



Evento	Salão UFRGS 2015: SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2015
Local	Porto Alegre - RS
Título	Otimização da expressão e caracterização biológica do peptídeo recombinante Soyuretox derivado da urease de Soja (Glycine max)
Autor	CAMILA KEHL DIAS
Orientador	CELIA REGINA RIBEIRO DA SILVA CARLINI

Título: Otimização da expressão e caracterização biológica do peptídeo recombinante Soyuretox derivado da urease de Soja (*Glycine max*)

Autora: Camila Kehl Dias

Orientadora: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Instituição de Origem: UFRGS

Resumo: Ureases são metaloenzimas dependentes de níquel, que catalisam a hidrólise da ureia a amônia e dióxido de carbono, estando envolvidas na disponibilidade de nitrogênio e em mecanismos de defesa em plantas. A Canatoxina, uma isoforma de urease, isolada da *Canavalia ensiformis* apresenta propriedades entomotóxicas. Esta toxicidade depende da liberação de um peptídeo interno de 10 kDa (Pepcanatox), mediante ação hidrolítica de catepsinas presentes no sistema digestório de insetos susceptíveis. Baseado na sequência N-terminal do Pepcanatox, um peptídeo recombinante denominado Jaburetox foi clonado e expresso em *Escherichia coli*. Jaburetox apresentou um amplo espectro de ação contra insetos, além de atividade tóxica contra fungos fitopatogênicos e de importância médica. Um peptídeo recombinante equivalente ao Jaburetox foi clonado em *E. coli*, utilizando-se a sequência da urease ubíqua de soja (*Glycine max*) como molde. Este peptídeo foi denominado Soyuretox, apresentando 72% de identidade com o Jaburetox. O Soyuretox apresenta atividade antifúngica contra as leveduras *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* e os fungos filamentosos *Penicillium herquei* e *Curvularia lunata*. Apresenta também atividade contra o nematóide *Meloidogyne javanica* em plantas transgênicas de soja, superexpressando o Soyuretox. Diante do exposto, nosso objetivo é otimizar as condições de expressão e avaliar a capacidade entomotóxica do Soyuretox contra os insetos *Rhodnius prolixus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Spodoptera frugiperda*. Um planejamento fatorial 2², com 12 condições experimentais, foi realizado considerando como variáveis a concentração do indutor IPTG (Isopropil β-D-1-tio galactopiranosídeo) e temperatura, no processo de indução e expressão do peptídeo. A concentração de IPTG variou de 0,1 mM a 1 mM e a temperatura de 18 °C a 37 °C. O efeito destas variáveis sobre o rendimento de Soyuretox será avaliado pelo método de Elisa utilizando anticorpo anti-Jaburetox, para quantificação do peptídeo nas diferentes condições experimentais. A Metodologia de Superfície de Resposta será utilizada para análise dos resultados obtidos no planejamento fatorial. Os resultados serão analisados pelo *software* Statistica 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Okla, USA) quanto à sua significância estatística, utilizando análise de Variância (ANOVA). Serão geradas Superfícies de Resposta que nos ajudarão a determinar uma região de ótimo, a qual representa as condições de maior produção de Soyuretox. Posteriormente, serão realizados bioensaios por meio de injeção e ingestão. Os insetos *O. fasciatus* e *R. prolixus* serão injetados na hemocele, utilizando uma seringa Hamilton, com tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,5) contendo diferentes doses do peptídeo Soyuretox, em grupos de 10 insetos para cada dose e um grupo controle injetado apenas com tampão. A taxa de mortalidade será registrada após 48 e 96 h da injeção. Os insetos *R. prolixus* serão também alimentados através de capilares de vidro contendo solução salina de *R. prolixus* e 1 mM de ATP. Serão utilizados grupos de 5 insetos por dose e um grupo controle. A taxa de mortalidade para cada grupo será registrada após 24 horas da alimentação. Para o ensaio com *S. frugiperda*, larvas serão alimentadas em 3 momentos diferentes, com folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em cujas superfícies gotas de 10 µL da solução do Soyuretox serão secas. O grupo controle será alimentado apenas com folhas de feijão que serão secas com 10 µL de solução tampão. A mortalidade no grupo e ganho de peso individual serão medidos diariamente. Os resultados dos bioensaios serão avaliados de modo a caracterizar a entomotoxicidade do peptídeo recombinante Soyuretox e seu potencial biotecnológico como controle de pragas.