte: Elaborado pela autora.

A busca por domínios conservados no CDD (*Conserved Domain Database*) com a sequência da proteína nas diferentes construções mostrou que todas as sequências possuem codificação para o domínio catalítico denominado Peptidase\_C1 (número de acesso no CDD: pfam00112), precedido pelas respectivas *tags* de fusão.

### 6.9.2.2 Modelagem da estrutura tridimensional

A modelagem da proteína contendo as *tags* de fusão também foi realizada seguindo o mesmo protocolo utilizado para CpCP3 (Figura 30). A estrutura resultante foi submetida à validação nos mesmos servidores (QMEAN e MolProbity), permitindo avaliar possíveis alterações estruturais decorrentes da adição das *tags*.



**Figura 30:** Estrutura tridimensional das proteínas recombinantes. a) TrxA\_CpCP3, b) GST\_CpCP3 e c) NusA\_CpCP3. Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software PyMol.

A análise do pLDDT revelou que a confiança preditiva das estruturas permaneceram alta ( $pLDDT > 90$ ) para a região catalítica da protease, sugerindo que o núcleo estrutural da enzima foi preservado independentemente da *tag* utilizada. A presença das *tags* não comprometeram significativamente a conformação global da proteína, mantendo-se uma boa porcentagem de resíduos em regiões favorecidas no gráfico de Ramachandran. No entanto, foram observadas diferenças na distribuição de regiões desordenadas e na flexibilidade das *tags*, especialmente em torno da fenda catalítica. Essas diferenças possivelmente podem influenciar a eficiência do dobramento da proteína e sua estabilidade durante a expressão proteica.

As modelagens indicam que as *tags* TrxA e GST se posicionam adjacentes à estrutura principal de CpCP3, enquanto as caudas de histidina aparecem como regiões mais

expostas. Já a *tag* NusA, por sua vez, está localizada sobre o sítio catalítico, o que poderia dificultar o acesso do substrato e reduzir a eficiência catalítica da enzima. Mas, embora as *tags* e as caudas de histidina favoreçam a solubilidade e a purificação da proteína, elas também podem restringir movimentos conformacionais essenciais, afetando a flexibilidade estrutural e a acessibilidade ao sítio ativo. Dependendo do posicionamento, essas modificações estruturais podem interferir na função biológica da proteína, alterando sua interação com substratos ou inibidores.

Vale destacar que a modelagem não reflete a dinâmica real da proteína em solução, mas fornece uma estimativa da disposição espacial das proteínas de fusão. A baixa atividade enzimática observada nos ensaios experimentais pode estar associada a interferências estruturais causadas pela presença da *tag*. Além disso, a ineficiência na purificação pode ser resultado de uma exposição inadequada da cauda de histidina. Dessa forma, estudos de dinâmica molecular seriam necessários para confirmar essas hipóteses.

## 7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível expressar de forma heteróloga a protease CpCP3 de *Calotropis procera* em *Escherichia coli* e avaliar sua funcionalidade por meio de diferentes abordagens bioquímicas e bioinformáticas. A expressão da proteína recombinante apresentou desafios significativos, especialmente relacionados à solubilidade e purificação. A incorporação de ureia a 8 M em pH 12,5 no tampão de lise mostrou-se uma estratégia eficaz para solubilizar a proteína, permitindo sua recuperação na fração solúvel. Os experimentos de purificação revelaram que a proteína recombinante sofreu possíveis processos de autodegradação, o que dificultou sua obtenção. A análise da cromatografia de exclusão molecular indicou a presença de fragmentos menores, reforçando a hipótese de degradação proteolítica. Esses achados destacam a necessidade de otimizar as condições de purificação e utilizar inibidores de protease para minimizar a degradação da proteína recombinante.

Os ensaios de atividade enzimática demonstraram que a CpCP3 recombinante foi capaz de degradar substratos proteicos, confirmando sua funcionalidade. No entanto, a baixa atividade observada com BANA sugere que a conformação estrutural da proteína pode influenciar sua especificidade por diferentes substratos. No entanto, a proteína de fusão NusA\_CpCP3 foi a mais eficiente para manter a proteína na forma solúvel e funcional, conforme evidenciado pelos ensaios de zimografia e digestão de BSA.

As análises bioinformáticas complementaram os estudos experimentais, proporcionando uma visão detalhada da estrutura tridimensional da protease e de suas interações com substratos e inibidores. A modelagem da estrutura pelo AlphaFold3, aliada ao docking molecular, confirmou a conservação do sítio catalítico e a capacidade da enzima em interagir com ligantes específicos. A sobreposição estrutural com outras proteases cisteínicas, como papaína e proceraina, reforçou a similaridade da CpCP3 com proteínas da mesma família, corroborando sua função enzimática.

Em conjunto, os resultados deste estudo fornecem informações importantes sobre a viabilidade da expressão heteróloga da CpCP3 e sua funcionalidade enzimática. As dificuldades encontradas na purificação ressaltam a complexidade envolvida na obtenção de proteases recombinantes e a necessidade de estratégias aprimoradas para garantir a estabilidade e a integridade da proteína. As análises *in silico* demonstraram coerência com os dados experimentais, reforçando o potencial biotecnológico da CpCP3 para futuras aplicações.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONAIM, M. F.; ABO-ELYOUSR, K. A. M.; MORSY, K. M. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). **Crop Protection**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 185–191, 2011.
- ABRAMSON, J.; ADLER, J.; DUNGER, J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. **Nature** **630**, [s. l.], p. 493–500, 2024.
- AL SULAIBI, M. A. M.; THIEMANN, C.; THIEMANN, T. Chemical Constituents and Uses of *Calotropis Procera* and *Calotropis Gigantea* – A Review (Part I – The Plants as Material and Energy Resources). **Open Chemistry Journal**, [s. l.], v. 7, n. 1, 17 abr., 2020.
- ALLIEGRO, M. C. Effects of Dithiothreitol on Protein Activity Unrelated to Thiol–Disulfide Exchange: For Consideration in the Analysis of Protein Function with Cleland’s Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 282, n. 1, p. 102–106, 2000.
- ARAÚJO, E. S. **Látex de *Plumeria rubra* L. (jasmim): perfil protéico, caracterização enzimática e ação contra insetos**. 2009. f 90. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- ARGÜELLO-GARCÍA, R.; CARRERO, J. C.; ORTEGA-PIERRES, M. G. Extracellular Cysteine Proteases of Key Intestinal Protozoan Pathogens-Factors Linked to Virulence and Pathogenicity. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 16, p. 12850, 2023.
- BATISTA, J. D. L. **Produção de proteínas recombinantes inspiradas no adesivo do ouriço do mar e sua adesão a diferentes substratos**. 2020. 64 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2020.
- BHATWA, A.; WANG, W.; HASSAN, Y. I.; ABRAHAM, N.; LI, X. Z.; ZHOU, T. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 10 fev. 2021.
- CHIRGWIN, J. M.; PARSONS, T. F.; NOLTMANN, E. A. Mechanistic implications of the pH independence of inhibition of phosphoglucose isomerase by neutral sugar phosphates. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 250, n. 18, p. 7277–7279, 25 set. 1975.
- COSTA, F. R. DA. **Caracterização e purificação parcial de proteases de *Ulomoides dermestoides* (Coleptera, Tenebrionidae)**. 2014. f 60. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- DAVID, F. T.; SÁNCHEZ, D. A.; FERREIRA, M. L. Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review. **ChemistryOpen**, v. 11, n. 3, p. e202200017, 14 mar. 2022.

- DE MARCO, V.; STIER, G.; BLANDIN, S.; DE MARCO, A. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 322, n. 3, p. 766–771, 24 set. 2004.
- DHILEEPAN, K. Prospects for the classical biological control of *Calotropis procera* (Apocynaceae) using coevolved insects. **Biocontrol Science and Technology**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 977–998, 2 set. 2014.
- DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. Occurrence and Properties of Proteases in Plant Latices. **Planta Medica**, [s. l.], v. 74, n. 7, p. 699–711, jun. 2008.
- EBERHARDT, J.; SANTOS-MARTINS, D.; TILLACK, A. F.; FORLI, S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 61, n. 8, p. 3891–3898, 23 ago. 2021.
- ELSÄSSER, B.; GOETTIG, P. Mechanisms of Proteolytic Enzymes and Their Inhibition in QM/MM Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 3232, 22 mar. 2021.
- ELSÄSSER, B.; GOETTIG, P. Mechanisms of Proteolytic Enzymes and Their Inhibition in QM/MM Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 3232, 22 mar. 2021.
- ESMAILI, I.; MOHAMMAD SADEGHI, H. M.; AKBARI, V. Effect of buffer additives on solubilization and refolding of reteplase inclusion bodies. **Research in Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 413–421, out. 2018.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Á. D.; STAEL, S.; VAN BREUSEGEM, F. Mechanisms controlling plant proteases and their substrates. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1047–1058, abr. 2023.
- FRANGIONI, J. V.; NEEL, B. G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 210, n. 1, p. 179–187, 1993.
- FREGNAN, F.; MURATORI, L.; BASSANI, G. A.; CROSIO, A.; BIAGIOTTI, M.; VINCOLI, V.; CARTA, G.; PIERIMARCHI, P.; GEUNA, S.; ALESSANDRINO, A.; FREDDI, G.; RONCHI, G. Preclinical Validation of SilkBridge™ for Peripheral Nerve Regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, 7 ago. 2020.
- FREITAS, C. D. T.; LEITE, H. B.; OLIVEIRA, J. P. B.; AMARAL, J. L.; EGITO, A. S.; VAIRO-CAVALLI, S.; LOBO, M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; RAMOS, M. V. Insights into milk-clotting activity of latex peptidases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. **Food Research International**, [s. l.], v. 87, p. 50–59, 1 set. 2016.
- FREITAS, C. D. T. et al. Insights into milk-clotting activity of latex peptidases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. **Food Research International**, [s. l.], v. 87, p. 50–59, 1 set. 2016.
- FREITAS, C. D. T.; SILVA, R. O.; RAMOS, M. V.; PORFÍRIO, C. T. M. N.; FARIAS, D. F.; SOUSA, J. S.; OLIVEIRA, J. P. B.; SOUZA, P. F. N.; DIAS, L. P.; GRANGEIRO, T. B.

Identification, characterization, and antifungal activity of cysteine peptidases from *Calotropis procera* latex. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 169, p. 112163, 1 jan. 2020.

FREITAS, D. C.; ZAMBELLI, R. A.; RAMOS, M. V.; OLIVEIRA, J. P. B.; SOUZA, P. F. N.; SANTOS, G. B. M.; NAGANO, C. S.; BEZERRA, L. P.; SILVA, A. F. B.; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D. T. Latex peptidases produce peptides capable of delaying fungal growth in bread. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 373, n. Pt A, p. 131410, 30 mar. 2022.

FREITAS, C. D. T. DE. **Proteínas do látex de *Calotropis procera* (Ait.)R.Br. e seus efeitos sobre pragas agrícolas**. 2006. 118 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Coordenação do Programa de pós-graduação em Bioquímica Vegetal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

HARA, K. Y.; YAGI, S.; HIRONO-HARA, Y.; KIKUKAWA, H. A Method of Solubilizing and Concentrating Astaxanthin and Other Carotenoids. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 462, 16 ago. 2021.

HASSAN, L. M.; GALAL, T. M.; FARAHAT, E. A.; EL-MIDANY, M. M. The biology of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. **Trees: Structure and Function**, Berlin, v. 29, n. 2, p. 311–320, 1 abr. 2015.

JÄGER, V. D.; LAMM, R.; KÜSTERS, K.; ÖLÇÜCÜ, G.; OLDIGES, M.; JAEGER, K. E.; BÜCHS, J.; KRAUSS, U. Catalytically-active inclusion bodies for biotechnology—general concepts, optimization, and application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 104, n. 17, p. 7313–7329, 1 set. 2020.

JURRUS, E.; ENGEL, D.; STAR, K.; MONSON, K.; BRANDI, J.; FELBERG, L. E.; BROOKES, D. H.; WILSON, L.; CHEN, J.; LILES, K.; CHUN, M.; LI, P.; GOHARA, D. W.; DOLINSKY, T.; KONECNY, R.; KOES, D. R.; NIELSEN, J. E.; HEAD-GORDON, T.; GENG, W.; KRASNY, R.; WEI, G. W.; HOLST, M. J.; MCCAMMON, J. A.; BAKER, N. A. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 112–128, 2018.

KAUR, A.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; CHAUHAN, B. S. An Overview of the Characteristics and Potential of *Calotropis procera* From Botanical, Ecological, and Economic Perspectives. **Frontiers In Plant Science**, [s. l.], v. 12, 17 jun. 2021.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 106, p. 803–822, 1 jan. 2018.

KHADKA, D. B.; PAHADI, T.; ARYAL, S.; KARKI, D. B. Partial purification and characterization of protease extracted from kinema. **Heliyon**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. e27173, 27 fev. 2024.

KHAN, J. M.; MALIK, A.; AHMED, A.; REHMAN, M. T.; ALAJMI, M. F.; KHAN, R. H.; FATIMA, S.; ALAMERY, S. F.; ABDULLAH, E. M. Effect of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) on the conformation of a hen egg white lysozyme: A spectroscopic and molecular docking study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 219, p. 313–318, 5 ago. 2019.

KIELKOPF, C. L.; BAUER, W.; URBATSCH, I. L. Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins by Immobilized Metal Affinity Chromatography. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.], v. 2020, n. 6, p. 102194, 6 jan. 2020a.

KIELKOPF, C. L.; BAUER, W.; URBATSCH, I. L. Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins by Immobilized Metal Affinity Chromatography. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.], v. 2020, n. 6, p. 102194, 1 jun. 2020b.

KUMAR DUBEY, V.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 62, n. 7, p. 1057–1071, 2003.

KUMAR, V. L.; GURUPRASAD, B.; FATMI, S. M. A.; CHAUDHARY, P.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA-FILHO, J. V. M.; RAMOS, M. V. In Vivo Efficacy of Latex from *Calotropis procera* in Ameliorating Fever—Biochemical Characteristics and Plausible Mechanism. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 182, n. 3, p. 1229–1239, jul. 2017.

KWON, C. W.; PARK, K. M.; KANG, B. C.; KWEON, D. H.; KIM, M. D.; SHIN, S. W.; JE, Y. H.; CHANG, P. S. Cysteine Protease Profiles of the Medicinal Plant *Calotropis procera* R. Br. revealed by de novo transcriptome analysis. **PloS One**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e0119328, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 24 out. 2011.

LIMA, S. D. F. **Produção de proteínas recombinantes através de um novo sistema de fusão em *Escherichia coli***. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica, [s. l.], 2013.

LOPÉZ, L. M. I.; VIANA, C. A.; ERRASTI, M. E.; GARRO, M. L.; MARTEGANI, J. E.; MAZZILLI, G. A.; FREITAS, C. D. T.; ARAÚJO, Í. M. S.; DA SILVA, R. O.; RAMOS, M. V. Latex peptidases of *Calotropis procera* for dehairing of leather as an alternative to environmentally toxic sodium sulfide treatment. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 1391–1398, set. 2017.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 7 nov. 2008.

LOUGHRAN, S. T.; BREE, R. T.; WALLS, D. Poly-Histidine-Tagged Protein Purification Using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 2699, p. 193–223, 2023.

LUKESH, J. C. I.; PALTE, M. J.; RAINES, R. T. A Potent, Versatile Disulfide-Reducing Agent from Aspartic Acid. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 134, n. 9, p. 4057–4059, 7 mar. 2012.

MAKSUM, I. P.; YOSUA, Y.; NABIEL, A.; PRATIWI, R. D.; SRIWIDODO, S.; SOEDJANAATMADJA, U. M. S. Refolding of bioactive human epidermal growth factor



from *E. coli* BL21(DE3) inclusion bodies & evaluations on its in vitro & in vivo bioactivity. **Heliyon**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. e09306, 18 abr. 2022.

MARTINEZ-CASTILLO, M.; RAMÍREZ-RICO, G.; SHIBAYAMA, M.; DE LA GARZA, M.; SERRANO-LUNA, J. Lactoferrin and Lysozyme Inhibit the Proteolytic Activity and Cytopathic Effect of *Naegleria fowleri* Enzymes. **Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 44, 3 jan. 2024.

MATSUMOTO, K.; MIZOUE, K.; KITAMURA, K.; TSE, W. C.; HUBER, C. P.; ISHIDA, T. Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. **Biopolymers**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 99–107, 1999.

MÜHLMANN, M.; FORSTEN, E.; NOACK, S.; BÜCHS, J. Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 220, 28 nov. 2017.

NAKAKURA, N.; HIETTER, H.; VAN DORSSELAER, A.; LUU, B. Isolation and structural determination of three peptides from the insect *Locusta migratoria*: Identification of a deoxyhexose-linked peptide. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 204, n. 1, p. 147–153, fev. 1992.

NASCIMENTO, A. S. F. DO. **Lectinas recombinantes das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux e *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) M. Howe: produção heteróloga e caracterização bioquímica**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

NOGUEIRA, B. L.; VIEIRA, F. DE A.; GRANGEIRO, T. B. Cysteine Peptidases of *Calotropis procera* (Apocynaceae): A Literature Review on their Biochemical Properties and Potential Applications. **Current Protein & Peptide Science**, [s. l.], 24 dez. 2024.

OLIVEIRA, J. P. B.; CANDREVA, A. M.; RIZZO, G.; RAMOS, M. V.; OLIVEIRA, J. S.; OLIVEIRA, H. D.; ARY, M. B.; DOCENA, G.; FREITAS, C. D. T. Allergenicity reduction of cow's milk proteins using latex peptidases. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 284, p. 245–253, 30 jun. 2019.

OLIVEIRA, J. P. B.; NASCIMENTO, Y. A. P.; AMORIM, K. P. S.; GONÇALVES, L. R. B.; FREITAS, L. B. N.; SILVA, A. F. B.; FERREIRA, O. P.; RAMOS, M. V.; SOUZA, P. F. N.; OLIVEIRA, J. S.; NETO, N. A. S.; MENDONÇA, L. G.; ZAMBELLI, R. A.; FREITAS, C. D. T. Use of *Calotropis procera* cysteine peptidases (CpCPs) immobilized on glyoxyl-agarose for cheesemaking. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 403, 2023.

OLIVEIRA, R. S.; FIGUEIREDO, I. S.; FREITAS, L. B.; PINHEIRO, R. S.; BRITO, G. A.; ALENCAR, N. M.; RAMOS, M. V.; RALPH, M. T.; LIMA-FILHO, J. V. Inflammation induced by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 61, n. 7, p. 689–698, 1 jul. 2012.

PETUSHKOVA, A. I.; SAVVATEEVA, L. V.; ZAMYATNIN, A. A. Structure determinants defining the specificity of papain-like cysteine proteases. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 20, p. 6552–6569, 1 jan. 2022.

POST, C. B.; RAY, W. J. JR. Reexamination of induced fit as a determinant of substrate specificity in enzymic reactions. **Biochemistry**, [s. l.], v. 34, n. 49, p. 15881–15885, 12 dez. 1995.

RABELO, A. C. S.; NORATTO, G.; BORGHESI, J.; SOUZA FONSECA, A.; CANTANHEDE FILHO, A. J.; COSTA CARNEIRO, F. J.; ABREU-SILVA, A. L.; MIGLINO, M. A. *Calotropis procera* (Aiton) Dryand (Apocynaceae): State of the art of its uses and Applications. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 23, p. 2197–2213, 2023.

RAMOS, M. V.; BANDEIRA GDE, P.; DE FREITAS, C. D.; NOGUEIRA, N. A.; ALENCAR, N. M.; DE SOUSA, P. A.; CARVALHO, A. F. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 101, p. 503–510, ago. 2006.

RAMOS, M. V.; PEREIRA, D. A.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D.; CAVALHEIRO, M. G.; MATOS, M. P.; CARVALHO, A. F. Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: evidence for the involvement of proteolytic activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 104, p. 805–812, set. 2009.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; JUCÁ, T. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; VASCONCELOS, I. M.; MOREIRA, R. A.; VIANA, C. A.; BELTRAMINI, L. M.; PEREIRA, D. A.; MORENO, F. B. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 58, p. 211–219, jul. 2013a.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; JUCÁ, T. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; VASCONCELOS, I. M.; MOREIRA, R. A.; VIANA, C. A.; BELTRAMINI, L. M.; PEREIRA, D. A.; MORENO, F. B. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 58, p. 211–219, 1 jul. 2013b.

RAMOS, M. V.; DE ALENCAR, N. M.; DE OLIVEIRA, R. S.; FREITAS, L. B.; ARAGÃO, K. S.; DE ANDRADE, T. A.; FRADE, M. A.; BRITO, G. A.; DE FIGUEIREDO, I. S. Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 389, n. 7, p. 747–756, 2016.

RATHER, J. A. *et al.* A comprehensive review on gelatin: understanding impact of the sources, extraction methods, and modifications on potential packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 34, p. 100945, 1 dez. 2022.

RAWAT, A. *et al.* Cysteine proteases: battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 249, p. 126784, ago. 2021.

RAWDKUEN, S.; JAIMAKREU, M.; BENJAKUL, S. Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 136, n. 2, p. 909–916, 15 jan. 2013.

RAWLINGS, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. D1, p. D624–D632, 4 jan. 2018a.

RAWLINGS, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. D1, p. D624–D632, 4 jan. 2018b.

RIGUERO, V. *et al.* Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1629, p. 461505, 11 out. 2020.

SAHER, U. *et al.* Soluble laticifer proteins from *Calotropis procera* as an effective candidates for antimicrobial therapeutics. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 103659, 1 jun. 2023.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 3. ed. Nova York. 2001.

SILVA, M. Z. R. *et al.* Biotechnological potential of a cysteine protease (CpCP3) from *Calotropis procera* latex for cheesemaking. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 307, p. 125574, 1 mar. 2020.

SILVEIRA, L. L. **Purificação e Caracterização de Protease com Atividade Colagenolítica produzida por *Actinomadura* sp.** 2015. f 60. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015. masterThesis. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/17038>>. Acesso em: 9 fev. 2025.

SINGH, A. N. *et al.* Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 399–406, 1 mar. 2010.

SINGH, A. N. *et al.* Glutaraldehyde-activated chitosan matrix for immobilization of a novel cysteine protease, procerain B. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 11, p. 6256–6262, 8 jun. 2011.

SOARES DE OLIVEIRA, J. *et al.* In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 1563–1573, 1 dez. 2007.

SOUZA, D. P. *et al.* Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Planta**, [s. l.], v. 234, n. 1, p. 183–193, 1 jul. 2011.

SRIVASTAVA, G. *et al.* Autoproteolysis of Procerain and Procerain B mediated by structural changes. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 196, p. 113086, 1 abr. 2022.

TAVARES, L. S. *et al.* Perspectives for the use of latex peptidases from *Calotropis procera* for control of inflammation derived from *Salmonella* infections. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 171, p. 37–43, 28 fev. 2021.

THAKUR, M. *et al.* Integrated quantum chemical calculations, predictive toxicity assessment, absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity profiling and molecular docking analysis to unveil the therapeutic potential of non-oxovanadium(IV) and organotin(IV) complexes targeting breast cancer cells. **International Journal of Quantum Chemistry**, [s. l.], v. 124, n. 13, p. e27438, 2024.

WADHWANI, B. *et al.* A review on phytochemical constituents and pharmacological potential of *Calotropis procera*. **RSC Advances**, [s. l.], v. 11, n. 57, p. 35854–35878, 4 nov. 2021.

WAKABAYASHI, S. *et al.* Amino acid sequences of two ferredoxins from pokeweed, *Phytolacca americana*. **Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 1305–1319, maio 1978.

YILDIZ, A.; KARA, A. A.; ACARTÜRK, F. Peptide-protein based nanofibers in pharmaceutical and biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 148, p. 1084–1097, 1 abr. 2020.

## ANEXO A – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

296

Current Protein &amp; Peptide Science, 2025, 26, 296-307

## REVIEW ARTICLE

Cysteine Peptidases of *Calotropis procera* (Apocynaceae): A Literature Review on their Biochemical Properties and Potential ApplicationsBeatriz Leite Nogueira<sup>1</sup>, Filipe de Abreu Vieira<sup>1</sup> and Thalles Barbosa Grangeiro<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; <sup>2</sup>Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

**Abstract:** The latex of the xerophytic plant *Calotropis procera*, popularly known as giant milkweed, contains a complex mixture of secondary metabolites and proteins and has attracted the attention of many researchers. Several bioactive laticifer enzymes from *C. procera* have been studied for their potential applications in the medical, agricultural and food industries. The present work aimed to review the current scientific knowledge on cysteine peptidases from the latex of this plant, highlighting their biochemical properties and possible uses as biotechnological tools. Bibliographic databases (PubMed, Scopus and Web of Science) were searched for scientific works published in the last six decades reporting the purification, biochemical characterization, molecular cloning and potential applications of laticifer cysteine peptidases from *C. procera*. Since the first works published in the late 1960s on the occurrence of thiol peptidases in this species, five cysteine peptidases (procerain, procerain B, CpCP-1, CpCP-2 and CpCP-3) have been purified and biochemically characterized. The characterized enzymes are members of the subfamily C1A of sulfhydryl proteases, showing the characteristic biochemical and structural features of papain and related proteins. Several biological activities of the purified enzymes have been demonstrated, including the inhibition of phytopathogenic fungi and milk coagulation properties, which may be of practical use. Moreover, pharmacologically active propeptides released from the posttranslational processing of *C. procera* cysteine peptidase zymogens have been shown to be promising therapeutic agents against cancer cells. Further research is needed to provide a better comprehensive understanding of the mode of action and biosafety of these molecules.

## ARTICLE HISTORY

Received: July 15, 2024  
Revised: September 23, 2024  
Accepted: September 27, 2024DOI:  
10.2174/0113892037340497241024095749**Keywords:** Latex, cysteine peptidases, *Calotropis procera*, purification, biochemical properties, potential applications.

## 1. INTRODUCTION

Peptidases are ubiquitous enzymes that catalyze the cleavage of peptide bonds, releasing amino acids or peptides from proteins or large peptides. These enzymes are also referred to as proteolytic enzymes, proteinases and proteases. Peptidases are found in all three domains of life as well as in viruses, representing a significant proportion of the encoded proteins in most organisms [1]. In the human genome, for example, the MEROPS database (available online at <http://www.ebi.ac.uk/merops/>, accessed on 12 June 2024) catalogs 1,146 genes coding for peptidases and their homologs, which accounts for approximately 4.7% of the human proteome. These enzymes play crucial roles in different biological processes, including digestion of food proteins, protein turnover, DNA repair and cell cycle regulation [2], proteolytic activation cascades [3, 4] (like the blood coagulation pathway, caspase-mediated apoptosis, the complement system,

the matrix metalloproteinase cascade, and the invertebrate prophenoloxidase-activating cascade), cell signaling and signal transduction pathways [5], and processing of polypeptide hormones [6]. Furthermore, extracellular proteases are key factors that contribute to the virulence of pathogenic bacteria, fungi and protozoans [7-9].

On the basis of the nature of the catalytic residue, peptidases are broadly classified into seven catalytic types: aspartic peptidases (catalytic type A according to the MEROPS database), cysteine peptidases (catalytic type C), serine peptidases (catalytic type S), metallopeptidases (catalytic type M), threonine peptidases (catalytic type T), glutamic peptidases (catalytic type G) and asparagine peptide lyases (catalytic type N). To reflect their evolutionary relationships, peptidases are assigned to families of homologous amino acid sequences, and families sharing similar three-dimensional structures are grouped into clans or superfamilies [10]. Cysteine peptidases constitute a major and complex type of peptidase, being classified into 125 families (C1 to C125), and most of which grouped into 11 clans (CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO, CP, CQ and CR). The largest clans of cysteine peptidases are CA and CD. The clan CA includes 46 families of peptidases with a papain-like fold (clan CA, fami-

\* Address correspondence to this author at the Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil and Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;  
E-mail: [thalles@ufc.br](mailto:thalles@ufc.br)