

Comparação da atividade entomotóxica dos peptídeos recombinantes derivados das ureases de *Canavalia ensiformis* e *Glycine max*.



Laprotex

www.ufrgs.br/laprotex

Camila Kehl Dias¹, Célia Regina Carlini^{2,3}

¹Acadêmica de Biomedicina-UFRGS ²Instituto do Cérebro-PUCRS

³Departamento de Biofísica, Centro de Biotecnologia-UFRGS

Introdução

Ureases são metaloenzimas níquel-dependentes, que catalisam a hidrólise de ureia a amônia e dióxido de carbono. A leguminosa *Canavalia ensiformis* apresenta três isoformas de urease: JBU, JBUre-II e Canatoxina. Inicialmente descrito para Canatoxina, ureases apresentam atividade entomotóxica devido à liberação de um peptídeo interno de 10 kDa (Peccanatox). Tal liberação é mediada pela ação hidrolítica de catepsinas presentes no sistema digestório de insetos suscetíveis. Baseado na sequência N-terminal do Peccanatox, um peptídeo análogo, denominado Jaburetox, obtido a partir da sequência da JBUre-II, foi clonado e expresso em *Escherichia coli*. Este peptídeo apresentou amplo espectro de ação contra insetos. Tendo como molde a sequência da urease ubíqua de soja (*Glycine max*), um peptídeo recombinante equivalente ao Jaburetox foi clonado em *E. coli*. Este peptídeo foi denominado Soyuretox, apresentando atividade antifúngica contra as leveduras *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* e contra os fungos filamentosos *Penicillium herquei* e *Curvularia lunata*, e nematocida para *Meloidogyne javanica*, quando superexpresso em raízes de soja. O objetivo do trabalho foi determinar a ação inseticida do Soyuretox, para comparar com a atividade já descrita do Jaburetox.

Materiais e Métodos

Otimização da expressão por Metodologia de Superfície de Resposta

Um planejamento fatorial 2^2 com 11 condições experimentais e três repetições de ponto central, foi desenvolvido de modo a encontrar as condições ótimas de expressão do Soyuretox. Sendo assim, nas condições experimentais foram variadas: a concentração do indutor IPTG e temperatura, no processo de indução. A concentração de IPTG aplicada variou de 0,1 mM a 1 mM e a temperatura, de 18 °C a 37 °C. Para avaliar a condição em que houve maior expressão de Soyuretox, um protocolo de extração, purificação e análise por SDS-PAGE foi efetuado. Nesta análise por SDS-PAGE a absorbância das bandas de expressão do peptídeo em cada condição experimental foi analisada utilizando o programa GelQuantNET.

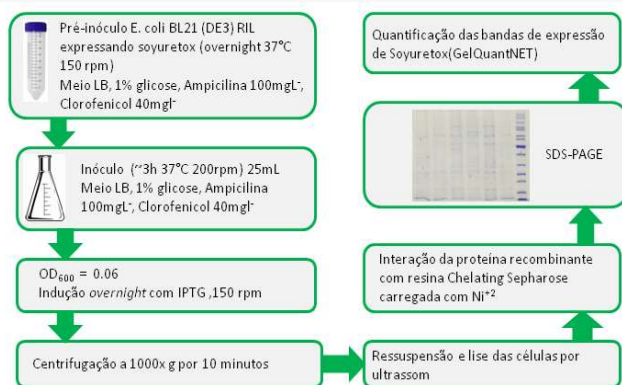


Figura 1: Fluxograma da extração, purificação e análise de Soyuretox.

A Metodologia de Superfície de Resposta foi utilizada para analisar os resultados obtidos do planejamento fatorial (utilizando o software Statistica 8.0) quanto à significância estatística, utilizando a análise de variância (ANOVA). Para obtenção da amostra para os bioensaios foi adicionado como último passo da purificação uma cromatografia de gel-filtração em coluna Superdex 200.

Bioensaios com *Dysdercus peruvianus*

Com intuito de avaliar a atividade entomotóxica do peptídeo serão realizados bioensaios de ingestão por capilares de vidro e injeção de Soyuretox em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,5), em 3 grupos de 5 insetos e outros 3 grupos controle (apenas o tampão) do inseto-manchador-do-algodão, *D. peruvianus*. A taxa de mortalidade dos insetos nos grupos foi registrada 24, 48, 72 e 96 horas após administração da amostra contendo Soyuretox.

Agradecimentos



Resultados e Discussões

A partir dos resultados do planejamento fatorial foram, então, geradas superfícies de contorno e de resposta, que mostraram uma região de ótimo, abrangendo as condições de maior produção de Soyuretox (0,23mM de IPTG e 21 °C). Nesta região de ótimo foram obtidas concentrações do peptídeo recombinante que variam entre 0.9 mgL⁻¹ e 1.1 mgL⁻¹.

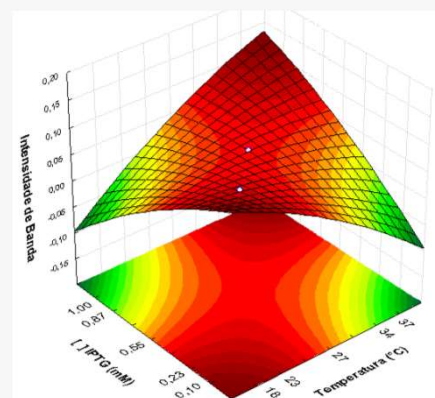


Figura 2: Superfície de Resposta, relaciona temperatura (eixo x), concentração de IPTG (eixo y) e a intensidade de banda de Soyuretox em SDS-Page (eixo z).

Nos bioensaios, os insetos foram monitorados durante 4 dias, após a administração de Soyuretox (por ingestão e por injeção). Ambas formas de administração do peptídeo recombinante foram letais, sendo que a ocorrência de mortalidade foi observada mais rapidamente por injeção.

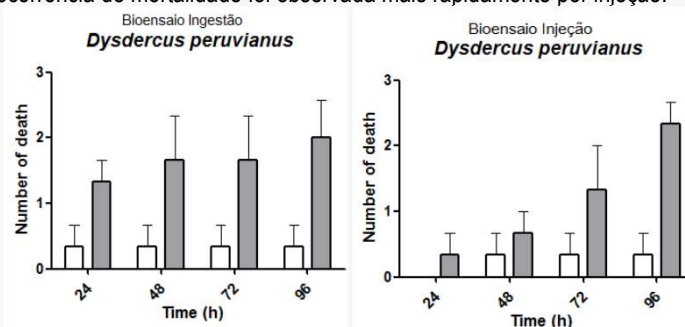


Figura 3: Mortalidade em função do tempo após a ingestão ou injeção de Soyuretox (cinza) ou tampão (branco). Os dados são médias de 3 grupos de 5 insetos, cada. A dose administrada na ingestão foi de 0.085µg de Soyuretox por mg do inseto, e na injeção, 0.05µg de Soyuretox por mg do inseto.

Conclusões

- O R² do planejamento experimental foi de 0.897, que indica correlação forte entre as variáveis avaliadas. Os dados são estatisticamente válidos, com erros de ajustamento independentes e normalmente distribuídos.
- Apenas a relação direta da temperatura e da concentração de IPTG foi estatisticamente significativa para a indução da expressão de Soyuretox.
- Soyuretox apresentou atividade entomotóxica contra *Dysdercus peruvianus*, em dose comparável às descritas para o Jaburetox (Martinelli et al. 2014).

Perspectivas

- Avaliar a entomotoxicidade do peptídeo recombinante Soyuretox em outros modelos de insetos sensíveis ao Jaburetox.