

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

GABRIELE VERÔNICA DE MELLO GABRIEL

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES RACIOMÉTRICOS
BIOLUMINESCENTES DE pH E METAIS DIVALENTES BASEADOS NA
ENGENHARIA DA REGIÃO SENSÍVEL AO pH NAS LUCIFERASES DE
VAGALUMES**

São Carlos

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

GABRIELE VERÔNICA DE MELLO GABRIEL

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES RACIOMÉTRICOS
BIOLUMINESCENTES DE pH E METAIS DIVALENTES BASEADOS NA
ENGENHARIA DA REGIÃO SENSÍVEL AO pH NAS LUCIFERASES DE
VAGALUMES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. Vadim R. Viviani

São Carlos

2017




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

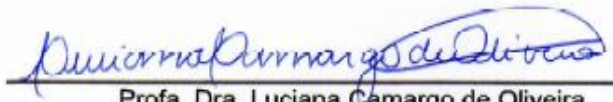
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Gabriele Verônica de Mello Gabriel, realizada em 01/12/2017:



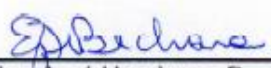
Prof. Dr. Vadim Viviani
UFSCar



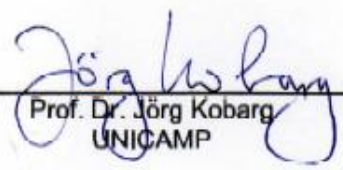
Profa. Dra. Karina Martins
UFSCar



Profa. Dra. Luciana Camargo de Oliveira
UFSCar



Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara
USP



Prof. Dr. Jörg Kobarg
UNICAMP

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2014/04477-9, nº 2015/22603-4 e nº 2016/15946-5; da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho a todas as pessoas que fizeram parte dessa trajetória e que me deram apoio, em especial aos meus pais Reginaldo e Cecília e à minha irmã Nicole.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares que estavam sempre presentes em minhas conquistas, pelo apoio e compreensão, principalmente meu pai Reginaldo Gabriel, minha mãe Maria Cecília M. M. Gabriel e minha irmã Nicole Nanni M. Gabriel.

Ao meu orientador Prof. Dr. Vadim Viviani pela oportunidade, por confiar e permitir a realização desse trabalho e que eu continuasse fazendo parte de seu grupo de pesquisa. Obrigada por colaborar em minha formação profissional e acima de tudo pessoal, pelos conselhos e ensinamentos.

Agradeço ao Dr. Yoshihiro Ohmiya por proporcionar que parte desse trabalho fosse realizada, por acreditar na minha competência e permitir a pesquisa e meu aperfeiçoamento no exterior.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório, em especial Jaqueline R. Silva, Gabriela Oliveira e Danilo T. Amaral pelos ensinamentos, conselhos e conversas.

Aos colegas Dr. Rie Yasuno e Dr. Yasuo Mitani pelas instruções e amizade durante o período que estive no Japão.

A todos os membros dos laboratórios de pesquisa que frequentei no National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) de Tsukuba, Japão; em especial Papawee Suabjakyong e Miho Takahashi.

Aos docentes e secretárias do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) por todo o conhecimento proporcionado e auxílio.

Aos professores, técnicos e funcionários da UFSCar campus de Sorocaba pela colaboração com as atividades do presente projeto.

À FAPESP pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de Doutorado e das bolsas de Estágio e Pesquisa no Exterior (BEPE), e ao CNPq.

RESUMO

Bioluminescência, a emissão de luz fria e visível por organismos vivos é amplamente utilizada em biossensores. Luciferasas de vagalumes e seus genes estão entre os genes repórteres mais utilizados em biossensores bioluminescentes. Luciferasas de vagalumes são sensíveis ao pH, apresentando um deslocamento do espectro de bioluminescência para o vermelho na presença de metais, em temperaturas elevadas e pH ácido, sendo esta última propriedade considerada sem utilidade para a maioria das aplicações analíticas. Atualmente a maioria dos biossensores luminescentes para metais e pH são fluorescentes, poucos deles são ratiométricos baseados nas mudanças espectrais. Biossensores bioluminescentes apesar de serem menos comuns, possuem algumas vantagens como baixo *background* e não necessitam de irradiação com luz UV, não causando fotodanos às células. Os objetivos desse projeto foram: (I) investigar a aplicabilidade de uso da luciferase do vagalume *Macrolampis* sp2 e outras luciferasas pH-sensitivas como biossensor espectral ratiométrico intracelular de pH; (II) aplicar esses biossensores ratiométricos de pH em células de mamíferos para investigar sua fisiologia em tempo real e (III) desenvolver, por engenharia da região sensora de pH da luciferase de *Macrolampis* sp2, um biossensor ratiométrico específico para metais. Obtivemos uma relação entre o pH e a razão da bioluminescência nas regiões do verde e do vermelho do espectro, permitindo estimar ratiometricamente o pH intracelular de bactérias e células de mamíferos. Além disso, confirmamos seu uso para imagem celular de pH, e observamos que ocorre uma alcalinização do citosol e núcleo durante os processos de divisão celular e apoptose. Demonstramos a aplicabilidade das luciferasas de vagalumes, em especial a luciferase de *Macrolampis* sp2, como biossensor ratiométrico para metais e pH intracelular. A existência de uma relação linear entre a concentração de metais como cádmio, mercúrio e zinco, e a razão da bioluminescência nas regiões do verde e do vermelho do espectro, permitiu também estimar ratiometricamente pela primeira vez concentrações de metais menores que 100 μM , possibilitando o uso de luciferase de vagalumes como indicador de biodisponibilidade de metais tóxicos e potencialmente tóxicos.

Palavras-chave: luciferasas de vagalumes, gene repórter, biossensor para metais, biossensor de pH, biossensores bioluminescentes ratiométricos

ABSTRACT

Bioluminescence, the emission of visible light by living organisms is widely used in biosensors. Firefly luciferases and genes are among the most used reporter gene in bioluminescent biosensors. Firefly luciferases are pH-sensitive, exhibiting a red shifted bioluminescence spectra on the presence of metals, high temperatures and acidic pH, being this last property considered unusual for the most analytical applications. Nowadays most luminescent biosensors to metals and pH are fluorescent, and few of them are ratiometric based on spectral changes. Bioluminescent biosensors despite been less common, have same advantages as low background and does not need UV light irradiation, bring no photodamage to the cell. The aim of this project was: (I) study the applicability of the use of *Macrolampis* sp2 firefly luciferase and other pH-sensitive luciferases as spectral intracellular ratiometric pH biosensor; (II) apply these pH ratiometric biosensors in mammalian cells to investigate its physiology in real time and (III) developing, by engineering the pH sensor region of *Macrolampis* sp2 firefly luciferase, a ratiometric biosensor specific to metals. We obtained a relation between the pH and the ratio of the bioluminescence at green and red region of the spectra, allowing estimate ratiometrically the intracellular pH of bacteria and mammalian cells. Besides that, we confirmed its use to cellular image of pH and observed that occurs an alkalization of the cytosol and nucleus during cell division and apoptosis. We demonstrate the applicability of firefly luciferases, in special the luciferase of *Macrolampis* sp2, as a ratiometric biosensor to metals and intracellular pH. The existence of a linear relationship between the concentrations of metals like cadmium, mercury and zinc, and the ratio of the bioluminescence at green and red region of the spectra, allowed also estimate ratiometrically, for the first time, concentrations of metals less than 100 μ M, enabling the use of firefly luciferases as bioavailability indicator to toxic and potential toxic metals.

Key-words: firefly luciferases, reporter gene, metal biosensor, pH biosensor, bioluminescent ratiometric biosensors

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 BIOLUMINESCÊNCIA..... | 1 |
| 1.1.1 Luciferases de Vagalumes: Estrutura e Função | 2 |
| 1.1.2 Determinantes Estruturais da Sensibilidade ao pH em Luciferases de Vagalumes .. | 3 |
| 1.1.3 Luciferase pH-sensitiva de <i>Macrolampis</i> sp2 | 6 |
| 1.2 APLICAÇÕES BIOANALÍTICAS DA BIOLUMINESCÊNCIA | 7 |
| 1.2.1 Luciferases de Interesse Aplicado | 8 |
| 1.3 BIOSSENSORES | 8 |
| 1.3.1 Biossensores Luminescentes | 9 |
| 1.3.1.1 Biossensores bioluminescentes | 9 |
| 1.3.1.1.1 Biossensores bioluminescentes para toxicidade de água | 10 |
| 1.3.2 Biossensores para Metais | 11 |
| 1.3.3 Biossensores de pH Intracelular | 12 |
| 1.4 BIOIMAGEM POR BIOLUMINESCÊNCIA | 14 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 15 |
| 3 OBJETIVOS | 16 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 4.1 EXPRESSÃO, MUTAÇÃO E USO DA LUCIFERASE DE <i>Macrolampis</i> sp2 PARA ESTIMAR O pH E CONCENTRAÇÃO DE METAIS | 17 |
| 4.1.1 Plasmídeos | 17 |
| 4.1.2 Subclonagem do cDNA da luciferase em vetor pCold™ II | 17 |
| 4.1.3 Transformação Bacteriana | 18 |
| 4.1.4 Extração de DNA Plasmidial | 18 |
| 4.1.5 Mutagênese Sítio-Dirigida | 19 |
| 4.1.6 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose | 20 |
| 4.1.7 <i>Screening</i> dos Mutantes | 20 |
| 4.1.8 Sequenciamento de DNA | 20 |
| 4.1.9 Expressão das Luciferases Recombinantes | 21 |
| 4.1.10 Medidas de Atividade da Luciferase <i>in vivo</i> | 21 |
| 4.1.11 Extração das Luciferases Recombinantes | 21 |
| 4.1.12 Purificação da Luciferase por Cromatografia de Afinidade com Matriz de Níquel | 22 |

| | |
|--|----|
| 4.1.13 SDS-PAGE da Luciferase Purificada | 22 |
| 4.1.14 Medidas de Atividade da Luciferase <i>in vitro</i> | 22 |
| 4.1.15 Bioimagem em Câmera CCD | 23 |
| 4.1.16 Espectros de Bioluminescência..... | 23 |
| 4.1.16.1 Efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência | 23 |
| 4.1.16.2 Efeito de metais divalentes nos espectros de bioluminescência | 23 |
| 4.1.16.3 Efeito do pH nos espectros de bioluminescência..... | 24 |
| 4.1.17 Análise Raciométrica dos Espectros de Bioluminescência | 25 |
| 4.1.17.1 Análise raciométrica dos espectros de bioluminescência em diferentes temperaturas | 25 |
| 4.1.17.2 Análise raciométrica dos espectros de bioluminescência com metais..... | 25 |
| 4.1.17.3 Análise raciométrica dos espectros de bioluminescência em diferentes pHs..... | 25 |
| 4.2 EXPRESSÃO DA LUCIFERASE de <i>Macrolampis</i> sp2 E ESTIMATIVA DE pH EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS COS-1 | 26 |
| 4.2.1 Construção dos Plasmídeos Contendo o Gene da Luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2 . | 26 |
| 4.2.2 Transformação Bacteriana | 27 |
| 4.2.3 Seleção dos Clones | 27 |
| 4.2.4 Extração de DNA Plasmidial | 28 |
| 4.2.5 Cultura de Células de Mamíferos | 28 |
| 4.2.6 Transfecção Celular | 28 |
| 4.2.7 Medida em Tempo Real da Bioluminescência em Luminômetro | 29 |
| 4.2.8 Efeito do pH na Cor da Bioluminescência das Células | 29 |
| 4.2.9 Medida da Bioluminescência de uma Única Célula | 30 |
| 4.2.10 Medidas da Cor da Bioluminescência Usando Cellgraph..... | 31 |
| 4.2.11 Espectros de Bioluminescência das Células <i>in vivo</i> | 31 |
| 4.2.12 Análise Raciométrica dos Espectros de Bioluminescência | 31 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 5.1 USO DE LUCIFERASES pH-SENSITIVAS COMO INDICADORES DE pH EM <i>Escherichia coli</i> | 33 |
| 5.1.1 Efeito do pH nas Luciferases pH-Sensitivas..... | 33 |
| 5.1.1.1 Efeito do pH nos espectros de bioluminescência <i>in vitro</i> | 33 |
| 5.1.1.2 Análise raciométrica do pH | 34 |
| 5.1.1.3 Espectros da bioluminescência <i>in vivo</i> de bactérias expressando luciferases pH-sensitivas..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 5.1.1.4 Estimativa ratiométrica de pH intracelular nas bactérias expressando luciferases | 36 |
| 5.1.2 Efeito do Fosfato nos Espectros de Bioluminescência das Luciferases pH-Sensitivas | 37 |
| 5.1.3 Efeito da Temperatura nos Espectros de Bioluminescência da Luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2..... | 38 |
| 5.1.4 Sensibilidade de Detecção do Ensaio Ratiométrico das Luciferases pH-Sensitivas | 39 |
| 5.2 EXPRESSÃO DA LUCIFERASE DE <i>Macrolampis</i> sp2 PARA A DETERMINAÇÃO DE pH EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS | 40 |
| 5.2.1 Atividade da Bioluminescência da Luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2 em Células de Mamíferos..... | 41 |
| 5.2.2 Análise Luminométrica do Efeito do pH na Cor da Bioluminescência <i>in vivo</i> | 41 |
| 5.2.3 Espectro de Bioluminescência <i>in vivo</i> da Luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2 em Células de Mamíferos..... | 42 |
| 5.2.4 Medida Ratiométrica do pH..... | 43 |
| 5.2.5 Imagem da Mudança de pH pela Cor da Bioluminescência em uma Única Célula | 44 |
| 5.2.6 Imagem por Bioluminescência de Variações de pH Intracelular Durante a Divisão Celular e Apoptose..... | 46 |
| 5.3 IDENTIFICAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE METAIS E EMPREGO DAS LUCIFERASES DE VAGALUMES COMO BIOSSENSORES RACIOMÉTRICOS DE METAIS | 52 |
| 5.3.1 Efeito de Metais Divalentes nos Espectros de Bioluminescência das Luciferases pH-Sensitivas | 52 |
| 5.3.2 Identificação do Sítio de Ligação de Metais nas Luciferases de Vagalumes..... | 53 |
| 5.3.2.1 Efeito das mutações N354E e E354N na sensibilidade aos metais | 53 |
| 5.3.3 Desenho de Novos Sítios Sensíveis a Metais na Luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2 | 55 |
| 5.3.3.1 Efeito das mutações nos espectros de bioluminescência e sensibilidade ao pH | 56 |
| 5.3.3.2 Efeito das mutações na atividade das luciferases mutantes..... | 58 |
| 5.3.3.3 Efeito das mutações na sensibilidade espectral aos metais | 59 |
| 5.3.3.3.1 Sensibilidade espectral aos metais..... | 65 |
| 5.3.4 Medida Ratiométrica da Concentração de Metais..... | 67 |
| 5.3.4.1 Comparação das luciferases pH- e metal-sensitivas com outros biossensores luminescentes de pH e metais | 73 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 77 |

| | |
|---|-----------|
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 78 |
| 8 ARTIGOS PUBLICADOS..... | 92 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------|--|
| BRET | Transferência de energia de ressonância por bioluminescência (<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>) |
| CCD | Dispositivo de carga acoplada (<i>Charge-Coupled Device</i>) |
| CHES | Ácido 2-(ciclohexilamino)etanossulfônico |
| CHO | Células derivadas de ovário de hamster chinês (<i>Chinese Hamster Ovary</i>) |
| COS-1 | Linhagem celular de fibroblastos derivadas do tecido de rim de macaco |
| D-MEM | Meio de cultura para células de mamíferos (<i>Dulbecco's Modified Eagle</i>) |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos fosfatados |
| DTT | 1,4-Dithio-D-threitol |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EM-CCD | CCD com multiplicação de elétrons (<i>Electron Multiplying- Charge-Coupled Device</i>) |
| FMNH₂ | Flavina mononucleotídeo |
| GFP | Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>) |
| HEPES | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico |
| IPTG | Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosídeo |
| LB | Luria Bertani (meio de cultura bacteriano) |
| pBl-Mac | cDNA da luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2 inserida no vetor pBlueScript |
| pCold-Mac | cDNA da luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2 inserida no vetor pCold |
| pPro-Mac | cDNA da luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2 inserida no vetor pPro |
| pCMV-Mac:cito | Luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2 com direcionamento ao citosol |
| pCMV-Mac | Luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2 com direcionamento ao peroxissomo |
| pCMV-Mac:NLS | Luciferase de <i>Macrolampis</i> sp2 com direcionamento ao núcleo |
| RLU | Unidades relativas de luz (<i>Relative Light Units</i>) |
| rpm | Rotações por minuto |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Mecanismo da bioluminescência catalisado pelo sistema luciferina-luciferase. Fonte: BRANCHINI *et al.*, 2003..... 02
- Figura 2** Modelo da estrutura tridimensional da luciferase de *Macrolampis* sp2 mostrando o *loop* entre os resíduos 223–235 e a rede de interação com os resíduos E311 e R337: (A) luciferase de *Macrolampis* sp2 mostrando o *loop* 223–235 (verde) e o *loop* 352–361 (magenta) e (B) *zoom* mostrando o *loop* entre os resíduos 223–235, a rede de ligações de hidrogênio e oxiluciferina (amarelo); e (C) *zoom* do modelo tridimensional da luciferase de *C. distinctus* mostrando o resíduo E354 interagindo com o resíduo H310. Adaptado de: VIVIANI *et al.*, 2005; 2008b..... 05
- Figura 3** Efeito do pH no espectro de bioluminescência das luciferases em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 6,0 (preto), pH 7,0 (cinza escuro) e pH 8,0 (cinza claro): (A) *Macrolampis* sp2, (B) *Amydetes vivianii*, (C) *Photinus pyralis* e (D) *Cratomorphus distinctus*. No painel superior em (A) são apresentadas as diferentes cores da bioluminescência *in vitro* em diferentes pHs na luciferase de *Macrolampis* sp2..... 34
- Figura 4** Relação ratiométrica entre R_{pH} ($I_{verde}/I_{vermelho}$) e o pH nas luciferases: (A) *Macrolampis* sp2 e (B) *Cratomorphus distinctus*..... 35
- Figura 5** Espectro de bioluminescência *in vivo* de diferentes luciferases de vagalume em *E. coli*: (A) *Macrolampis* sp2, (B) *Amydetes vivianii* e (C) *Cratomorphus distinctus* a 0 segundos (—), 30 segundos (—), 60 segundos (—), 90 segundos (---) e 120 segundos (---), e (D) cor da bioluminescência de colônias de *E. coli* expressando as luciferases de vagalume após a adição de D-luciferina: (1–4) *Macrolampis* sp2: (1) imediatamente após adição de D-luciferina 1 mM, e após (2) 30 segundos, (3) 60 segundos e (4) 90 segundos; e (5–8) *C. distinctus*: (5) imediatamente após adição de D-luciferina 1 mM, e após (6) 30 segundos, (7) 60 segundos e (8) 90 segundos..... 36
- Figura 6** Efeito dos tampões fosfato de sódio (cinza claro) e Tris-HCl (cinza escuro), ambos na concentração de 0,10 M em pH 8,0, no espectro de bioluminescência das luciferases: (A) *Macrolampis* sp2, (B) *Amydetes vivianii*, (C) *Photinus pyralis* e (D) *Cratomorphus distinctus*..... 38
- Figura 7** Efeito da temperatura no espectro de bioluminescência de *E. coli* expressando a luciferase de *Macrolampis* sp2: (A) efeito da temperatura no espectro de bioluminescência em 5° C (—), 10° C (—), 25° C (---) e 35° C (---), e (B) efeito da temperatura na razão (R) de intensidade da bioluminescência a 563 nm e 616 nm (coeficiente de correlação $\rho = -0,992$)..... 39
- Figura 8** Atividade da bioluminescência na ausência (F0) e presença de corte a 560 nm

- (F1) e 600 nm (F2) de células COS-1 carregando as construções de *Macrolampis* sp2 usando D-luciferina 10 mM..... 41
- Figura 9** Curva padrão ($F1/F0$ e $F2/F0$) de células COS-1 transfectadas com pCMV-Mac:cito em pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. A nigericina foi usada no tampão de calibração e a medida foi realizada durante 10 segundos usando o luminômetro Kronos na ausência ($F0$) e presença de filtros de corte ($F1$ a 560 nm e $F2$ a 620 nm) após adição de D-luciferin 0,10 M durante 1 hora..... 42
- Figura 10** Efeito do pH no espectro de bioluminescência de células COS-1 transfectadas com as construções de *Macrolampis* sp2: (A) pCMV-Mac:cito, (B) pCMV-Mac:NLS e (C) pCMV-Mac usando tampão de calibração contendo nigericina em diferentes pHs (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), e (D) espectro de bioluminescência das construções de *Macrolampis* sp2 (alvos ao citosol, núcleo e peroxissomo) usando tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M..... 43
- Figura 11** Relação ratiométrica de $R = (I_{\text{verde}}/I_{\text{vermelho}})$ e o pH em células COS-1 transfectadas com pCMV-Mac:cito..... 44
- Figura 12** Imagem da bioluminescência de uma única célula COS-1 transfectada com as construções da luciferase de *Macrolampis* sp2 usando Cellgraph com espelho dicróico: (A) pCMV-Mac, (B) pCMV-Mac:cito e (C) pCMV-Mac:NLS. Imagens foram obtidas usando: (A) 3 minutos do tempo de exposição e (B e C) 5 minutos do tempo de exposição com lentes objetivas de 40×..... 45
- Figura 13** Variação da cor da bioluminescência *in vivo* de células COS-1 expressando as construções de *Macrolampis* sp2 pCMV-Mac:cito (painéis da esquerda de A a D) e pCMV-Mac:NLS (painéis da direita de E a H) em diferentes pHs usando o tampão de calibração contendo nigericina: (A e E) pH 6,5; (B e F) pH 7,0; (C e G) pH 7,5 e (D e H) pH 8,0. Imagens obtidas após 2 minutos do tempo de exposição com lentes objetivas 40×..... 46
- Figura 14** Imagem temporal da variação da cor da bioluminescência durante a divisão celular de células COS-1 transfectadas com a construção pCMV-Mac:cito no Cellgraph com o espelho dicróico. Imagens foram obtidas usando o tempo de exposição de 3 minutos em intervalos de 4 minutos com lente objetiva 20×. Na parte superior podemos ver a imagem da bioluminescência das células, seguido da combinação da luminescência com a imagem clara (*merge* das imagens das emissões verde e vermelha) e a imagem clara. Números indicam horas..... 47
- Figura 15** Imagem temporal da variação da cor da bioluminescência durante a divisão celular de células COS-1 transfectadas com a construção pCMV-Mac:NLS no Cellgraph com o espelho dicróico. Imagens foram obtidas usando o tempo de exposição de 3 minutos em intervalos de 4 minutos com lente objetiva 20×. Na parte superior podemos ver a imagem da bioluminescência das células,

- seguido da combinação da luminescência com a imagem clara (*merge* das imagens das emissões verde e vermelha) e a imagem clara. Números indicam horas..... 48
- Figura 16** Imagem temporal da variação da cor da bioluminescência durante a divisão celular de células COS-1 transfectadas com as construções: (A) pCMV-Mac:cito e (B) pCMV-Mac:NLS no Cellgraph com o espelho dicróico. Imagens claras nas colunas à esquerda e bioluminescência nas colunas à direita. Imagens foram obtidas usando o tempo de exposição de 3 minutos em intervalos de 4 minutos com lente objetiva 20×..... 48
- Figura 17** Imagem temporal da variação da cor da bioluminescência durante a apoptose de células COS-1 transfectadas com a construção pCMV-Mac:cito no Cellgraph com o espelho dicróico. Imagens foram obtidas usando o tempo de exposição de 3 minutos em intervalos de 4 minutos com lente objetiva 20×. Na parte superior podemos ver a imagem da bioluminescência das células, seguido da combinação da luminescência com a imagem clara (*merge* das imagens das emissões verde e vermelha) e a imagem clara. Números indicam horas..... 50
- Figura 18** Imagem temporal da variação da cor da bioluminescência durante a apoptose de células COS-1 transfectadas com a construção pCMV-Mac:NLS no Cellgraph com o espelho dicróico. Imagens foram obtidas usando o tempo de exposição de 3 minutos em intervalos de 4 minutos com lente objetiva 20×. Na parte superior podemos ver a imagem da bioluminescência das células, seguido da combinação da luminescência com a imagem clara (*merge* das imagens das emissões verde e vermelha) e a imagem clara. Números indicam horas..... 51
- Figura 19** Efeito de metais divalentes na concentração de 2 mM no espectro de bioluminescência da luciferase de *Macrolampis* sp2: sem adição de metal (preto) e com adição de NiSO₄ (cinza escuro) e ZnSO₄ (cinza claro)..... 53
- Figura 20** Efeito do ZnSO₄ 2 mM (linhas cinzas) nos espectros de bioluminescência das luciferases: (A) *Macrolampis* sp2 selvagem, (B) *Cratomorphus distinctus* selvagem, (C) Crt-E354N e (D) Mac-N354E. Linhas pretas representam o controle negativo..... 54
- Figura 21** Efeito do NiSO₄ 2 mM (linhas cinzas) nos espectros de bioluminescência das luciferases: (A) *Macrolampis* sp2 selvagem, (B) *Cratomorphus distinctus* selvagem, (C) Crt-E354N e (D) Mac-N354E. Linhas pretas representam o controle negativo..... 54
- Figura 22** Efeito do HgCl₂ 2 mM (1 mM em D) (linhas cinzas) nos espectros de bioluminescência das luciferases: (A) *Macrolampis* sp2 selvagem, (B) *Cratomorphus distinctus* selvagem, (C) Crt-E354N e (D) Mac-N354E. Linhas pretas representam o controle negativo..... 55

- Figura 23** Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Macrolampis* sp2 (cinza claro) e do mutante Mac-N354H (cinza escuro) em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 6,0.....56
- Figura 24** Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Macrolampis* sp2 (cinza claro) e do mutante Mac-H310C (cinza escuro) em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 8,0 (A) e pH 6,0 (B)..... 57
- Figura 25** Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Macrolampis* sp2 (cinza claro) e do mutante Mac-N354C (cinza escuro) em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 6,0.....57
- Figura 26** Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Macrolampis* sp2 (cinza claro) e do mutante Mac-H310C/N354C (cinza escuro) em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 8,0 (A) e pH 6,0 (B)..... 58
- Figura 27** Espectros de bioluminescência na presença de diferentes concentrações de ZnSO₄ na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes: (A) selvagem, (B) Mac-N354H, (C) Mac-H310C, (D) Mac-N354C, (E) Mac-H310C/N354C e (F) Mac-N354E..... 59
- Figura 28** Espectros de bioluminescência na presença de diferentes concentrações de NiSO₄ na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes: (A) selvagem, (B) Mac-N354H, (C) Mac-H310C, (D) Mac-N354C e (E) Mac-N354E.....60
- Figura 29** Espectros de bioluminescência na presença de diferentes concentrações de HgCl₂ na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes: (A) selvagem, (B) Mac-N354H, (C) Mac-H310C, (D) Mac-N354C, (E) Mac-H310C/N354C e (F) Mac-N354E..... 61
- Figura 30** Espectros de bioluminescência na presença de diferentes concentrações de CdSO₄ na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes: (A) selvagem, (B) Mac-N354H, (C) Mac-H310C, (D) Mac-N354C, (E) Mac-H310C/N354C e (F) Mac-N354E..... 62
- Figura 31** Espectros de bioluminescência na presença de diferentes concentrações de PbCl₂ na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes: (A) selvagem, (B) Mac-N354H, (C) Mac-H310C, (D) Mac-N354C, (E) Mac-H310C/N354C e (F) Mac-N354E..... 63
- Figura 32** Comparação do efeito dos metais no espectro de bioluminescência da luciferase de *Macrolampis* sp2 em extrato bruto (pPro-Mac) (cinza claro) e purificada (pCold-Mac) (cinza escuro): (A) ZnSO₄ 4 mM, (B) NiSO₄ 4 mM e (C) HgCl₂ 0,5 mM..... 64

- Figura 33** Comparação do efeito de NiSO_4 2 mM (cinza escuro) e 4 mM (cinza claro) nos espectros de bioluminescência da luciferase de *Macrolampis* sp2 com e sem cauda de histidina: (A) pPro (6 His no N-terminal), (B) pBl (sem cauda de histidina) e (C) pCold (6 His no N-terminal). Linhas pretas representam o controle negativo..... 65
- Figura 34** Efeito da concentração do metal (mM) no deslocamento espectral medido em recíproco da variação do comprimento de onda ΔF (cm^{-1}): *Macrolampis* sp2 (azul), Mac-N354H (verde), Mac-H310C/N354C (vermelho) e Mac-N354C (preto)..... 66
- Figura 35** Efeito da concentração de ZnSO_4 na razão das intensidades da bioluminescência no λ_{verde} e $\lambda_{\text{vermelho}}$ ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) usando a luciferase de *Macrolampis* sp2 modificada: (A) selvagem, (B) Mac-N354E, (C) Mac-N354H, (D) Mac-H310C, (E) Mac-N354C e (F) Mac-H310C/N354C. Inseto: intervalo linear da curva..... 68
- Figura 36** Efeito da concentração de NiSO_4 na razão das intensidades da bioluminescência no λ_{verde} e $\lambda_{\text{vermelho}}$ ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) usando a luciferase de *Macrolampis* sp2 modificada: (A) Mac-N354C, (B) Mac-N354E, (C) Mac-N354H, (D) Mac-H310C e (E) selvagem. Inseto em C, D e E: intervalo linear da curva..... 69
- Figura 37** Efeito da concentração de HgCl_2 na razão das intensidades da bioluminescência no λ_{verde} e $\lambda_{\text{vermelho}}$ ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) usando a luciferase de *Macrolampis* sp2 modificada: (A) selvagem, (B) Mac-N354E, (C) Mac-N354H, (D) Mac-H310C, (E) Mac-N354C e (F) Mac H310C/N354C. Inseto em A, B, D, E e F: intervalo linear da curva..... 70
- Figura 38** Efeito da concentração de CdSO_4 na razão das intensidades da bioluminescência no λ_{verde} e $\lambda_{\text{vermelho}}$ ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) usando a luciferase de *Macrolampis* sp2 modificada: (A) selvagem, (B) Mac-N354E, (C) Mac-N354H, (D) Mac-H310C, (E) Mac-N354C e (F) Mac-H310C/N354C. Inseto em A, B, C, D e F: intervalo linear da curva..... 71
- Figura 39** Efeito da concentração de PbCl_2 na razão das intensidades da bioluminescência no λ_{verde} e $\lambda_{\text{vermelho}}$ ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) usando a luciferase de *Macrolampis* sp2 modificada: (A) selvagem, (B) Mac- H310C, (C) Mac-N354H, (D) Mac-H310C/N354C e (E) Mac-N354C. Inseto em A, C e D: intervalo linear da curva..... 72

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOLUMINESCÊNCIA

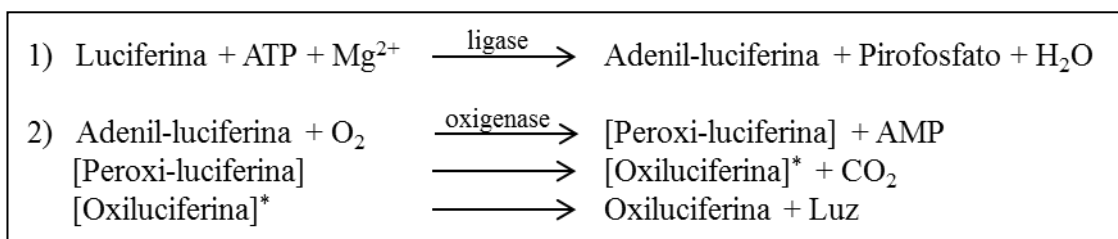
Bioluminescência, emissão de luz fria e visível por organismos vivos, ocorre em diversos organismos, como bactérias, dinoflagelados, anelídeos, celenterados, crustáceos, insetos, entre outros (HASTINGS, 1983). Dentre os insetos, ocorre principalmente entre os dípteros, colêmbolos e coleópteros (HERRING, 1978; VIVIANI, 2002; VIVIANI *et al.*, 2006); sendo que nestes últimos é encontrada especialmente na superfamília Elateroidea (LAWRENCE & NEWTON, 1995), que inclui as famílias de besouros Lampyridae, Phengodidae e Elateridae (CROWSON, 1972).

A bioluminescência é uma forma especial de quimioluminescência biológica catalisada por enzimas chamadas de luciferases encontradas em alguns organismos vivos, a qual resulta na produção de luz visível a outros organismos, sendo útil como meio de comunicação biológica (VIVIANI *et al.*, 2006).

Estudos bioquímicos evidenciaram que as luciferases e as luciferinas possuem composições químicas e estruturas moleculares diferentes, respectivamente, em diversos taxa (HASTINGS, 1983).

Em besouros, a reação bioluminescente catalisada pela enzima luciferase envolve duas etapas: (1) a adenilação da luciferina na presença de Mg^{2+} -ATP, formando adenilato de luciferina (luciferil-AMP como um intermediário ligado à enzima) e pirofosfato, e (2) a oxidação do adenilato de luciferina por oxigênio molecular (O_2) gerando um intermediário peroxídico, que se cliva produzindo dióxido de carbono (CO_2) e oxiluciferina num estado eletronicamente excitado. Um fóton de luz visível é então emitido durante a transição do estado excitado para o estado fundamental (**Esquema 1** e **Fig. 1**) (McELROY & DeLUCA, 1978; WILSON & HASTINGS, 1998).

Esquema 1. Etapas da reação bioluminescente catalisada pelas luciferases de vagalumes. Adaptado de: McELROY & DeLUCA, 1978.



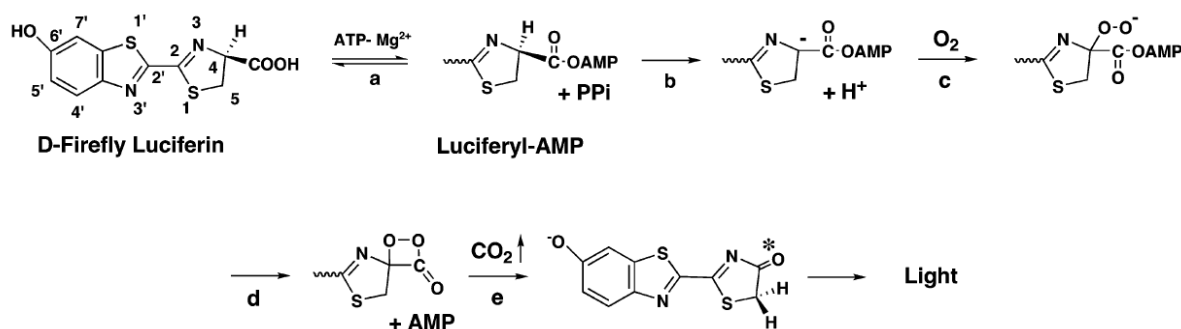


Figura 1. Mecanismo da bioluminescência catalisado pelo sistema luciferina-luciferase. Fonte: BRANCHINI *et al.*, 2003.

1.1.1 Luciferases de Vagalumes: Estrutura e Função

As luciferases de besouros são polipeptídeos de cerca de 540–550 resíduos de aminoácidos, compartilhando de 45% a 99% de identidade a nível de estrutura primária. Elas apresentam um grau de identidade de 60% a 99% dentro da mesma família (WOOD, 1995; UGAROVA & BROVKO, 2002; VIVIANI 2002; BECHARA & VIVIANI, 2015).

Os cDNAs que codificam uma ampla variedade de luciferases das famílias Lampyridae, Elateridae e Phengodidae foram clonados e sequenciados (TATSUMI *et al.*, 1989; 1992; WOOD *et al.*, 1989; KAJIYAMA & NAKANO, 1991; DEVINE *et al.*, 1993; OHMIYA *et al.*, 1995; SALA-NEWBY *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997; VIVIANI *et al.*, 1999a; 1999b; 2004; 2005; 2011; ALIPOUR *et al.*, 2004; BRANCHINI *et al.*, 2006; EMAMZADEH *et al.*, 2006; AMARAL *et al.*, 2012; 2016), as quais emitem luz de diversas cores, dependendo da luciferase, uma vez que a luciferina é a mesma nas três famílias (VIVIANI & BECHARA, 1993).

As estruturas tridimensionais das luciferases de *Photinus pyralis* (CONTI *et al.*, 1996) e *Luciola cruciata* (NAKATSU *et al.*, 2006) foram resolvidas por cristalografia de raios X na ausência e presença de análogos de luciferina e produtos, respectivamente, e resíduos do sítio-ativo foram identificados a partir destas estruturas (BRANCHINI *et al.*, 2003).

A cor da bioluminescência do vagalume é determinada pelo microambiente do sítio-ativo da enzima, sendo que os espectros de bioluminescência podem ser afetados de duas maneiras. Uma delas é por interações específicas que ocorrem dentro do sítio-ativo com a oxiluciferina excitada, que podem controlar processos como tautomerização ceto-enol ou as formas híbridas de ressonância da oxiluciferina (BRANCHINI *et al.*, 2003). Outra maneira é por alterações de sua conformação, as quais também podem afetar a polaridade e interações específicas (VIVIANI *et al.*, 2008b). A conformação “fechada” do sítio-ativo resulta em luminescência verde-amarelada, ao contrário da conformação “aberta”, que promove a

entrada de água no sítio-ativo em baixos pHs, resultando numa luminescência vermelha (NAKATSU *et al.*, 2006; KOKSHAROV & UGAROVA, 2008; VIVIANI *et al.*, 2008b, 2014).

As luciferases de coleópteros são classificadas funcionalmente em pH-sensitivas e pH-insensitivas (VIVIANI & BECHARA, 1995). Nas luciferases pH-sensitivas, que é o caso da luciferase de lampirídeos (ex. *Amydetes vivianii*, *Cratomorphus distinctus*, *Macrolampis* sp2, *P. pyralis*), o espectro de emissão de bioluminescência sofre deslocamento para o vermelho em pH ácido, temperaturas elevadas e/ou na presença de cátions de metais como zinco, chumbo, mercúrio. Já as luciferases pH-insensitivas, que é o caso das luciferases de elaterídeos e fengodídeos (ex. *Phrixothrix vivianii*, *Pyrearinus termitilluminans*), o espectro de bioluminescência não sofre esse deslocamento (VIVIANI & BECHARA, 1995; VIVIANI *et al.*, 1999a, 1999b).

Foi sugerido que as diferentes cores da bioluminescência das luciferases de vagalumes pH-sensitivas podem ser explicadas pelas mudanças na razão entre as duas espécies emissoras, enquanto que nas luciferases pH-insensitivas a mudança de espectros pode ser ocasionada pela mudança do microambiente de apenas uma espécie emissora (VIVIANI *et al.*, 2001; 2008a). De fato, estudos posteriores mostraram que o rendimento quântico da emissão de luz verde diminui com o pH, enquanto que o rendimento quântico de luz vermelha permanece constante (ANDO *et al.*, 2008; NIWA *et al.*, 2010). Entretanto, a identidade dos emissores ainda não está totalmente elucidada. Embora estudos iniciais sugerissem que a forma “ceto” da oxiluciferina excitada emitiria luz vermelha, e a forma “enol” luz verde amarela (WHITE *et al.*, 1968; BECHARA & VIVIANI, 2015), dados experimentais e teóricos sugerem que a forma “ceto” é o único emissor plausível, e que as cores de bioluminescência são moduladas a nível de interações do grupo fenolato (HIRANO *et al.*, 2012, VIVIANI *et al.*, 2013). Portanto, o mecanismo básico para a determinação da cor da bioluminescência não é idêntico entre as luciferases pH-sensitivas e pH-insensitivas (VIVIANI *et al.*, 2001).

1.1.2 Determinantes Estruturais da Sensibilidade ao pH em Luciferases de Vagalumes

Sugeriu-se, por meio da comparação das sequências das luciferases pH-sensitivas e pH-insensitivas, que a sensibilidade ao pH ocorre devido a um sítio-ativo mais flexível, devido à presença de um conjunto de resíduos conservados que difere nestes dois grupos de luciferases. Isso gera duas espécies emissoras, cada uma dependente de uma conformação do

sítio-ativo. Já a insensibilidade ao pH resulta de uma maior rigidez do sítio-ativo, devido à sua maior estabilização (VIVIANI, 2002; VIVIANI *et al.*, 1999b; 2008b).

Alguns *loops* entre resíduos de aminoácidos na estrutura das luciferases têm papel determinante nos espectros de bioluminescência. O *loop* entre os resíduos 223 e 235 tem um papel fundamental na estabilização do sítio-ativo e, conseqüentemente, na determinação das cores da bioluminescência e da sensibilidade ao pH (VIVIANI *et al.*, 2007; 2008a). É o mais longo nas luciferases de besouros, estando localizado na superfície da estrutura tridimensional da luciferase, possuindo algumas substituições dependendo da luciferase. Apesar dele não estar no sítio-ativo da enzima, conecta os subdomínios A e B da luciferase, ajudando a fixar parte do sítio-ativo da luciferase, sendo estabilizado por interações polares e efeito hidrofóbico dos resíduos 227(Y/F/V)G(N/T)229 com resíduos do sítio de ligação da luciferina, e ajuda a manter uma conformação do sítio-ativo “fechada” e hidrofóbica, favorável para a emissão de luz verde (VIVIANI *et al.*, 2008a).

Também foi identificado o *loop* entre os resíduos 352 e 361 como importante para a modulação dos espectros de bioluminescência (WOOD, 1995; VIVIANI *et al.*, 2005). Mutagêneses sítio-dirigidas nesse *loop* evidenciaram a importância dos resíduos E354 (N354 na luciferase de *Macrolampis* sp2) (VIVIANI *et al.*, 2005) e R356 (TAFRESHI *et al.*, 2007) na modulação dos espectros de bioluminescência de diferentes luciferases.

Esses dois *loops* descritos interagem com os resíduos S284/E311/R337 por meio de uma rede de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Uma ponte salina entre E311 e R337 constitui o cerne desta rede de interações, e sugeriu-se que essa rede de interações entre os dois *loops*, E311 e R337 constituam o sensor de pH (**Fig. 2**) (VIVIANI *et al.*, 2008a). Aparentemente, essas interações são propensas a serem desestabilizadas ou enfraquecidas por alterações do pH e da temperatura, modulando as cores da bioluminescência nas luciferases pH-sensitivas. Porém, nas luciferases pH-insensitivas, elas são mais fortemente estabilizadas pelas interações hidrofóbicas com os resíduos 227 e 229 citados anteriormente, contribuindo para essa insensibilidade ao pH (VIVIANI *et al.*, 2007; 2008a).

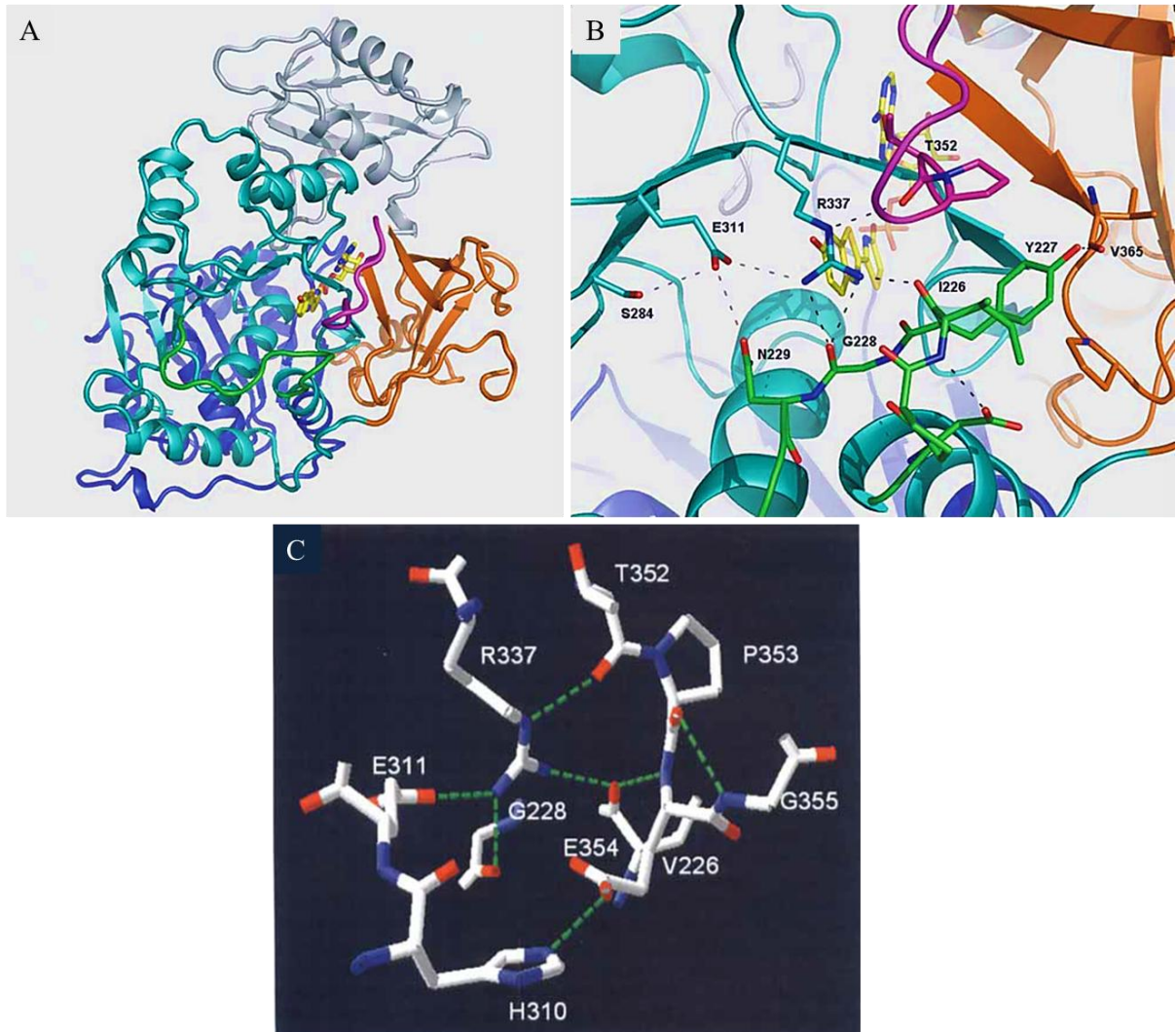


Figura 2. Modelo da estrutura tridimensional da luciferase de *Macrolampis* sp2 mostrando o *loop* entre os resíduos 223–235 e a rede de interação com os resíduos E311 e R337: (A) luciferase de *Macrolampis* sp2 mostrando o *loop* 223–235 (verde) e o *loop* 352–361 (magenta) e (B) *zoom* mostrando o *loop* entre os resíduos 223–235, a rede de ligações de hidrogênio e oxiluciferina (amarelo); e (C) *zoom* do modelo tridimensional da luciferase de *C. distinctus* mostrando o resíduo E354 interagindo com o resíduo H310. Adaptado de: VIVIANI *et al.*, 2005; 2008b.

Mudanças no espectro de emissão também são observadas quando há mutações fora do sítio-ativo da enzima que podem afetar a polarizabilidade deste. Sendo assim, o deslocamento do espectro de emissão na região do vermelho ocorre quando o sítio-ativo está bastante polarizado, o que permite uma rápida reorganização das moléculas de solvente em torno da oxiluciferina excitada, diminuindo a energia do estado excitado (UGAROVA & BROVKO, 2002). Esse deslocamento também pode ocorrer quando há a inserção de resíduos básicos de aminoácidos com uma cadeia lateral carregada positivamente no *loop* flexível da luciferase (MORADI *et al.*, 2009).

As diferentes cores das luciferases de vagalumes também podem ser explicadas pelas mudanças na razão entre as duas espécies emissoras e perturbações no ambiente desses dois

emissores. As luciferases pH-sensitivas possuem uma maior quantidade de resíduos de glicina, enquanto que o número de resíduos de histidina é igual tanto nas luciferases pH-sensitivas e nas luciferases pH-insensitivas. Uma menor quantidade de resíduos de glicina e maior quantidade de resíduos hidrofóbicos aumentam a rigidez da enzima e, conseqüentemente, a insensibilidade ao pH. Esse caráter hidrofóbico é ligeiramente superior na região entre os resíduos 220 e 344 nas luciferases pH-insensitivas, ajudando a estabilizar a proteína, deixando o sítio-ativo mais rígido comparado com as luciferases pH-sensitivas (VIVIANI *et al.*, 2008b).

1.1.3 Luciferase pH-sensitiva de *Macrolampis* sp2

O cDNA da luciferase de *Macrolampis* sp2 foi clonado, possui 1695 pb, sendo sua fase de leitura aberta de 1650 pb, com 550 resíduos de aminoácidos (VIVIANI *et al.*, 2005). Ela possui 91% de identidade com a luciferase de *P. pyralis*, 83% com a de *C. distinctus* (VIVIANI *et al.*, 2005), 78% com a de *A. vivianii* (VIVIANI *et al.*, 2011), e uma menor identidade com a de *Luciola* sp, sendo seu o pH ótimo (pH 8,2) um pouco maior do que o das outras luciferases.

O resíduo 354, que na maioria das luciferases pH-sensitivas é representado por um glutamato, é substituído por uma asparagina na luciferase de *Macrolampis* sp2. Foi demonstrado que esta substituição E354N na luciferase de *Macrolampis* sp2 é diretamente responsável pelo ombro na região do vermelho encontrado naturalmente nessa luciferase. Esse resíduo está localizado no *loop* flexível 352TPEGDDKP358, o qual conecta o motivo grampo- β T343-I351, um importante determinante da bioluminescência verde-amarelada no subdomínio C. De fato, a mutação N354E na luciferase de *Macrolampis* sp2 foi responsável pela remoção do ombro na região do vermelho, resultando em um espectro mais estreito com pico de emissão muito próximo do espectro de *P. pyralis*. Comparativamente, a mutação E354N resultou num espectro mais largo. Isso indica que esse resíduo está diretamente envolvido na sensibilidade adicional encontrada no espectro da luciferase de *Macrolampis* sp2 (VIVIANI *et al.*, 2005).

Em pH ácido, o resíduo E354 interage com o resíduo H310 por meio de uma ponte salina tanto na luciferase de *P. pyralis* quanto na de *C. distinctus*. Já na luciferase de *Macrolampis* sp2, o resíduo N354 não interage com o resíduo H310, pois N354 não tem carga negativa para interagir com a histidina protonada. De acordo com os autores, essa falta de interação poderia deslocar o *loop* flexível 352TPEGDDKP358, abrindo a cavidade do sítio-ativo e afastando parte do subdomínio B, onde está localizado o resíduo H310. Isso

promoveria a entrada de água, favorecendo a emissão de luz vermelha. Essa abertura do sítio-ativo também ocorre em pH ácido, tampão fosfato e altas temperaturas (VIVIANI *et al.*, 2005).

Ao contrário da luciferase de *Macrolampis* sp2, o espectro de bioluminescência da luciferase de *C. distinctus* em pH ácido tem um ombro na região do verde que não é observado nos espectros das luciferases de *Macrolampis* sp2 e de *P. pyralis*, indicando que a razão entre as emissões de luz verde e vermelha é diferente nessas três luciferases pH-sensitivas, sendo essa razão entre as emissões o maior determinante dos espectros de bioluminescência de vagalumes. Essa razão está em função do pH, temperatura e da presença de cátions de metais divalentes que afetam o pK_a de resíduos envolvidos em interações do sítio-ativo (VIVIANI *et al.*, 2005).

1.2 APLICAÇÕES BIOANALÍTICAS DA BIOLUMINESCÊNCIA

As luciferases de vagalumes e sua bioluminescência são utilizadas em diversas técnicas analíticas, como ensaios com gene repórter e ensaios rápidos de ATP, e ensaios de dosagem de ácidos graxos (NAKAJIMA *et al.*, 2004; 2005; MARQUES *et al.*, 2015; MORCIANO *et al.*, 2017). Porém, a baixa estabilidade da enzima, intolerância ao pH, rápida perda de atividade em temperatura ambiente e a baixa atividade específica limitam as aplicações (CAMPBELL, 1988; ASAI *et al.*, 2007; MICHELINI *et al.*, 2007; IMANI *et al.*, 2010; MIRASOLI & MICHELINI, 2014). Alterações na estrutura enzimática como o aumento do empacotamento hidrofóbico, introdução de ligações de hidrogênio, pontes salinas e pontes dissulfeto podem aumentar a estabilidade enzimática. Além disso, o uso de estratégias de engenharia genética e o desenvolvimento de métodos bioanalíticos ultrasensíveis ajudam a melhorar o emprego dessas enzimas (IMANI *et al.*, 2010).

Após a clonagem do cDNA de luciferases de vagalumes, surgiram novas aplicações que utilizam o gene da luciferase como um dos mais sensíveis repórteres para expressão gênica em células vivas e tecidos (NAYLOR, 1999; SALA-NEWBY *et al.*, 1999; BRANCHINI *et al.*, 2005; NAKAJIMA *et al.*, 2005; 2010; VIVIANI & OHMIYA, 2006). Dentre elas, o uso das luciferases *Rhagophthalmus ohbai* e *P. termitilluminans* como gene repórter tricolor (emissão de luz verde, laranja e vermelha) para monitoramento de múltiplas expressões gênicas com o uso de um único substrato, a luciferina (NAKAJIMA *et al.*, 2005).

1.2.1 Luciferasas de Interesse Aplicado

O Brasil é o país com a maior diversidade de espécies luminescentes no mundo, entre elas os vagalumes e as chamadas larvas “trenzinho”, que emitem luz em duas cores. Várias luciferasas novas foram clonadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Viviani (VIVIANI *et al.*, 1999a; 1999b; 2004; 2005; 2011; AMARAL *et al.*, 2012; 2016) e vêm sendo investigadas sob os aspectos estruturais e funcionais por meio de estudos de mutagênese sítio-dirigida, identificando resíduos e regiões importantes para a determinação das cores de bioluminescência (VIVIANI, 2002; VIVIANI *et al.*, 1999a; 2001; 2007; 2008b; 2013). As luciferasas emissoras de luz verde e vermelha de *P. termitilluminans* e *Phrixotrix hirtus*, respectivamente, vêm sendo empregadas para imagear células de mamíferos e já apresentam aplicação efetiva na forma de *kits* de genes repórter tricolor (NAKAJIMA *et al.*, 2004; 2005; 2010). A luciferase de *Macrolampis* sp2 e sua sensibilidade espectral são objeto de patente (VIVIANI, 2006), e vem sendo utilizada para o desenvolvimento de biossensores para estudos de bioprospecção e toxicidade (GABRIEL *et al.*, 2014).

Apesar da necessidade da adição do substrato luciferina, de um ambiente aeróbio e da presença de ATP, o uso da luciferase do vagalume como gene repórter é bastante sensível para uso em células de mamíferos. Já a luciferase bacteriana (gene *lux*), que não requer a adição de nenhum substrato, é instável ao calor, tornando seu uso limitado em células de mamíferos (DAUNERT *et al.*, 2000; YAGI, 2007).

1.3 BIOSSENSORES

Biossensores são dispositivos analíticos que combinam o reconhecimento biológico de uma substância de interesse (analito) e a transdução da resposta da interação biossensor/analito num sinal mensurável, permitindo uma análise quantitativa pela proporção do sinal perante a concentração das substâncias de interesse. Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) biossensor é um “dispositivo que usa reações bioquímicas específicas, mediadas por enzimas isoladas, anticorpos, tecidos, organelas ou células, de forma a detectar compostos químicos, através de sinais elétricos, térmicos ou ópticos” (IUPAC, 1997). Suas vantagens estão na facilidade de preparo, quantidade mínima necessária da amostra a ser analisada, fácil armazenamento, boa reprodutibilidade, seletividade e sensibilidade, custo relativamente baixo, rápido tempo de resposta e longo tempo de meia-vida (CHIEN-YUAN & KARUBE, 1992; GOMES & REBELO, 2003; BUONASERA *et al.*, 2011; ARORA, 2013).

Existem dois tipos de biossensores, os quais dependem do modo de geração do sinal: sensor de bioafinidade direta e biossensor enzimático. O sensor de bioafinidade direta detecta as substâncias a partir da ligação com o analito, resultando numa alteração conformacional da biomolécula ou alteração física do meio de imobilização. Já no biossensor enzimático, uma enzima, que geralmente é imobilizada, reconhece o substrato, seguido pela conversão no produto que é detectado. Dentro desses dois tipos de biossensores, estão os biossensores luminescentes, químicos e catalíticos (PATACAS, 2007).

1.3.1 Biossensores Luminescentes

Os biossensores luminescentes dividem-se em fluorescentes, quimioluminescentes e bioluminescentes. Dentre eles, grande parte é baseada na fluorescência da GFP (proteína fluorescente verde) e suas variantes, os quais são bastante sensíveis e seletivos, sendo a maioria caracterizada pela alteração na intensidade da fluorescência. Porém, como uma análise ratiométrica, que se baseia no uso de uma razão de intensidade de emissão de luz em dois comprimentos de ondas distintos do espectro, fornece uma resposta mais sensível e específica, o desenvolvimento de biossensores ratiométricos baseados nas diferentes emissões da fluorescência está em expansão (BIZZARRI *et al.*, 2006; LIAO *et al.*, 2006; MAHON *et al.*, 2011; MARSULLO *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2014). Além dos biossensores fluorescentes, luciferasas bacterianas oriundas de bactérias do gênero *Vibrio* e seu gene *lux* também são utilizadas em biossensores, sendo essas empregando como substrato da enzima o FMNH₂. No caso das bactérias bioluminescentes, o ensaio é realizado pela análise da intensidade da bioluminescência que é proporcional à concentração do analito (ÄNKÖ *et al.*, 2002; VALTONEN *et al.*, 2002; UMBUZEIRO & RODRIGUES, 2004; ver revisões ALHADRAMI, 2017; BOSCH-OREA *et al.*, 2017).

1.3.1.1 Biossensores bioluminescentes

Biossensores bioluminescentes usam luciferasas e seus genes para a produção de luz de forma quantitativa, podendo ser divididos em enzimáticos ou celulares. Nos enzimáticos, a luciferase é geralmente imobilizada e utilizada direta ou indiretamente para detectar a presença de analitos. Já os celulares são construídos pela transformação de células com vetores de expressão que contém um gene repórter que codifica uma proteína bioluminescente. Esse gene repórter pode estar ou não sob controle de um promotor induzível por sinais específicos ou ser constitutivo, e expressa luciferase ou fotoproteínas, produzindo

luz de modo quantitativo a partir da oxidação da luciferina pelo oxigênio (TAURIAINEN *et al.*, 1997; 1998; MIRASOLI *et al.*, 2002).

Já os biossensores celulares bioluminescentes podem ser do tipo *light on*, no qual a luciferase está sob o controle de um promotor induzível que é expresso apenas na presença de uma substância específica; ou do tipo *light off*, no qual a bioluminescência é naturalmente expressa por um gene repórter, e é inibida por agentes específicos que afetam o metabolismo celular e reduzem o sinal bioluminescente (TAURIAINEN *et al.*, 1997; 1998; ABD-EL-HALEEM *et al.*, 2002b; 2006; ELTZOV & MARKS, 2011).

Biossensores bioluminescentes estão sendo utilizados com sucesso para determinar a qualidade da água devido à sua capacidade de analisar substâncias na escala micromolar usando técnicas luminométricas, fotodeteção com câmeras CCD ou por exposição fotográfica (KRATASYUK *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2000). O sistema bioluminescente do vagalume norte americano *P. pyralis*, que emite luz verde-amarela (557 nm) era considerado o mais eficiente utilizado como biossensor e para bioimagens (BRANCHINI *et al.*, 2005; 2007). Entretanto, estudos mostram que a luciferase do vagalume brasileiro *P. termitilluminans* é mais eficiente (NIWA *et al.*, 2010), mostrando-se particularmente útil para bioimagem de células devido à sua emissão relativamente constante (NAKAJIMA *et al.*, 2010).

1.3.1.1.1 Biossensores bioluminescentes para toxicidade de água

Biossensores com base em microrganismos bioluminescentes para monitoramento ambiental de água são bastante apropriados devido à ação tóxica do poluente agir diretamente sobre a fisiologia celular (WOOD & GRUBER, 1996; ROZEN *et al.*, 1996). Bactérias naturalmente bioluminescentes do gênero *Vibrio* foram as primeiras a serem utilizadas como organismos-teste de toxicidade e indicadores da qualidade ambiental, sendo esse teste feito pela inibição da bioluminescência, a qual depende do substrato FMNH₂ que é produzido na respiração aeróbica (BILLARD & DUBOW, 1998; HARMEL, 2004; UMBUZEIRO & RODRIGUES, 2004; RUBINGER, 2009; FUTRA *et al.*, 2014).

Foram desenvolvidos biossensores que utilizam a tecnologia do DNA recombinante, modificando geneticamente as bactérias para responderem melhor ao estresse fisiológico ou à presença de pequenas moléculas de substâncias químicas, por meio da expressão da luciferase, o que torna possível a realização de ensaios em tempos mais curtos (PELLINEN *et al.*, 2004; YAGI, 2007).

1.3.2 Biossensores para Metais

Muitos metais são essenciais para a vida na Terra, porém, sua presença em excesso torna-se tóxica e é responsável por diversos efeitos adversos na saúde e no meio ambiente (TAVARES & CARVALHO, 1992; YABE & OLIVEIRA, 1998; FERREIRA *et al.*, 2010; MATOKA *et al.*, 2014). As intoxicações por metais são causadas principalmente pelo mercúrio, arsênio, bário, berílio, cádmio, chumbo, alumínio e níquel; os quais afetam as estruturas das proteínas e enzimas (VIRGA *et al.*, 2007). Os metais também reagem com outras macromoléculas, ligantes difusores e ligantes presentes em membranas, conferindo a eles a propriedade de bioacumulação e biomagnificação. Devido ao alto poder de contaminação dos metais, o uso de métodos sensíveis e específicos de detecção é essencial para a determinação das concentrações mínimas dos metais em pequenas quantidades de amostra (TAVARES & CARVALHO, 1992). Existem diversas técnicas para detecção quantitativa e qualitativa dos metais em amostras ambientais, mas nessas técnicas a amostra deve ser decomposta para que ocorra a liberação dos íons metálicos na solução. Além disso, necessitam de recursos humanos treinados para manusear os equipamentos, tornando esses processos caros e pouco factíveis em países menos desenvolvidos (JORDÃO *et al.*, 1990; SCHUSTER & UNTERREITMAIER, 1993; CORBISIER *et al.*, 1999; PIRES *et al.*, 2004; VERMA & SINGH, 2005; COTTA *et al.*, 2006; VIRGA *et al.*, 2007; FONTENELE *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2010; REZENDE *et al.*, 2011; LIN & HUANG, 2014).

Para análise da fração biodisponível de metais, bactérias geneticamente modificadas com plasmídeos contendo a GFP são muito utilizadas pelo fato de produzirem um sinal mensurável quando em contato com esses íons metálicos. A maioria desses biossensores expressa um gene repórter controlado por promotor induzível por metais e que, portanto, emite um sinal quando em contato com o metal em particular (LIAO *et al.*, 2006).

A maioria dos biossensores luminescentes é baseada na fluorescência da GFP, que também são utilizadas como gene repórter para analisar a fração biodisponível de metais em amostras ambientais e em células vivas para estudos de toxicidade ou bioatividade (LIAO *et al.*, 2006; PENG *et al.*, 2007; GIREESH-BADU & CHAUDHARI, 2012; MARSULLO *et al.*, 2014; AYDIN *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2014; HOSSEINI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014). Além dos biossensores fluorescentes, luciferases bacterianas também estão sendo utilizadas em biossensores do tipo *light off*. Por outro lado, biossensores baseados em análises ratiométricas do espectro da emissão são menos comuns, porém possuem vantagens de serem mais específicos e sensíveis.

Existem diversos biossensores bioluminescentes bacterianos que utilizam a luciferase do vagalume para a detecção específica de metais em amostras ambientais (TAVARES & CARVALHO, 1992; TAURIANEN *et al.*, 1998; YABE & OLIVEIRA, 1998; IVASK *et al.*, 2002; 2004; COSTA, 2010; FERREIRA *et al.*, 2010), os quais são bastante sensíveis e permitem a detecção da fração biodisponível (TAURIANEN *et al.*, 2000). Estes biossensores são do tipo *light on* (TAURIANEN *et al.*, 1998; 2000; RIETHER *et al.*, 2001; IVASK *et al.*, 2002; 2004; 2009; KURVET *et al.*, 2011; WOUTERSEN *et al.*, 2011).

1.3.3 Biossensores de pH Intracelular

Células vivas são crucialmente dependentes da homeostase do pH, pois a maioria das proteínas têm faixas específicas de pH nos quais elas podem funcionar (KRULWICH *et al.*, 2011). O pH intracelular é geralmente mantido constante no citoplasma, enquanto que em algumas organelas como mitocôndria, cloroplastos, peroxissomos e lisossomos podem ocorrer flutuações importantes para sua função celular. O pH é um bom indicador do estado metabólico e energético da célula, sendo assim, o controle do pH é crítico para muitos processos celulares, como a síntese de proteínas, atividades enzimáticas, transcrição do DNA, entre outros. Portanto, métodos para medir o pH intracelular são de extrema importância. Além disso, o monitoramento do pH intracelular com alta resolução pode ajudar no melhor entendimento de muitos processos fisiológicos ou patogênicos que ocorram no interior da célula (BREEUWER *et al.*, 1996; AMARANTE-MENDES, 2003; BIZZARRI *et al.*, 2006; SRIVASTAVA *et al.*, 2007; KRULWICH *et al.*, 2011; van BEILEN & BRUL, 2013; HU *et al.*, 2014).

Além das mudanças de pH intracelular serem importantes indicadores da fisiologia celular, valores anormais de pH estão normalmente associados com disfunção celular e com algumas doenças, como câncer e Alzheimer. A acidificação intracelular tem sido relatada como uma característica inicial de apoptose em células e disfunção mitocondrial. Já o aumento do pH pode ocorrer devido ao crescimento induzido pelo fator de proliferação celular, progressão do ciclo celular, diferenciação e quimiotaxia. Esse aumento também é comum em casos de câncer. Por isso, o monitoramento do pH em células vivas pode ser utilizado no diagnóstico precoce de doenças (SRIVASTAVA *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2014).

Com relação a apoptose, ela ocorre para que haja continuidade da vida do organismo. Ela inicia-se pelo aparecimento dos “sinais de estresse” que são detectados pelas mitocôndrias, que nos vertebrados é o centro responsável por decidir se a célula entrará ou não nesse processo de morte celular. Caso ocorra a morte celular, a mitocôndria sofre um

desacoplamento da cadeia respiratória e libera citocromos para o citosol por meio de uma rede de reações, as quais são responsáveis pela diminuição do pH intracelular (AMARANTE-MENDES, 2003). A doença isquêmica do coração e a hipóxia leva a uma diminuição do pH citoplasmático das células para cerca de pH 6,0, portanto, esse baixo pH intracelular pode ser um indicativo significativo de isquemia do miocárdio. Por isso medidas do pH intracelular de células do miocárdio podem ajudar no diagnóstico e prognóstico precoce da doença (CURRIN *et al.*, 1991; LEMASTERS *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2014).

Técnicas para análise do pH em células de mamíferos e células bacterianas foram originalmente feitas por meio do uso de fluoróforos sensíveis ao pH. Essa técnica consiste em usar moléculas fluorescentes, como derivados da fluoresceína, capazes de se ligar reversivelmente ao H⁺, sendo que essa protonação afeta a intensidade da fluorescência (BREEUWER *et al.*, 1996; CONCHA, 2009). A mais importante limitação do uso desses compostos é que a medida do pH intracelular é restrita ao citosol e ao núcleo, enquanto que a alteração do pH ocorre em outras organelas intracelulares que não podem ser diretamente determinadas em células intactas (PORCELLI *et al.*, 2001). Além disso, a maioria das sondas fluorescentes não pode ser usada para monitoramento do pH intracelular, especialmente no núcleo, devido à sua baixa permeabilidade na membrana (HU *et al.*, 2014). Ademais, esses corantes fluorescentes de baixo peso molecular podem causar efeitos fototóxicos e afetar a fisiologia da célula. Um sensor fluorescente de pH ideal deve ter alta especificidade e sensibilidade, boas propriedades ópticas e rápida resposta do sinal quando há a mudança do pH (KNEEN *et al.*, 1998). Porém, sensores fluorescentes de pH baseados na intensidade da fluorescência dependem da concentração total do fluoróforo, tornando difícil determinar se as alterações da fluorescência são devido a alterações do pH ou a alterações da concentração do indicador (BENCINA, 2013).

O pH intracelular também pode ser medido por microespectrofluorimetria a laser com o uso de corantes fluorescentes pH-dependentes, porém, seu uso é específico para o citosol e núcleo da célula (SEKSEK & BOLARD, 1996). O uso de corantes ácidos fracos ou repórteres para análise do pH também tem a desvantagem de poderem alterar o pH intracelular, tornando-se difíceis de serem usados com precisão, além de exigirem tratamentos e diversos passos de incubação antes de medir o pH (van BEILEN & BRUL, 2013).

Mais recentemente, sensores de pH intracelulares de bactérias e de células de mamíferos estão sendo baseados na fluorescência da GFP proveniente da medusa *Aequorea victoria* e suas variantes, nos quais são analisada a mudança de intensidade de fluorescência ou a alteração espectral por meio da medida ratiométrica, conforme há mudança no pH

(BREEUWER *et al.*, 1996; CUI *et al.*, 2004; LLOPIS *et al.*, 1998; KNEEN *et al.*, 1998; BIZZARRI *et al.*, 2006; CONCHA, 2009; AROSIO *et al.*, 2010; MAHON, 2011; TANTAMA *et al.*, 2011; QUATRESOUS *et al.*, 2012; van BEILEN & BRUL, 2013; PÖEA-GUYON *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2014).

A vantagem do uso da GFP e suas variantes é sua capacidade de medir o pH intracelular específico. Porém, a desvantagem é que esta proteína é estável e se acumula no citoplasma e compartimentos celulares, não dando informação confiável para análises em tempo real. Além disso, por ser fluorescente, necessita de irradiação por luz azul, que é fototóxica, por apresentar problemas como a autofluorescência endógena das células e auto-absorção por células e tecidos (BREEUWER *et al.*, 1996; ASAI *et al.*, 2007; NAKAJIMA *et al.*, 2010; MAHON *et al.*, 2011; BENCINA, 2013).

Uma vez que a análise ratiométrica é mais sensível, o desenvolvimento de biossensores ratiométricos está em expansão. Proteínas fluorescentes foram recentemente modificadas e usadas para estimar o pH intracelular ratiometricamente (BIZZARRI *et al.*, 2006; MAHON *et al.*, 2011).

A aplicação de proteínas bioluminescentes (luciferases ou fotoproteínas) para análise do pH intracelular é recente. Hattori e colaboradores (2013) construíram um indicador bioluminescente fotoinativável baseado na combinação da complementação de um fragmento de luciferase com a fototropina-1 (LOV2) para medida da acidificação intracelular. Apesar de a metodologia ser de potencial aplicabilidade, requer a participação de duas proteínas distintas (complementação LOV-2 e luciferase) com diferentes condições bioquímicas (ATP e FMNH₂) e fotoirradiação usando luz azul com efeitos fotoquímicos potenciais, aumentando a complexidade da amostra (HATTORI *et al.*, 2013).

1.4 BIOIMAGEM POR BIOLUMINESCÊNCIA

O uso de sondas bioluminescentes que usem luciferases para relatar eventos celulares não invasivos em longo prazo está emergindo como uma nova abordagem. Eles possuem a vantagem de produzir sua própria luz, sem a necessidade de irradiação e concorrência com outras fontes luminescentes endógenas, sendo bastante sensível, com uma reação quantitativa e de baixo *background*, e que permite análises em tempo real. Além disso, a luciferina, que é usada como o substrato da enzima luciferase de vagalume, penetra facilmente nas células e é bastante estável, o que torna o ensaio de bioluminescência melhor do que os ensaios com fluorescência (NAKAJIMA *et al.*, 2010; OHMIYA, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Existe uma demanda de biossensores intracelulares de pH e metais tóxicos e potencialmente tóxicos. As luciferases de vagalumes apresentam um espectro de bioluminescência bem sensível à variação de pH na faixa fisiológica e à presença de metais como zinco, chumbo, cádmio e mercúrio. Entretanto, esta propriedade nunca foi utilizada para medidas de pH ou concentração de metais. Em 2005 foi clonada a luciferase de *Macrolampis* sp2 (VIVIANI *et al.*, 2005), a qual é muito sensível ao pH, e depositada a primeira patente que faz uso de apenas um gene repórter de luciferase como gene repórter dual para análises de expressão gênica e biossensores de pH ou cátions (VIVIANI, 2006). Entretanto, ainda não foram desenvolvidos sensores intracelulares específicos de pH ou cátions usando estas luciferases. Além disto, a sensibilidade natural destas luciferases a cátions de metais é baixa. Baseado nos conhecimentos adquiridos pelo grupo do Prof. Dr. Vadim Viviani sobre estrutura e função destas luciferases pH-sensitivas, planejamos usar a luciferase de *Macrolampis* sp2 e outras luciferases pH-sensitivas disponíveis no laboratório (*Cratomorphus distinctus* e mutantes) como biossensores intracelulares de pH, e desenvolver por engenharia genética, sensores ratiométricos específicos para metais (zinco, níquel, cádmio, chumbo e mercúrio), baseados nas variações espectrais da bioluminescência destas luciferases. Também planejamos avaliar a aplicabilidade da luciferase de *Macrolampis* sp2 em células de mamíferos para monitoramento do pH intracelular ratiometricamente e por imagem da bioluminescência.

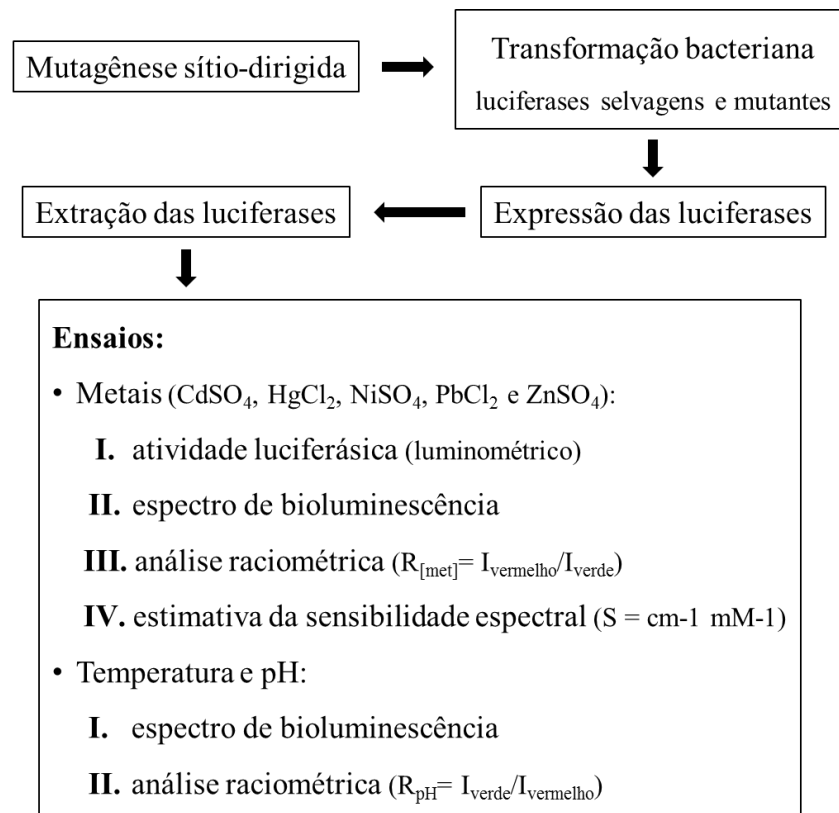
3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Investigar a viabilidade de uso da luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes Mac-H310A, Mac-H310C, Mac-N354C, Mac-N354E, Mac-N354H e Mac-H310C/N354C e *Cratomorphus distinctus* e seu mutante Crt-E354N como biossensores intracelulares ratiométricos de pH;
2. Compreender a estrutura e função destas enzimas;
3. Desenvolver, a partir da luciferase de *Macrolampis* sp2, um biossensor espectral ratiométrico de metais tóxicos e potencialmente tóxicos, como o Cd^{2+} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{2+} e Zn^{+2} ;
4. Aplicar a luciferase de *Macrolampis* sp2 em células de mamíferos como biossensor de pH intracelular em tempo real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPRESSÃO, MUTAÇÃO E USO DA LUCIFERASE DE *Macrolampis* sp2 PARA ESTIMAR O pH E CONCENTRAÇÃO DE METAIS



4.1.1 Plasmídeos

Utilizamos os plasmídeos previamente construídos pPro-Mac (pPro, Invitrogen, EUA) possuindo o cDNA da luciferase de *Macrolampis* sp2 (VIVIANI *et al.*, 2005) e pBI-Crt (pBlueScript, Agilent Technologies, EUA) contendo o gene da luciferase de *Cratomorphus distinctus* (VIVIANI *et al.*, 2004).

4.1.2 Subclonagem do cDNA da luciferase em vetor pCold™ II

Para expressar a luciferase de *Macrolampis* sp2 em larga escala, o cDNA desta luciferase foi inserido no vetor de expressão pCold™ II com cauda de histidina N-terminal (Takara, Japão). Para isto o gene da luciferase foi amplificado usando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (*primers*): Mac-NDE (GCC GCA TAT GGA AGA CGA AAA AAA) e M13-20 (GTA AAA CGA CGG CCA G) e o *kit* Taq DNA polimerase “PCR Master mix” (Promega, EUA) para amplificar o DNA em um termociclador pela técnica de PCR

(reação em cadeia da polimerase). Para este fim foram utilizados 50 μL de “PCR Master mix”, 2,0 μL do DNA plasmidial (50 ng), 4,0 μL de cada *primer* (10 mM) e 40 μL de água ultrapura autoclavada. Essa reação foi submetida a um ciclo de 95° C por 5 minutos; 30 ciclos de 95° C por 30 segundos, 50° C por 1 minuto e 68° C por 2 minutos; e 68° C por 10 minutos para a extensão final. O produto amplificado foi purificado usando o *kit* “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega, EUA) e digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI* por 1 hora a 37° C em banho-maria. O produto da restrição foi purificado novamente e ligado no vetor pCold™ II, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição, usando o *kit* de ligação de DNA (Takara, Japan) e finalmente utilizado para transformar células de *E. coli* XL1-Blue (Agilent Technologies, EUA).

4.1.3 Transformação Bacteriana

Amostras de 50 μL de células competentes de *E. coli* XL1-Blue – usada para propagação do DNA plasmidial, ou BL21/DE3 (Agilent Technologies, EUA) – usadas para expressão da luciferase, foram misturados em 1,0 μL (50–100 ng) do DNA plasmidial que contém o gene das luciferases num microtubo previamente gelado. Essa mistura foi incubada por 30 minutos no gelo e submetida a um choque térmico de 45 segundos a 42° C em banho-maria e 2 minutos no gelo. Após o choque térmico foram adicionados 200 μL de meio LB líquido e esta solução foi mantida por 1 hora a 37° C sob agitação a 225 rpm, sendo plaqueada posteriormente em meio LB/ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.1.4 Extração de DNA Plasmidial

A extração de DNA plasmidial das bactérias transformadas foi realizada com o *kit* “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. As colônias de bactérias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio líquido LB/ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e mantidas a 37° C *overnight* em incubadora termostaticada sob agitação de 225 rpm. Após esse período, o material foi centrifugado e as células rompidas em condições alcalinas extremas por 5 minutos. A solução foi neutralizada e ajustada para condições ótimas de adsorção do DNA na membrana de purificação. O DNA plasmidial adsorvido foi lavado com solução de lavagem para a remoção de impurezas e eluído com água livre de nucleases, sendo conservado a -20° C até sua utilização nas transformações bacterianas subsequentes.

4.1.5 Mutagênese Sítio-Dirigida

Foram realizadas as mutações nos resíduos H310 e N354 da luciferase de *Macrolampis* sp2 que, de acordo com estudos de modelagem e mutagênese sítio-dirigida das luciferase pH-sensitivas, estão envolvidas com interações eletrostáticas que podem ser afetadas pelo pH (VIVIANI *et al.*, 2005; 2008a). Os mutantes produzidos nesse trabalho foram: Mac-H310C, Mac-N354C, Mac-N354H e Mac-H310C/N354C. Os mutantes Mac-N354E e Crt-E354N foram previamente preparados (VIVIANI *et al.*, 2005).

Para a realização das mutagêneses sítio-dirigidas simples e duplas no cDNA da luciferase de *Macrolampis* sp2 previamente clonado (VIVIANI *et al.*, 1999a), utilizamos o kit “QuikChange Site-Directed Mutagenesis” (Agilent Technologies, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Para esse procedimento foram utilizados dois *primers* complementares que apresentavam a mutação desejada (**Tab. 1**). As mutagêneses foram realizadas por PCR, com o uso da DNA polimerase “Pfu Turbo” (Agilent Technologies, EUA). Foram utilizados 2,5 µL de tampão Pfu 10×, 0,5 µL do DNA plasmidial (50 ng), 1,25 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL de cada *primer* (125 ng/µL), 0,5 µL “Pfu Turbo” polimerase e 19,25 µL de água ultrapura autoclavada. Essa reação foi submetida a um ciclo de 95° C por 2 minutos; 25 ciclos de 95° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos e 72° C por 7 minutos e um período de extensão final a 72° C por 10 minutos.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados para mutagênese sítio-dirigida no cDNA da luciferase de *Macrolampis* sp2.

| Mutação | Sequência |
|------------------|---|
| Mac-H310C | <i>Foward</i> G TCT AAT TTG <u>TGC</u> GAA ATT GCT TC |
| | <i>Reverse</i> GA AGC AAT TTC <u>GCA</u> CAA ATT AGA C |
| Mac-N354H | <i>Foward</i> C ATT ACA CCG <u>CAT</u> GGA GAT GAT AAG C |
| | <i>Reverse</i> G CTT ATC ATC TCC <u>ATG</u> CGG TGT AAT G |
| Mac-N354C | <i>Foward</i> C ATT ACA CCG <u>TGT</u> GGA GAT GAT AAG C |
| | <i>Reverse</i> G CTT ATC ATC TCC <u>ACA</u> CGG TGT AAT G |

Após o término da reação de PCR, realizamos uma eletroforese em gel de agarose (método descrito a seguir) com a amostra e o controle na mesma diluição para observação da amplificação. A amostra amplificada foi tratada com 0,5 µL da enzima de restrição *DpnI* para digerir o DNA parental não-mutado (reconhece sítios do DNA metilado) em banho-maria por 1 hora a 37° C. Em seguida, o DNA mutagenizado foi utilizado para a transformação em células competentes XL1-Blue. A dupla mutação Mac-H310C/N354C foi obtida a partir de

um primeiro mutante simples confirmado (Mac-N354C), realizando o mesmo procedimento utilizado na simples mutação.

4.1.6 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

A análise de DNA plasmidial mutagenizado foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1× (Tris 40 mM, EDTA 1 mM e acetato 20 mM), a corrida realizada a 100 volts por 50 minutos e o DNA revelado em transluminador UV (ATTO, Japão) por fluorescência do corante *Blue Green* (LCG Biotecnologia, Brasil) que se intercala no DNA. Foram aplicados no gel alíquotas de 5,0 µL de DNA plasmidial e 1,0 µL do corante fluorescente, sendo utilizado como padrão de peso molecular 1,0 µL do DNA Ladder 1 Kb (Ludwig Biotecnologia, Brasil) e 1,0 µL do corante fluorescente.

4.1.7 Screening dos Mutantes

Após a transformação do material mutagenizado em células competentes de *E. coli* XL1-Blue, foram escolhidas aleatoriamente 4 colônias de bactérias, as quais foram transferidas para outra placa contendo meio agar LB/ampicilina (100 µg/mL) para crescimento isolado destas em estufa a 37° C *overnight*. Em seguida, essas replicatas isoladas foram transferidas para outra placa contendo IPTG 1 mM e mantido à temperatura de 18–20° C por 6 a 8 horas para indução. Após esse período, foi adicionado D-luciferina (Promega, EUA) 1 mM em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0, seguida de fotodetecção por 5 minutos em câmera CCD (ATTO, Japão). Havendo mudança de cor ou intensidade da bioluminescência em relação à luciferase selvagem, procedemos com o isolamento do clone positivo. Os mutantes positivos foram cultivados e usados para extração de DNA plasmidial, para posterior confirmação por sequenciamento, sendo esse método descrito a seguir.

4.1.8 Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal (FCAV) – Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), UNESP, em um sequenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Hitachi, Japão), de acordo com o método de reações terminadas com dideoxynucleotídeos (método de Sanger), sugerido pelo próprio laboratório. O *primer* utilizado para sequenciamento foi Mac1 (GCA GTA TCG ATT CCA ATT CG) na concentração de 10 µM.

4.1.9 Expressão das Luciferases Recombinantes

Foram transformadas células competentes de *E. coli* BL21-DE3 com o DNA plasmidial contendo a luciferase de *Macrolampis* sp2 (Mac) selvagem e mutantes Mac-H310C, Mac-N354C, Mac-N354E, Mac-N354H e Mac-H310C/N354C; *Cratomorphus distinctus* (Crt) selvagem e o mutante Crt-E354N e *Amydetes vivianii* (Amy) selvagem. A partir de uma colônia isolada, foi feita uma mini cultura com 5 mL de meio líquido LB/ampicilina (100 µg/mL) a 37° C *overnight* em incubadora termostaticada sob agitação de 225 rpm. Essa mini cultura foi transferida para 100 mL de meio líquido LB, permanecendo na incubadora termostaticada sob agitação de 225 rpm a 37° C até atingir a absorvância_{600nm} ≈ 0,4 para indução a 18° C por 12–18 horas após a adição de IPTG 0,4 mM.

4.1.10 Medidas de Atividade da Luciferase *in vivo*

Para verificar se houve a expressão efetiva da luciferase nas bactérias em sua forma ativa, realizamos medidas de bioluminescência *in vivo* no luminômetro AB-2200 (ATTO, Japão) através da medida de intensidade de bioluminescência em cps (*counts* por segundo) após a mistura de 90 µL da cultura de bactérias, induzidas com IPTG *overnight*, com 10 µL de D-luciferina 10 mM pH 5,0.

4.1.11 Extração das Luciferases Recombinantes

Volumes de 100 mL de culturas induzidas *overnight* com IPTG foram transferidos para tubos de 50 mL e centrifugados a 2.000 rpm por 15 minutos a 4° C para coleta do precipitado (*pellet*). As células coletadas foram armazenadas a -80° C até seu uso. O *pellet* foi ressuspenso em 3 mL de tampão de extração gelado (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0; glicerol 10% e Triton X-100 1%), 40 µL de coquetel inibidor de protease (Roche, Suíça) e 4 µL de DTT (Amresco, EUA) 1 M. No caso da luciferase purificável de *Macrolampis* sp2 expressa a partir do vetor pColdTM II (pCold-Mac), a extração foi realizada com tampão de extração gelado (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM e imidazol 10 mM), 100 µL de coquetel inibidor de protease e 10 µL de DTT 1 M. A lise celular foi realizada por ultrassonicação (Misonix, EUA) com 5 repetições e a amostra lisada centrifugada a 12.000 rpm a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante, denominado de extrato bruto, foi coletado e usado em ensaios de atividade luciferásica ou purificação (no caso da pCold-Mac) e usados nas análises de pH, temperatura e metais.

4.1.12 Purificação da Luciferase por Cromatografia de Afinidade com Matriz de Níquel

O método de purificação baseia-se na afinidade da cauda de histidina fusionada ao N-terminal da enzima recombinante por íons de níquel (Ni-NTA) imobilizados em uma resina de agarose. A resina de Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Alemanha) foi equilibrada com tampão de extração (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM e imidazol 10 mM) e o extrato bruto ligado à resina por 45 minutos sob agitação moderada a 4° C para permitir a ligação da cauda de histidina da proteína recombinante ao níquel da resina. A resina complexada com a luciferase foi então aplicada em uma mini coluna e lavada com 10 mL de tampão de lavagem (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM e imidazol 20 mM). A proteína recombinante foi eluída da resina com tampão de eluição (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM e imidazol 250 mM) em alíquotas de 1 mL cada. Cada alíquota foi analisada em ensaio *in vitro* para a atividade luciferásica (método descrito a seguir no item 4.1.14), e as frações com maior atividade foram dialisadas em tampão de diálise (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM e glicerol 10%) por 12–16 horas e estocadas a 4° C para ser utilizada nos ensaios com metais.

4.1.13 SDS-PAGE da Luciferase Purificada

Para confirmação da obtenção da luciferase purificada, as amostras de luciferase foram analisadas em eletroforese em gel de SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio de poli(acrilamida) 7,5% em condições desnaturantes, de acordo com o protocolo da Bio-Rad (EUA). As amostras de proteínas foram diluídas 1:1 em tampão de amostra (0,8 mL glicerol; 1,6 mL SDS 10%; 0,4 mL 2-mercaptoetanol; 1,0 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 8,6 e 0,2 mL de azul de bromofenol 0,1%), desnaturadas a 95° C por 5 minutos e aplicadas no gel, sendo submetidas a corrida de 100 volts por 1 hora em tampão de corrida (Tris-glicina 0,125 M pH 8,3 e SDS 0,5%). O gel foi corado com Azul de Coomassie por 30 minutos sob leve agitação, sendo imerso em água sob agitação para lavagem.

4.1.14 Medidas de Atividade da Luciferase *in vitro*

A atividade enzimática da luciferase *in vitro* foi realizada pela medida da bioluminescência em luminômetro AB-2200, utilizando uma mistura de 80 µL de tampão (Tris-HCl 0,10 M pH 8,0 ou fosfato de sódio 0,10 M pH 6,0 ou pH 8,0, dependendo do ensaio), 10 µL de luciferase (extrato bruto ou purificada), 5 µL de D-luciferina 10 mM e 5 µL de solução contendo MgSO₄ 80 mM e ATP 40 mM. A atividade bioluminescente foi medida em cps.

4.1.15 Bioimagem em Câmera CCD

A bioimagem da bioluminescência de colônias de bactérias em culturas líquidas ou meio semi-sólido para análise da variação de cor em diferentes pHs de tampão e tempo de exposição foi obtida após adição de D-luciferina 10 mM pH 5,0 em câmara de fotodeteção Light Capture CCD Câmera (ATTO, Japão), com exposições em diferentes tempos e sensibilidades, dependendo da intensidade da bioluminescência da amostra.

4.1.16 Espectros de Bioluminescência

Os espectros de bioluminescência foram obtidos utilizando o espectroluminômetro de alta sensibilidade LumiF SpectroCapture AB-1850 com câmera CCD resfriada (ATTO, Japão) e o espectrofluorímetro F4500 (Hitachi, Japão).

Para os ensaios no espectroluminômetro, misturamos 80 µL de tampão 0,10 M, 10 µL da luciferase (extrato bruto ou purificada), 5 µL de D-luciferina 10 mM e 5 µL de solução contendo MgSO₄ 80 mM e ATP 40 mM. A janela de emissão foi mantida a 1 mm, sendo o tempo de integração e sensibilidade variando de acordo com a intensidade da luminescência da amostra (variação de 10 segundos a 5 minutos).

Para os ensaios no espectrofluorímetro, misturamos 400 µL de tampão Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, 50 µL da luciferase (extrato bruto), 25 µL de D-luciferina 10 mM e 25 µL de solução contendo MgSO₄ 80 mM e ATP 40 mM. A varredura desse espectro foi feita entre 450–700 nm com uma velocidade de 2.400 nm/min com a janela de excitação fechada.

4.1.16.1 Efeito da temperatura nos espectros de bioluminescência

Foi analisado o efeito de diferentes temperaturas (5° C, 10° C, 15° C, 20° C, 25° C, 30° C e 35° C) no espectro de bioluminescência da luciferase se *Macrolampis* sp2 no espectrofluorímetro, usando o banho termostaticado TE-184 (Tecnal[®], Brasil) acoplado ao equipamento. Para o ensaio foram misturados 400 µL de tampão Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, 50 µL da luciferase (extrato bruto), 25 µL de D-luciferina 10 mM e 25 µL de solução contendo MgSO₄ 80 mM e ATP 40 mM.

4.1.16.2 Efeito de metais divalentes nos espectros de bioluminescência

O efeito de metais divalentes como Cd²⁺, Hg⁺², Ni⁺², Pb²⁺ e Zn⁺² nas atividades das luciferases selvagens e mutantes foi medido no luminômetro e o efeito no espectro de bioluminescência foi medido no espectroluminômetro pela adição de 0,5–40 µL dos

respectivos sais de metais (CdSO_4 , NiSO_4 , PbCl_2 e ZnSO_4 a 20 mM e HgCl_2 a 0,1 mM, 1 mM e 10 mM) na solução do ensaio.

Para determinar a dose/efeito dos metais no espectro de bioluminescência, 10 μL de luciferase (extrato bruto ou purificada) foram misturados com 40–80 μL de tampão Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, 5 μL de D-luciferina 10 mM, 5 μL de uma solução contendo ATP 40 mM e MgSO_4 80 mM e 0,5–40 μL de cada solução de metal descrita anteriormente. Os volumes e concentrações de cada metal utilizadas estão descritos na **tabela 2**.

Foram feitos controles da variação dos volumes de tampão realizando o mesmo ensaio, com a substituição do metal por água ultrapura para verificar se essa alteração de volume resultaria numa mudança de espectro. Os resultados foram negativos.

Tabela 2. Volumes e concentrações dos metais utilizados nos ensaios de bioluminescência.

| CdSO_4, NiSO_4, PbCl_2 e ZnSO_4 20 mM | | HgCl_2 0,1 mM e 1 mM | |
|--|--|---|--|
| Concentração (mM) | Volume (μL) | Concentração (μM) | Volume (μL) |
| 0,1 | 0,5 | 1 | 1 (0,1 mM) |
| 0,2 | 1,0 | 5 | 5 (0,1 mM) |
| 0,3 | 1,5 | 10 | 1 (1 mM) |
| 0,4 | 2,0 | 50 | 5 (1 mM) |
| 0,5 | 2,5 | | |
| 1,0 | 5 | | |
| 2,0 | 10 | | |
| 3,0 | 15 | | |
| 4,0 | 20 | | |
| 5,0 | 25 | | |
| 6,0 | 30 | | |
| 7,0 | 35 | | |
| 8,0 | 40 | | |
| | | HgCl_2 10 mM | |
| | | Concentração (mM) | Volume (μL) |
| | | 0,1 | 1 |
| | | 0,5 | 5 |
| | | 1,0 | 10 |
| | | 2,0 | 20 |

4.1.16.3 Efeito do pH nos espectros de bioluminescência

Analizamos o efeito de diferentes pHs nos espectros de bioluminescência das luciferases selvagens de *Macrolampis* sp2 e *C. distinctus* no espectroluminômetro. Para o ensaio foram misturados 80 μL de tampão, 5 μL de D-luciferina 10 mM, 10 μL da luciferase (extrato bruto) e 5 μL de uma solução contendo ATP 40 mM e MgSO_4 . Os tampões e pHs utilizados foram: tampão citrato de sódio 0,10 M pH 5,5; tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5; tampão Tris-HCl 0,10 M pH 8,0 e 8,5 e tampão CHES 0,10 M pH 9,0.

4.1.17 Análise Raciométrica dos Espectros de Bioluminescência

As intensidades de bioluminescência no verde (I_{verde}) e vermelho (I_{vermelho}) foram usadas para calcular a razão de intensidade dos espectros de bioluminescência (R) como sendo $R_{[\text{met}]} = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$ para metais e $R_{\text{pH}} = I_{\text{verde}}/I_{\text{vermelho}}$ para o pH e diferentes temperaturas: (*Macrolampis* sp2) $\lambda_{\text{verde}} = 563$ e $\lambda_{\text{vermelho}} = 616$ e (*C. distinctus*) $\lambda_{\text{verde}} = 554$ e $\lambda_{\text{vermelho}} = 614$.

4.1.17.1 Análise raciométrica dos espectros de bioluminescência em diferentes temperaturas

Para a análise raciométrica dos espectros de bioluminescência em diferentes temperaturas, foi construído um gráfico da relação entre a razão e as diferentes temperaturas, utilizando a razão $R_{\text{pH}} = I_{\text{verde}}/I_{\text{vermelho}}$.

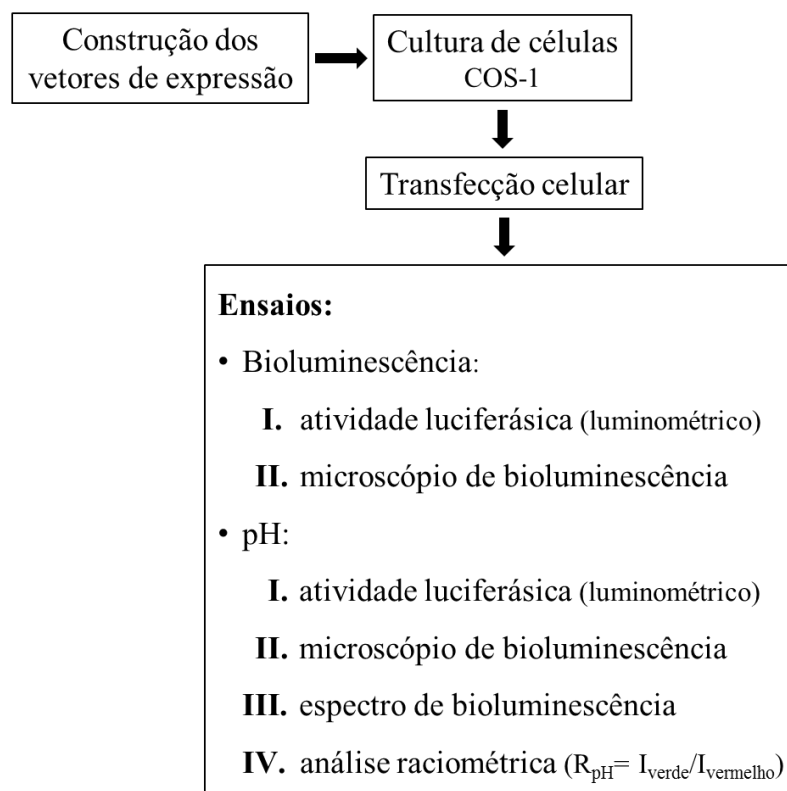
4.1.17.2 Análise raciométrica dos espectros de bioluminescência com metais

Para a análise raciométrica dos espectros de bioluminescência com diferentes metais, foi construído um gráfico da relação entre a concentração de metal e a razão $R_{[\text{met}]} = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$. Para estimar a sensibilidade espectral (S) das luciferases aos metais, foi calculada a razão entre a mudança espectral usando a frequência (o recíproco do comprimento de onda em cm^{-1}) sobre a concentração do metal.

4.1.17.3 Análise raciométrica dos espectros de bioluminescência em diferentes pHs

Para relacionarmos a mudança no espectro de bioluminescência das luciferases com o pH da célula, calculamos a razão de intensidade de bioluminescência $R_{\text{pH}} = I_{\text{verde}}/I_{\text{vermelho}}$ em diferentes pHs (pH 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0). Então, o efeito do pH foi plotado como uma função logarítmica dos valores de R .

4.2 EXPRESSÃO DA LUCIFERASE de *Macrolampis* sp2 E ESTIMATIVA DE pH EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS COS-1



4.2.1 Construção dos Plasmídeos Contendo o Gene da Luciferase de *Macrolampis* sp2

Para avaliar a aplicação da luciferase de *Macrolampis* sp2 em células de mamíferos, construímos vetores de expressão para endereçar a proteína em diferentes compartimentos celulares: no peroxissomo (sinal de direcionamento ao peroxissomo – PTS) (com -SKL; Ser-Lys-Leu – selvagem), direcionamento ao citosol (sem -SKL) e ao núcleo (sinal de direcionamento ao núcleo – NLS; Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val). A sequência do cDNA foi modificada com a inserção do sítio *Hind*III próximo ao códon de iniciação e um sítio *Xho*I no final da sequência. Nós utilizamos um *primer* inicial (CCA AGC TTA TGG AAG ACG AAA AAA ACA TAA T) e três *primers* reversos: (CCC TCG AGT TAT AAT TTG GAC TTT CCG CCT ATC TTG) para o peroxissomo, (CCC TCG AGT TAC TTT CCG CCT ATC TTG GCC TTC AC) para o citosol e (CCC TCG AGT TAC ACC TTC CGC TTC TTC TTG GGC TTT CCG CCT ATC TTG GCC TTC A) para o núcleo. A amplificação do DNA foi realizada num termociclador por meio da técnica de PCR usando a DNA polimerase KOD (Toyobo, Japão) com a seguinte reação: 5,0 µL de tampão KOD 10×, 1,0 µL do DNA plasmidial (1 ng/µL), 5,0 µL de dNTP 2 mM, 2,0 µL de MgSO₄ 25 mM, 1,5 µL de cada *primer* (10

pmol/ μL), 1,0 μL KOD (1 U/ μL) e 33 μL de água ultrapura autoclavada. Essa reação foi submetida a um ciclo de 94° C por 2 minutos e 30 ciclos de 94° C por 15 segundos e 68° C por 2 minutos. Os produtos amplificados, confirmados por eletroforese de DNA em gel de agarose, foram purificados usando o *kit* “QIAquick[®] PCR” (Qiagen, Alemanha) e digeridos com as enzimas de restrição *Hind*III e *Xho*I. Esses produtos de restrição foram novamente purificados e ligados nos sítios *Hind*III e *Xho*I do pCMV-PTGRm(-SKL)::mImportin- α 1 (pYM1443-1 de NAKAJIMA *et al.*, 2010) *downstream* ao promotor CMV (citomegalovírus), previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição, usando o *kit* de ligação de DNA (Takara, Japão) e finalmente usados para transformação em células de *E. coli* DH5 α [™] (ThermoFisher Scientific, EUA) (método descrito a seguir). As ligações resultaram nas construções pCMV-Mac (alvo ao peroxissomo), pCMV-Mac:cito (alvo ao citosol) e pCMV-Mac:NLS (alvo ao núcleo).

4.2.2 Transformação Bacteriana

Amostras de 100 μL de células competentes de *E. coli* DH5 α [™], foram misturados em 4,0 μL do DNA plasmidial (para cada construção foi feita uma transformação bacteriana individual) num microtubo previamente gelado. Essa mistura foi incubada por 30 minutos no gelo e submetida a um choque térmico de 45 segundos a 42° C em banho-seco e 2 minutos no gelo. Após o choque térmico o conteúdo foi plaqueado em meio LB/ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.2.3 Seleção dos Clones

Após a transformação das construções em células competentes de *E. coli* DH5 α [™], foram escolhidas aleatoriamente 5 colônias de bactérias para confirmação da ligação por amplificação (PCR). A amplificação do DNA foi realizada usando a DNA polimerase KOD com a seguinte reação: 5,0 μL de tampão KOD 10 \times , 5,0 μL de dNTP 2 mM, 2,0 μL de MgSO₄ 25 mM, 1,5 μL de cada *primer* (10 pmol/ μL), 1,0 μL KOD (1 U/ μL), 34 μL de água ultrapura autoclavada e uma parte da colônia selecionada. Essa reação foi submetida a um ciclo de 94° C por 2 minutos e 30 ciclos de 94° C por 15 segundos e 68° C por 2 minutos. Os produtos da amplificação foram confirmados por eletroforese em gel de agarose e os clones positivos foram cultivados e usados para extração de DNA plasmidial (método descrito a seguir), para posterior uso na transfecção de células de mamíferos e posteriores ensaios.

4.2.4 Extração de DNA Plasmidial

A extração de DNA plasmidial das bactérias transformadas para estoque do mesmo foi realizada com o *kit* “PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep” (ThermoFisher Scientific, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O DNA plasmidial foi eluído em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,1 mM), sendo conservado a -20° C até sua utilização nas transfecções em células de mamíferos subsequentes.

4.2.5 Cultura de Células de Mamíferos

Células COS-1, linhagem celular de fibroblastos derivadas do tecido de rim de macaco, foram cultivadas em 10 mL de meio “*Dulbecco’s Modified Eagle*” alta concentração de glicose com L-glutamina e vermelho de fenol (D-MEM) (Wako, Japão) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich®, EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Wako, Japão) numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37° C numa placa de 100 mm até 80% a 100% de células confluentes.

4.2.6 Transfecção Celular

Após o crescimento das células, as células confluentes foram lavadas com 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS) 0,01 M pH 7,4 (Takara, Japão); dissociadas com 1 mL de tripsina 0,25% e de EDTA 0,02% numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37° C por 1–2 minutos. Em seguida as células foram ressuspensas com 5 mL de D-MEM com alta concentração de glicose suplementado e centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos a 4° C. O *pellet* foi ressuspensado em 4 mL de D-MEM com alta concentração de glicose suplementado, sendo a contagem celular realizada num contador automático TC20™ (Bio-Rad, EUA) e checado por microscopia para determinar as diluições de $0,1 \times 10^6$ células/mL. Após crescimento *overnight* das células numa placa de 100 mm ou 35 mm (dependendo do experimento a ser realizado) numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37° C, procedemos com a transfecção. A transfecção foi realizada usando o reagente Lipofectamine® 3000 (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Cada construção foi transfectada em culturas celulares 70 a 90% confluentes, e as células transfectadas foram usadas em cada experimento após incubação *overnight* numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37° C.

4.2.7 Medida em Tempo Real da Bioluminescência em Luminômetro

Numa placa de 96 poços com células COS-1 transfectadas com pCMV-Mac:cito, pCMV-Mac e pCMV-Mac:NLS, medimos a bioluminescência de cada construção usando 10 μL de D-luciferina (Wako, Japão) 10 mM diluída em D-MEM alta concentração de glicose. A atividade da bioluminescência foi medida no luminômetro Phelios AB-2350 (ATTO, Japão) por 10–20 segundos na ausência ($F0$) ou presença de filtros de corte de 560 nm ($F1$) e 600 nm ($F2$) a 37° C. A medida das atividades bioluminescentes raciométricas com a luciferase pH-sensitiva foi realizada usando os filtros de corte >560 nm e >600 nm ($O56$ e $R60$). Primeiro, o total das unidades relativas de luz (RLU) foi medida na ausência dos filtros ($F0$). Então, o valor $F1$ que passou através do filtro $O56$ foi medido e, finalmente, o valor $F2$ que passou através do filtro $R60$ foi medido. Cada atividade luciferásica foi calculada usando a equação simultânea pela substituição dos valores de $F0$, $F1$ e $F2$:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \\ F2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ \kappa G_{O56} & \kappa O_{O56} & \kappa R_{O56} \\ \kappa G_{R60} & \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix}$$

onde G , O e R são as atividades da emissão de luz –verde, –laranja e –vermelha, respectivamente; κG_{O56} , κO_{O56} e κR_{O56} são os coeficientes de transmissão –verde, –laranja e –vermelha da emissão das luciferases do filtro $O56$, respectivamente; e κG_{R60} , κO_{R60} , e κR_{R60} são os coeficientes de transmissão –verde, –laranja e –vermelha da emissão das luciferases do filtro $R60$, respectivamente (NAKAJIMA & OHMIYA, 2010).

4.2.8 Efeito do pH na Cor da Bioluminescência das Células

Numa placa de 35 mm com células COS-1 cultivadas e transfectadas com pCMV-Mac:cito, medimos a cor da bioluminescência em tampão de calibração (BOND & VARLEY, 2005) em diferentes pHs (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) na presença do ionóforo nigericina¹ a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Wako, Japão). O tampão de calibração é um tampão fosfato de potássio 135 mM contendo MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, glucose 10 mM e NaCl 20 mM. Para o ensaio, o meio no qual as células estavam sendo cultivadas foi removido e foram acrescentados 2 mL de cada tampão de calibração em diferentes pHs, individualmente, e após 5 minutos de incubação das células nos tampões (tempo necessário para que a nigericina mantenha o equilíbrio do pH externo e interno da célula (THOMAS *et al.*, 1979)) e adição de 2 μL de D-luciferina 0,10 M, a atividade da bioluminescência foi medida no luminômetro Kronos AB-2500 (ATTO, Japão)

¹ Nigericina é um ionóforo K^+/H^+ que permite o equilíbrio dos valores do pH interno e externo das células (THOMAS *et al.*, 1979; NACIRI & AL-RUBEIAI, 2006; TANTAMA *et al.*, 2011).

por 10 segundos em intervalos de 4 minutos por 1 hora na ausência ($F0$) e presença dos filtros de corte a 560 nm ($F1$) e 620 nm ($F2$) a 37° C. Calculamos então a média da razão das intensidades $F1/F0$ e $F2/F0$ para estimar o pH intracelular por meio da curva padrão.

4.2.9 Medida da Bioluminescência de uma Única Célula

Com o fim de analisar a aplicabilidade do uso da luciferase de *Macrolampis* sp2 na análise celular em tempo real, analisamos a bioluminescência de uma única célula (células COS-1 transfectadas com pCMV-Mac:cito, pCMV-Mac e pCMV-Mac:NLS numa placa de 35 mm com base de vidro) e durante os processos de divisão celular e apoptose por um sistema de imageamento da luminescência de caminho óptico duplo para detecção de baixos níveis de emissão com o uso da EM-CCD câmera ultra sensível – Cellgraph AB-3000B (ATTO, Japão) a 37° C. A análise foi realizada pelo espectro de transmissão de $F4$ e $F5$, um espelho dicróico que detecta a intensidade da bioluminescência nos comprimentos de onda antes ($F5$) e depois ($F4$) de 590 nm. As intensidades de luminescência verde e vermelha (G e R) de diferentes emissões de luz nas células vivas foram calculadas por meio da seguinte equação:

$$\begin{pmatrix} F4 \\ F5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \kappa Rr & \kappa Gr \\ \kappa Rt & \kappa Gt \end{pmatrix} \begin{pmatrix} R \\ G \end{pmatrix}$$

onde $F4$ e $F5$ são as unidades relativas de luz (RLU) dos componentes de luz refletidos pelo espelho dicróico ou que passam através dele, respectivamente; similarmente, κRr e κRt são as razões de RLU da luminescência vermelha que são refletidas ou passam através do espelho e κGr and κGt são as razões de RLU da luminescência verde refletidas ou passam através do espelho. Baseado no cálculo acima, os componentes verde e vermelho podem ser reconstituídos e visualizados como uma imagem bicolor (KWON *et al.*, 2010).

Para isso, o meio no qual as células estavam sendo cultivadas foi removido e foram acrescentados 2 mL D-MEM alta concentração de glicose suplementado, 50 μ L de HEPES-KOH 1 M pH 7,5 (ThermoFisher Scientific, EUA) e 2 μ L de D-luciferina 0,10 M. O tampão HEPES-KOH foi utilizado para manter o pH fisiológico da cultura, uma vez que esta ficou num ambiente sem controle dos níveis de CO₂.

Para os ensaios de análise de bioluminescência de uma única célula, foram usados de 3–5 minutos de exposição e captura instantânea da imagem; e para análise da divisão celular e apoptose, foram usados 3 minutos de exposição com captura de imagens durante 3 dias, ambos a 37° C.

4.2.10 Medidas da Cor da Bioluminescência Usando Cellgraph

Numa placa de 35 mm com base de vidro com células COS-1 transfectadas com pCMV-Mac:cito e pCMV-Mac:NLS, medimos a cor da bioluminescência em diferentes pHs do tampão de calibração contendo nigericina (pH 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0). Para isso, o meio no qual as células estavam sendo cultivadas foi removido e foram acrescentados 2 mL de cada tampão, individualmente, e após 5 minutos e adição de 2 μ L de D-luciferina 0,10 M, foram obtidas as imagens no Cellgraph com 2 minutos de exposição.

4.2.11 Espectros de Bioluminescência das Células *in vivo*

Os espectros de bioluminescência foram obtidos usando o espectroluminômetro de alta sensibilidade LumiF SpectroCapture AB-1850 com CCD câmera resfriada (ATTO, Japão) em nosso laboratório. Para esses ensaios, células COS-1 transfectadas com pCMV-Mac:cito, pCMV-Mac e pCMV-Mac:NLS cultivadas em placas de 100 mm foram lavadas com 10 mL PBS 0,01 M pH 7,4, dissociadas com 1 mL de tripsina 0,25% e de EDTA 0,02% numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37° C por 1–2 minutos e ressuspendidas com 5 mL de D-MEM alta concentração de glicose suplementado. Alíquotas de 1 mL foram coletadas em microtubos por centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos a 22° C. O *pellet* foi ressuspendido com 500 μ L de tampão de calibração em diferentes pHs contendo nigericina (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), individualmente. Após 5 minutos de incubação do tampão com as células, as medidas dos espectros de bioluminescência foram realizadas com a mistura de 90 μ L dessa solução com 10 μ L de D-luciferina 10 mM num microtubo transparente. A janela de emissão foi mantida a 1 mm, mas o tempo de integração e a sensibilidade variaram de acordo com a intensidade da luminescência da amostra, de 30 segundos a 1 minuto.

Foram medidos também os espectros de bioluminescência de cada construção (pCMV-Mac:cito, pCMV-Mac e pCMV-Mac:NLS), ressuspendendo o *pellet* em tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M, sendo os espectros obtidos após a mistura de 90 μ L dessa solução com 10 μ L de D-luciferina 10 mM num microtubo transparente.

4.2.12 Análise Raciométrica dos Espectros de Bioluminescência

A razão (R) das intensidades da bioluminescência a $\lambda_{\text{verde}} = 563 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{vermelho}} = 616 \text{ nm}$ ($R = I_{\text{verde}}/I_{\text{vermelho}}$) da luciferase de *Macrolampis* sp2 foi usada nos espectros de bioluminescência obtidos em diferentes pHs do tampão de calibração contendo nigericina em células COS-1 transfectadas com pCMV-Mac:cito. Então, o efeito do pH foi plotado como uma função dos valores de R em diferentes pHs (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0). Em seguida

estimamos o pH dos diferentes compartimentos celulares (citosol, peroxissomo e núcleo) pela medida do espectro de bioluminescência e obtenção da razão das intensidades na região do verde e vermelho de células COS-1 transfectadas com pCMV-Mac:cito, pCMV-Mac e pCMV-Mac:NLS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 USO DE LUCIFERASES pH-SENSITIVAS COMO INDICADORES DE pH EM *Escherichia coli*

As luciferases de vagalumes são pH-sensitivas, apresentando espectro na região do verde-amarelo em pH alcalino e vermelho em pH ácido (SELIGER & McELROY, 1964). De acordo com medidas de rendimento quântico, esta mudança é devido a um aumento da proporção de luz verde em pH alcalino, e ao seu decréscimo em pH ácido (ANDO *et al.*, 2008). Assim, em princípio é possível utilizar a sensibilidade ao pH para estimar o pH intracelular, conforme sugerido por Viviani e colaboradores (2008b). Desta forma, comparamos a sensibilidade ao pH de diferentes luciferases pH-sensitivas de nosso laboratório, e então investigamos se havia uma relação racionométrica entre mudança de pH e razão de intensidade de luz verde e vermelha para estas luciferases, para então inferir o pH intracelular em bactérias e células de mamíferos.

5.1.1 Efeito do pH nas Luciferases pH-Sensitivas

5.1.1.1 Efeito do pH nos espectros de bioluminescência *in vitro*

Foi analisado o efeito de diferentes pHs (pH 6,0; 7,0 e 8,0) do tampão fosfato de sódio 0,10 M no espectro de bioluminescência das luciferases de *Macrolampis* sp2, *Cratomorphus distinctus*, *Amydetes vivianii* e *Photinus pyralis*. Como esperado, a reação da luciferase *in vitro* em tampão fosfato de sódio sofre um deslocamento para a região do vermelho em pH ácido (pH 6,0) (**Fig. 3**). Essas luciferases diferem no grau de sensibilidade ao pH e na quantidade de emissão de luz vermelha em pH 8,0. Assim, a sensibilidade ao pH e a proporção de luz vermelha no espectro aumentam nas luciferases com espectro mais deslocado para o vermelho, na seguinte ordem: *A. vivianii* < *C. distinctus* < *P. pyralis* < *Macrolampis* sp2 (**Fig. 3B, D, C e A**, respectivamente).

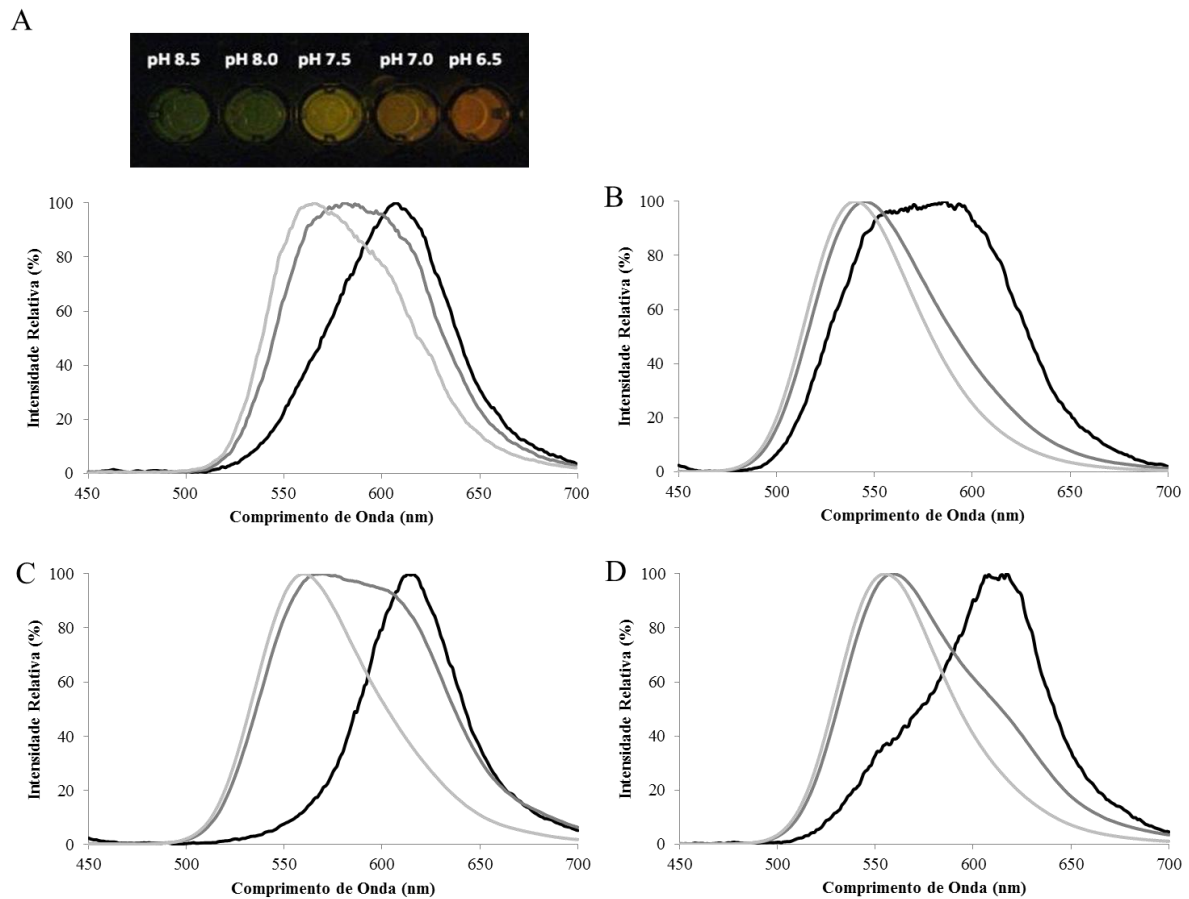


Figura 3. Efeito do pH no espectro de bioluminescência das luciferases em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 6,0 (preto), pH 7,0 (cinza escuro) e pH 8,0 (cinza claro): (A) *Macrolampis* sp2, (B) *Amydetes vivianii*, (C) *Photinus pyralis* e (D) *Cratomorphus distinctus*. No painel superior em (A) são apresentadas as diferentes cores da bioluminescência *in vitro* em diferentes pHs na luciferase de *Macrolampis* sp2.

5.1.1.2 Análise raciométrica do pH

Analizamos então a razão de intensidade da bioluminescência nas regiões do verde e do vermelho ($R = I_{\text{verde}}/I_{\text{vermelho}}$) nas luciferases de *Macrolampis* sp2 ($\lambda_{\text{verde}} = 563$ e $\lambda_{\text{vermelho}} = 616$) e *C. distinctus* ($\lambda_{\text{verde}} = 554$ e $\lambda_{\text{vermelho}} = 614$) usando diferentes tampões (citrato de sódio pH 5,5; fosfato de sódio pH 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5; Tris-HCl pH 8,0 e 8,5 e CHES pH 9,0). Como esperado, foi observado um claro aumento dessa razão em pH ácido (Fig. 4), sendo encontrada uma relação linear no intervalo entre pH 6,0 e 7,5.

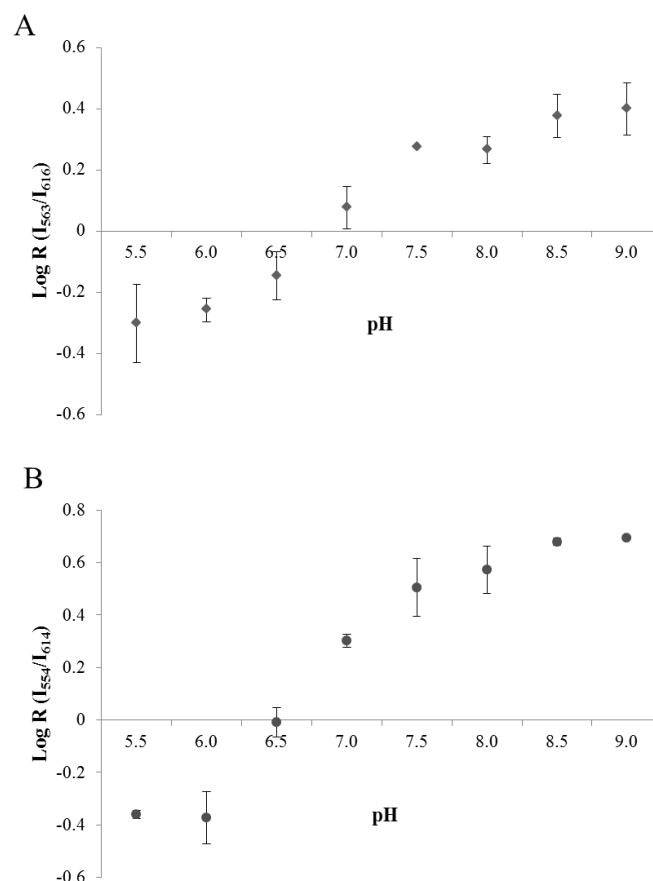


Figura 4. Relação raciométrica entre R_{pH} ($I_{verde}/I_{vermelho}$) e o pH nas luciferases: (A) *Macrolampis* sp2 e (B) *Cratomorphus distinctus*.

5.1.1.3 Espectros da bioluminescência *in vivo* de bactérias expressando luciferases pH-sensitivas

Foram analisados a cor e os espectros de bioluminescência *in vivo* de *E. coli* expressando as luciferases de *Macrolampis* sp2, *C. distinctus* e *A. vivianii* em diversos tempos (0, 30, 60, 90 e 120 segundos) para observar se há mudança de cor e deslocamento do espectro para a região do vermelho. Observou-se que a cor dos espectros *in vivo* das luciferases de *Macrolampis* sp2 e *C. distinctus* é inicialmente vermelho, deslocando-se para a região do amarelo com o tempo (Fig. 5D). Essa é uma propriedade geral das luciferases pH-sensitivas e pode ser causado pela mudança do pH intracelular causado pela entrada de luciferina em pH ácido que funciona como um importador de prótons.

No caso da luciferase de *Macrolampis* sp2, o espectro de bioluminescência *in vivo* é predominantemente vermelho com um ombro na região do verde-amarelo (Fig. 5A). Isso pode estar relacionado com o fato dessa luciferase naturalmente apresentar um espectro mais largo e deslocado para o vermelho, por isso predomina a emissão na região do vermelho dentro do ambiente celular inicialmente mais ácido (Fig. 5D,1-4). Por outro lado, a luciferase

de *C. distinctus* apresenta o espectro mais deslocado para o azul (**Fig. 5C**), emitindo inicialmente luz na região do laranja, gradualmente mudando para a região do amarelo-esverdeado (**Fig. 5D,5–8**). Uma tendência similar é observada na luciferase mutante de *Macrolampis* sp2, Mac-N354E (resultados não mostrados), cujas propriedades espectrais se assemelham às da luciferase de *Photinus pyralis* (VIVIANI *et al.*, 2005).

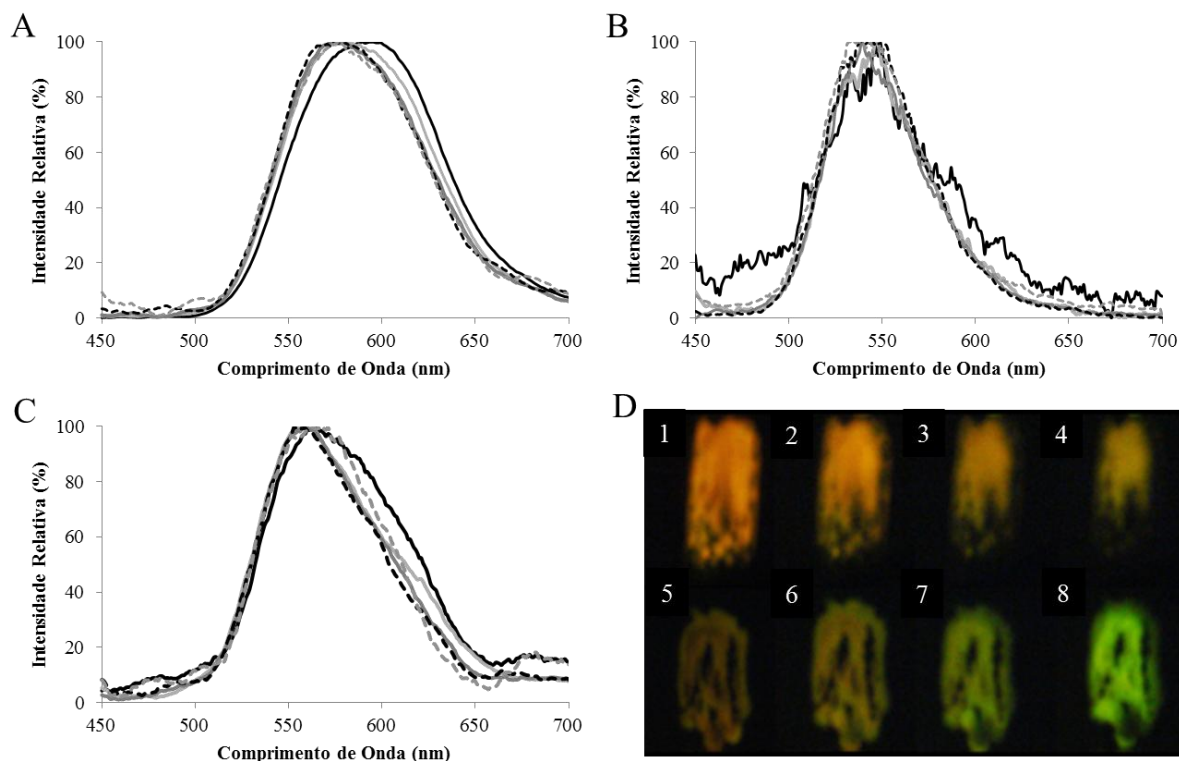


Figura 5. Espectro de bioluminescência *in vivo* de diferentes luciferases de vagalume em *E. coli*: (A) *Macrolampis* sp2, (B) *Amydetes vivianii* e (C) *Cratomorphus distinctus* a 0 segundos (—), 30 segundos (—), 60 segundos (---), 90 segundos (---) e 120 segundos (---), e (D) cor da bioluminescência de colônias de *E. coli* expressando as luciferases de vagalume após a adição de D-luciferina: (1–4) *Macrolampis* sp2: (1) imediatamente após adição de D-luciferina 1 mM, e após (2) 30 segundos, (3) 60 segundos e (4) 90 segundos; e (5–8) *C. distinctus*: (5) imediatamente após adição de D-luciferina 1 mM, e após (6) 30 segundos, (7) 60 segundos e (8) 90 segundos.

5.1.1.4 Estimativa ratiométrica de pH intracelular nas bactérias expressando luciferases

Considerando a mudança de cor da bioluminescência das bactérias (**Fig. 5**), decidimos investigar se a curva ratiométrica (**Fig. 4**) poderia ser usada para estimar o pH intracelular de *E. coli*, cujo pH relatado na literatura é em torno de 7,1. Para isto, usamos o espectro de bioluminescência de *E. coli* expressando a luciferase de *Macrolampis* sp2 (**Fig. 3A**), obtivemos o valor correspondente de R e então estimamos o pH intracelular usando relação de $\log R$ e o pH obtido pelo tampão fosfato de sódio, como mostrado na **figura 4A**.

Estimamos o pH intracelular da *E. coli* no início da emissão de luz após a adição de D-luciferina (em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0), quando uma rápida acidificação intracelular é esperada devido à importação de próton mediada por luciferina; e após 120 segundos, quando a emissão de luz é mais amarelo-esverdeada, refletindo a recuperação do pH fisiológico (pH~ 7,0). O valor do pH estimado para a *E. coli* expressando a luciferase de *Macrolampis* sp2 foi pH~ 6,8 no início da emissão de luz e pH~ 7,1 após 120 segundos, o último valor concordando razoavelmente bem com o valor reportado por Lam e colaboradores (1979) para o pH intracelular da *E. coli* (pH 7,0). Quando analisamos os valores com a luciferase de *C. distinctus*, os valores estimados do pH foram pH~ 6,7 no início e pH~ 7,1 após 120 segundos. Desse modo, a estimativa do pH intracelular usando a curva ratiométrica para essas luciferases está em concordância com os valores relatados na literatura usando outras metodologias. Por outro lado, a luciferase emissora de luz verde *A. vivianii* é muito resistente a mudanças do pH e, portanto, não adequada para estimar o pH intracelular ratiometricamente.

Embora o cálculo utilizado seja simplificado, uma vez que outros fatores como a concentração de fosfato, a presença de metais e a temperatura podem interferir no espectro de bioluminescência *in vivo*, os resultados apresentados aqui claramente mostraram a viabilidade do uso da luciferase de *Macrolampis* sp2 e outras luciferases pH-sensitivas para a estimativa ratiométrica do pH intracelular. Para analisar a contribuição dessas outras variáveis no espectro de bioluminescência *in vivo*, também analisamos o efeito da concentração de fosfato, da concentração de metais e da temperatura na emissão de luz.

5.1.2 Efeito do Fosfato nos Espectros de Bioluminescência das Luciferases pH-Sensitivas

Para avaliar se há contribuição do efeito da concentração de fosfato no espectro de bioluminescência *in vivo* das luciferases, uma vez que se sabe que o tampão fosfato desloca o espectro de bioluminescência *in vitro* para o vermelho (SELIGER & McELROY, 1964), analisamos seu efeito no espectro de bioluminescência *in vitro* comparando com o tampão Tris-HCl. No caso da luciferase de *Macrolampis* sp2, o espectro em tampão Tris-HCl 0,10 M pH 8,0 apresenta um pico estreito em 564 nm, enquanto que em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 8,0 o espectro é muito mais amplo e deslocado para o vermelho (**Fig. 6**). Uma vez que um dos principais tampões dentro das células vivas é o fosfato, o espectro de bioluminescência *in vivo* é naturalmente esperado que seja mais amplo e deslocado para o vermelho. A concentração intracelular estimada de fosfato em células vivas normais de *E. coli* é em torno de 5 mM (NELSON & COX, 2006), portanto nesta concentração pouco efeito é

esperado. Após a morte celular, porém, a concentração de fosfato poderia aumentar consideravelmente devido à hidrólise de nucleotídeos fosfato e outros polifosfatos, os quais podem diminuir o pH, conseqüentemente contribuindo para o deslocamento para o vermelho do espectro de bioluminescência, o que é observado quando os vagalumes estão morrendo.

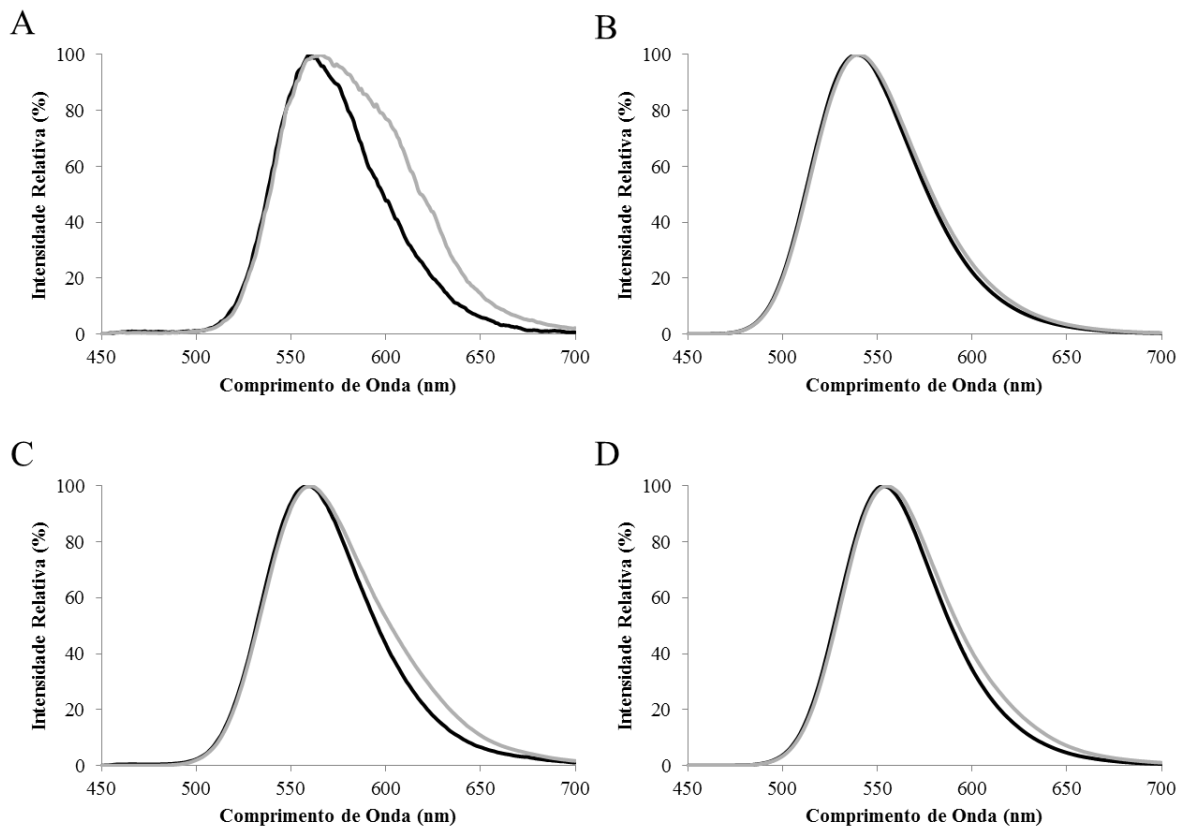


Figura 6. Efeito dos tampões fosfato de sódio (cinza claro) e Tris-HCl (cinza escuro), ambos na concentração de 0,10 M em pH 8,0, no espectro de bioluminescência das luciferases: (A) *Macrolampis* sp2, (B) *Amydetes vivianii*, (C) *Photinus pyralis* e (D) *Cratomorphus distinctus*.

5.1.3 Efeito da Temperatura nos Espectros de Bioluminescência da Luciferase de *Macrolampis* sp2

Para avaliar o efeito da temperatura na razão de intensidades ($R_{pH} = I_{verde}/I_{vermelho}$), analisamos os espectros de bioluminescência em diferentes temperaturas, de 5° C a 35° C. Como esperado, observamos que altas temperaturas deslocam o espectro para o vermelho, diminuindo conseqüentemente o valor de R (Fig. 7). Uma relação linear entre R e a temperatura foi obtida (Fig. 7B).

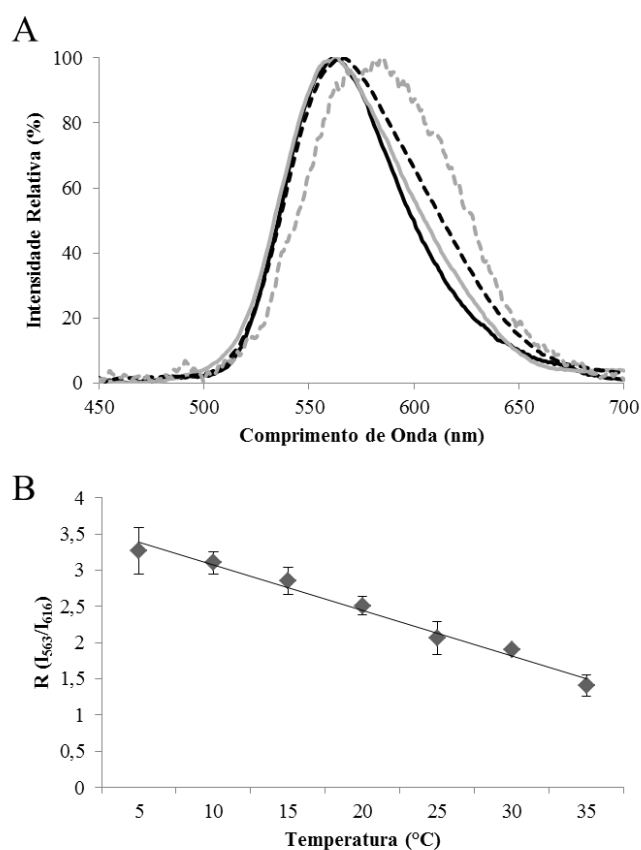


Figura 7. Efeito da temperatura no espectro de bioluminescência de *E. coli* expressando a luciferase de *Macrolampis* sp2: (A) efeito da temperatura no espectro de bioluminescência em 5° C (—), 10° C (—), 25° C (---) e 35° C (---), e (B) efeito da temperatura na razão (R) de intensidade da bioluminescência a 563 nm e 616 nm (coeficiente de correlação $\rho = -0,992$).

Esses resultados abrem também a possibilidade para o uso da luciferase de *Macrolampis* sp2 e outras luciferases de vagalumes como sensor de temperatura na escala de 5–35° C. Podem também alertar para a necessidade de se controlar a temperatura quando se estima o pH intracelular, fornecendo um fator para compensação pela temperatura.

5.1.4 Sensibilidade de Detecção do Ensaio Raciométrico das Luciferases pH-Sensitivas

A sensibilidade do ensaio bacteriano *in vivo* usando esse sistema *E. coli*/pPro-Mac foi previamente analisado por imageamento em câmera CCD e luminometria, pela contagem do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) capaz de produzir um sinal bioluminescente detectável (GABRIEL *et al.*, 2014). Por luminometria, usando nosso equipamento, podem ser detectadas >10 UFC/mL com um sinal acima de 500, uma vez que a linha de base do equipamento é em torno de 100 cps. Usando um espectrômetro sensível, a quantidade mínima de células bacterianas estimada para produzir um espectro detectável foi de 5×10^4 UFC, correspondendo ao sinal de 1×10^5 cps. O aproveitamento da sensibilidade

desse método usando a *E. coli* expressando as luciferases para análise intracelular em células eucarióticas, especialmente células de mamíferos, é portanto promissor. Considerando que (I) células eucarióticas podem ter mais de 1.000 vezes o volume de células bacterianas, (II) mitocôndrias têm aproximadamente o volume de uma bactéria, e (III) uma típica célula de mamífero, como os hepatócitos, pode ter 1.000–2.000 mitocôndrias, o direcionamento celular da luciferase para a mitocôndria, poderia, em princípio, permitir avaliar as alterações espectrais que ocorrem em no mínimo 10 hepatócitos. Pelo aumento do tempo e da sensibilidade do sistema de detecção e da atividade da luciferase, esse limite poderia ser facilmente estendido para uma única célula de mamífero, proporcionando assim uma tecnologia de inovação para o imageamento em tempo real de uma única célula.

Assim, neste trabalho demonstramos pela primeira vez a viabilidade do uso de luciferases de vagalumes e sua sensibilidade espectral ao pH para análise ratiométrica do pH intracelular na escala entre os pHs 6,0 e 9,0 em células de *E. coli*. Essa metodologia fornece uma abordagem simples e direta usando um único gene de luciferase pH-sensitiva para estimar o pH intracelular na escala fisiológica. As luciferases dos vagalumes brasileiros *Macrolampis* sp2 e *C. distinctus* mostraram-se especialmente adequadas para esse propósito.

Essa nova metodologia baseada num único gene repórter de luciferase tem grande potencial de ser utilizada em ensaios celulares e imagem *in vivo* em tempo real, fornecendo uma importante informação adicional sobre a fisiologia celular em células vivas e morte celular ou de tecidos, e em processos patológicos. Entretanto, a implementação dessa tecnologia requer o uso de equipamentos relativamente caros como luminômetros com filtros, câmeras CCD sensíveis, microscópios de bioluminescência ou novos sistemas de imagem com espectrômetros acoplados.

5.2 EXPRESSÃO DA LUCIFERASE DE *Macrolampis* sp2 PARA A DETERMINAÇÃO DE pH EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Considerando a cooperação oficial existente entre o Laboratório do Prof. Dr. Viviani e o AIST (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology de Tsukuba no Japão), especializado em tecnologias biofotônicas e expressão de luciferases em células de mamíferos, decidimos analisar a viabilidade de uso da luciferase de *Macrolampis* sp2 para avaliar o pH intracelular em células de mamíferos.

5.2.1 Atividade da Bioluminescência da Luciferase de *Macrolampis* sp2 em Células de Mamíferos

Primeiramente analisamos a atividade *in vivo* da bioluminescência de células COS-1 transfectadas com as construções de *Macrolampis* sp2 pCMV-Mac:cito, pCMV-Mac:NLS e pCMV-Mac usando D-luciferina 10 mM (**Fig. 8**) na ausência (*F0*) e presença de filtros de corte a 560 nm (*F1*) e 600 nm (*F2*) no luminômetro Phelios AB-2350. Entre as construções, pCMV-Mac:cito apresentou a maior atividade bioluminescente, seguido de pCMV-Mac:NLS e pCMV-Mac.

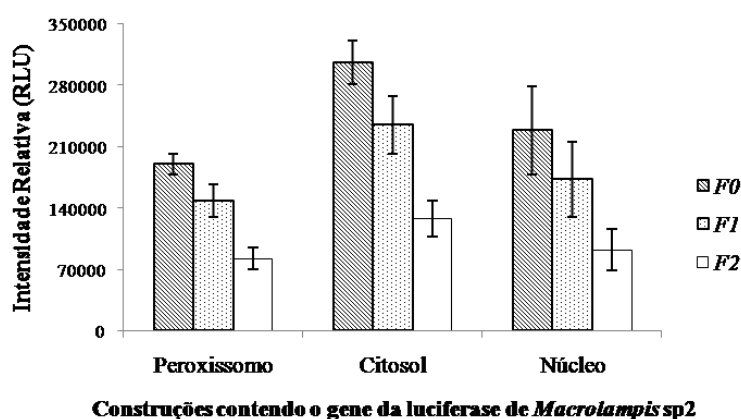


Figura 8. Atividade da bioluminescência na ausência (*F0*) e presença de filtros de corte a 560 nm (*F1*) e 600 nm (*F2*) de células COS-1 carregando as construções de *Macrolampis* sp2 usando D-luciferina 10 mM.

5.2.2 Análise Luminométrica do Efeito do pH na Cor da Bioluminescência *in vivo*

Analisamos o efeito do pH na bioluminescência *in vivo* de células COS-1 transfectadas com a construção pCMV-Mac:cito na presença de nigericina, um ionóforo K^+/H^+ , no tampão de calibração em diferentes pHs (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) a fim de obter uma curva de calibração para estimar o pH intracelular da célula. O ionóforo nigericina permite o equilíbrio do pH intracelular e extracelular através da troca do K^+ interno com o H^+ externo (THOMAS *et al.*, 1979), sendo usado no tampão de calibração na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$.

A intensidade a diferentes comprimentos de onda foi medida usando o luminômetro Kronos AB-2500 na ausência (*F0*) ou presença de filtros de corte a 560 nm (*F1*) e 620 nm (*F2*) a 37° C durante 1 hora. O pH foi estimado usando a curva padrão na qual calculamos a média da razão das intensidades $F1/F0$ e $F2/F0$ para estimar o pH intracelular (**Fig. 9**).

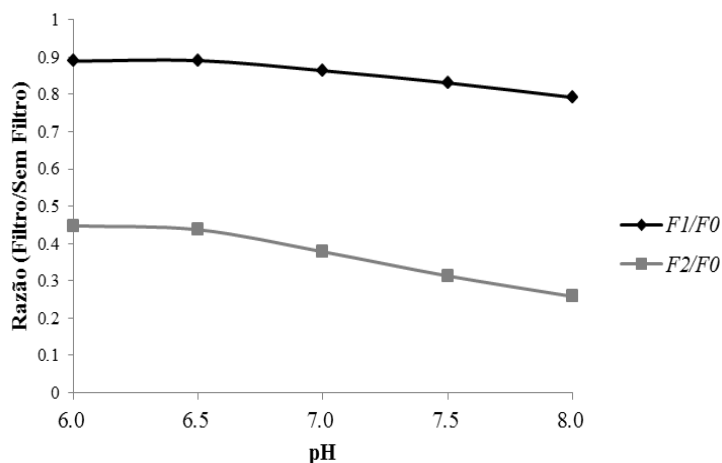


Figura 9. Curva padrão ($F1/F0$ e $F2/F0$) de células COS-1 transfetadas com pCMV-Mac:cito em pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. A nigericina foi usada no tampão de calibração e a medida foi realizada durante 10 segundos usando o luminômetro Kronos na ausência ($F0$) e presença de filtros de corte ($F1$ a 560 nm e $F2$ a 620 nm) após adição de D-luciferin 0,10 M durante 1 hora.

Com essa curva padrão pudemos estimar o pH de cada compartimento celular (citossol, peroxissomo e núcleo) pela medida da intensidade da bioluminescência em diferentes comprimentos de onda e obtendo a razão de células COS-1 transfetadas com as construções pCMV-Mac:cito, pCMV-Mac:NLS e pCMV-Mac. Os resultados indicam que o pH do citossol é em torno de pH 7,4–7,5, enquanto que o pH do núcleo e do peroxissomo é em torno de pH 7,5–7,6.

5.2.3 Espectro de Bioluminescência *in vivo* da Luciferase de *Macrolampis sp2* em Células de Mamíferos

Analizamos também o efeito de diferentes pHs no espectro de bioluminescência de células COS-1 transfetadas com as construções pCMV-Mac:cito, pCMV-Mac:NLS e pCMV-Mac (**Fig. 10A, B e C**, respectivamente) com tampão de calibração contendo nigericina em diferentes pHs (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) para observar o deslocamento para o vermelho esperado em pH ácido.

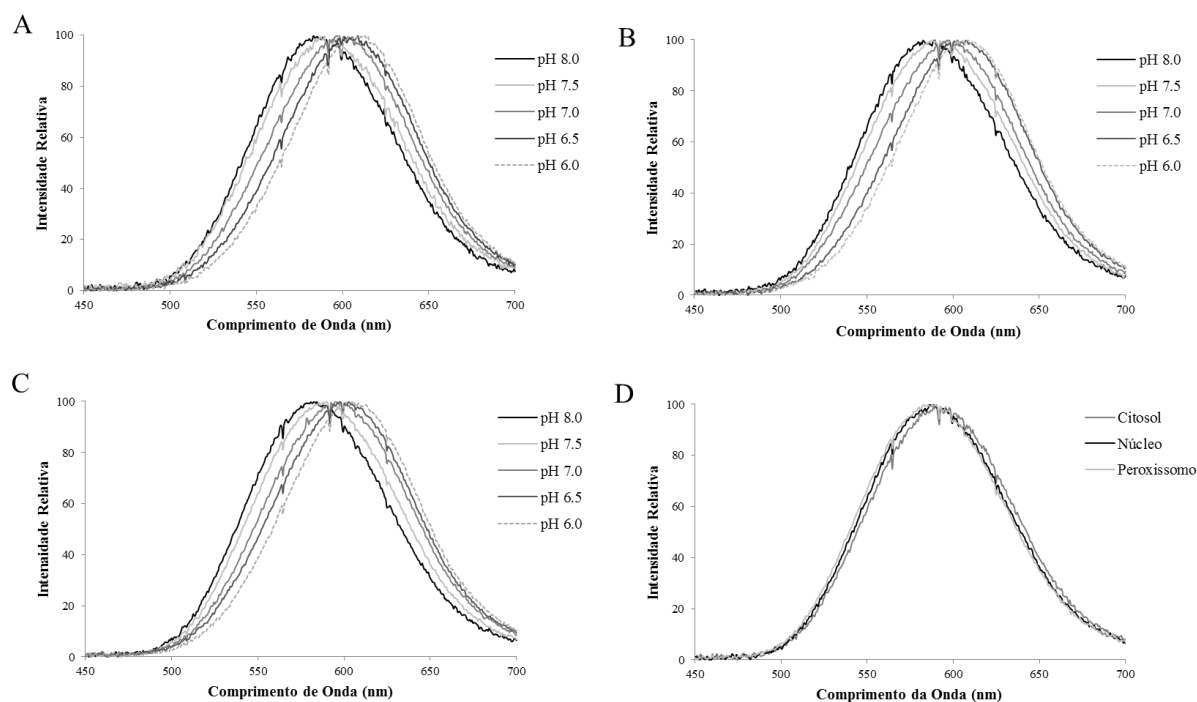


Figura 10. Efeito do pH no espectro de bioluminescência de células COS-1 transfetadas com as construções de *Macrolampis* sp2: (A) pCMV-Mac:cito, (B) pCMV-Mac:NLS e (C) pCMV-Mac usando tampão de calibração contendo nigericina em diferentes pHs (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), e (D) espectro de bioluminescência das construções de *Macrolampis* sp2 (alvos ao citosol, núcleo e peroxissomo) usando tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M.

Similarmente a bactérias expressando a luciferase de *Macrolampis* sp2, um deslocamento para o vermelho pôde ser observado no espectro de bioluminescência de células COS-1 transfetadas. Dentre as células expressando a luciferase em diferentes compartimentos (pCMV-Mac:cito, pCMV-Mac:NLS e pCMV-Mac) em tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M, as que expressavam a luciferase no citosol (pCMV-Mac:cito) apresentaram um maior deslocamento do espectro para o vermelho, indicando que o pH do citosol é mais ácido do que das outras organelas (peroxissomo e núcleo) (Fig. 10D). O pH 7,4 do tampão utilizado é o mesmo no qual a célula é cultivada, sendo usado com o objetivo de verificar o espectro de bioluminescência de cada compartimento celular, sem controle do pH interno da célula.

5.2.4 Medida Raciométrica do pH

Analizamos a relação entre o pH e a razão de intensidades do espectro de bioluminescência na região do verde e do vermelho ($\lambda_{\text{verde}} = 563 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{vermelho}} = 616 \text{ nm}$ ($R = I_{\text{verde}}/I_{\text{vermelho}}$)) em células COS-1 transfetadas com a construção de *Macrolampis* sp2 pCMV-Mac:cito a fim de saber se essa relação poderia ser usada para estimar o pH em células de mamíferos vivas, como foi previamente feito em células de *E. coli*. A razão das intensidades

da bioluminescência nas regiões do verde e do vermelho claramente aumentou em pH ácido (Fig. 11).

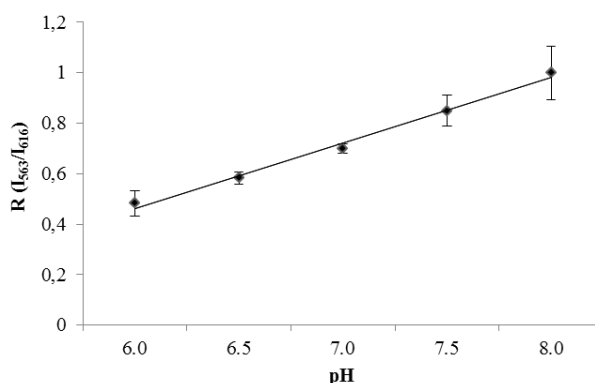


Figura 11. Relação ratiométrica de $R = (I_{\text{verde}}/I_{\text{vermelho}})$ e o pH em células COS-1 transfectadas com pCMV-Mac:cito.

Então estimamos o valor do pH intracelular de cada compartimento celular (citosol, núcleo e peroxissomo) por meio da razão ($R = I_{\text{verde}}/I_{\text{vermelho}}$) de células COS-1 transfectadas com as construções pCMV-Mac:cito, pCMV-Mac:NLS e pCMV-Mac; novamente indicando que o pH do citosol é mais ácido do que do núcleo e peroxissomo (pH~ 7,6 para o citosol e pH~ 8,0 para o núcleo e peroxissomo). Esses resultados concordam com os encontrados na literatura, nos quais o citosol apresenta um pH em torno de pH 7,0–7,5 (CODY *et al.*, 1993; SEKSEK & BOLARD, 1996; DANSEN *et al.*, 2000; BALUT *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2012), aquele do núcleo em torno de pH 7,6–7,8 (CODY *et al.*, 1993; SEKSEK & BOLARD, 1996) e do peroxissomo entre pH 6,9–8,2 (DANSEN *et al.*, 2000; JANKOWSKI *et al.*, 2001). Essa variação no pH do peroxissomo poderia ser explicada pela alta permeabilidade da membrana peroxissomal a equivalentes ácidos, e também por diferenças nas concentrações de K^+ no peroxissomo e no citosol (JANKOWSKI *et al.*, 2001).

Considerando que o pH fisiológico é em torno de pH 6,5 a 8,5 (BIZZARRI *et al.*, 2006), a luciferase de *Macrolampis sp2* e sua curva ratiométrica pode ser seguramente usada para estimar variações do pH intracelular em células de mamíferos.

5.2.5 Imagem da Mudança de pH pela Cor da Bioluminescência em uma Única Célula

A fim de observar a oscilação de pH a nível de uma única célula, analisamos também a bioluminescência *in vivo* de uma única célula usando o microscópio de bioluminescência Cellgraph, o qual possui uma câmera EM-CCD ultrasensível. As imagens foram obtidas usando um espelho dicróico que detecta a intensidade da bioluminescência nos comprimentos de onda antes (F5) e após (F4) 590 nm, respectivamente, permitindo distinguir entre as

emissões verde e vermelha. Baseado nas imagens pudemos observar diferentes intensidades de emissão da luz verde no centro das células COS-1 transfectadas com as construções da luciferase de *Macrolampis* sp2: pCMV-Mac (**Fig. 12A**), pCMV-Mac:cito (**Fig. 12B**) e pCMV-Mac:NLS (**Fig. 12C**).

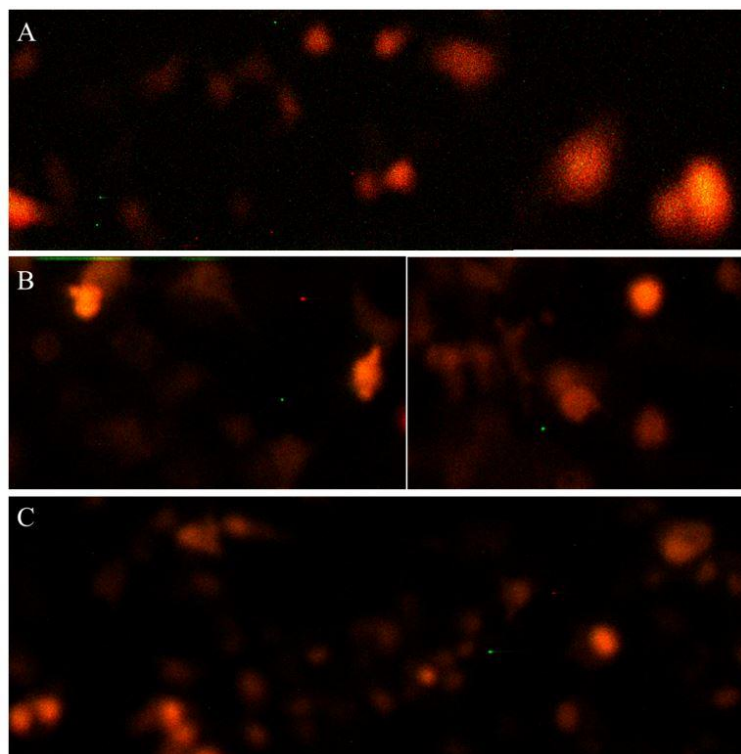


Figura 12. Imagem da bioluminescência de uma única célula COS-1 transfectada com as construções da luciferase de *Macrolampis* sp2 usando Cellgraph com espelho dicróico: (A) pCMV-Mac, (B) pCMV-Mac:cito e (C) pCMV-Mac:NLS. Imagens foram obtidas usando: (A) 3 minutos do tempo de exposição e (B e C) 5 minutos do tempo de exposição com lentes objetivas de 40 \times .

Também analisamos o efeito do pH na cor da bioluminescência *in vivo* usando células COS-1 transfectadas com as construções de *Macrolampis* sp2 pCMV-Mac:cito e pCMV-Mac:NLS na presença de nigericina, um ionóforo K^+/H^+ , no tampão de calibração em diferentes pHs (pH 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) a fim de determinar a variação de cor em diferentes pHs e estimar o pH intracelular.

A cor da bioluminescência *in vivo* em diferentes pHs foi determinada usando o Cellgraph, onde podemos claramente observar a diferença das emissões verde e vermelha: emissão verde tornando-se mais intensa em pH 8,0 e a emissão vermelha predomina em pH 6,5 (**Fig. 13**). Esses resultados são bastante similares aos previamente encontrados para *E. coli* expressando a luciferase de *Macrolampis* sp2 e confirma que a variação da cor da bioluminescência em diferentes pHs é baseado na mudança da quantidade da emissão verde conforme ocorre variação do pH.

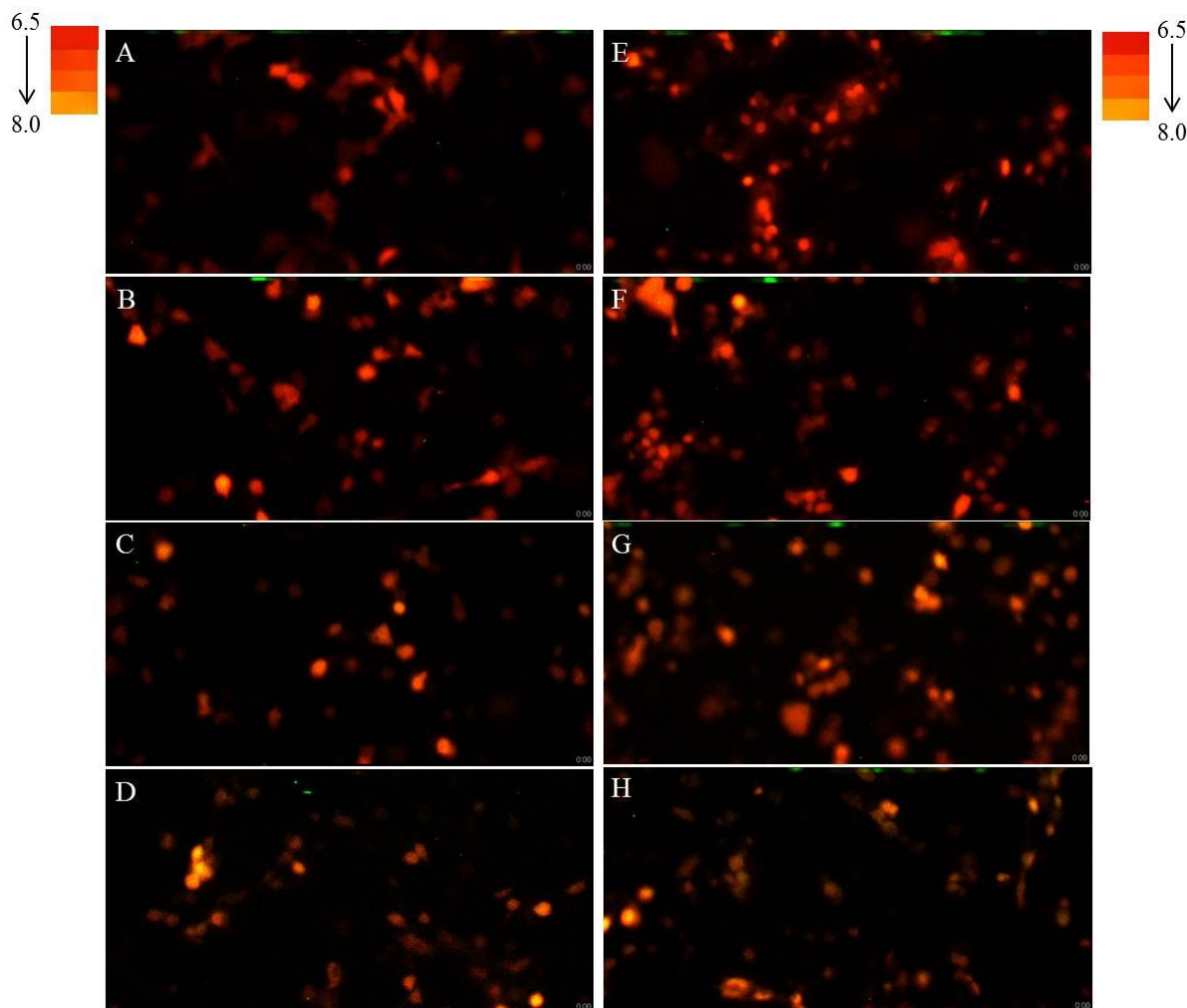


Figura 13. Variação da cor da bioluminescência *in vivo* de células COS-1 expressando as construções de *Macrolampis* sp2 pCMV-Mac:cito (painéis da esquerda de **A** a **D**) e pCMV-Mac:NLS (painéis da direita de **E** a **H**) em diferentes pHs usando o tampão de calibração contendo nigericina: (**A** e **E**) pH 6,5; (**B** e **F**) pH 7,0; (**C** e **G**) pH 7,5 e (**D** e **H**) pH 8,0. Imagens obtidas após 2 minutos do tempo de exposição com lentes objetivas 40 \times .

5.2.6 Imagem por Bioluminescência de Variações de pH Intracelular Durante a Divisão Celular e Apoptose

A determinação do pH intracelular em células vivas é muito importante para o estudo de algumas condições metabólicas celulares e conhecimento de alguns processos fisiológicos e patológicos. Apoptose, proliferação celular, atividade enzimática, entre outros, são processos que requerem um pH intracelular regulado, uma vez que um pH anormal pode causar disfunção de algumas organelas e está associado com várias doenças como câncer, Alzheimer e inflamação (YANG *et al.*, 2014).

Assim, investigamos se ocorrem variações do pH intracelular durante a divisão celular e/ou morte celular, de acordo com a variação da cor da bioluminescência. Para esse propósito, analisamos a bioluminescência de células COS-1 expressando pCMV-Mac:cito e pCMV-Mac:NLS durante 3 dias no Cellgraph usando o espelho dicróico. Durante a divisão celular

(Fig. 14, 15 e 16) e apoptose (Fig. 17 e 18), a cor da bioluminescência citoplasmática e nuclear ficou mais amarelada, indicando que o pH da célula nesta condição se torna mais alcalino.

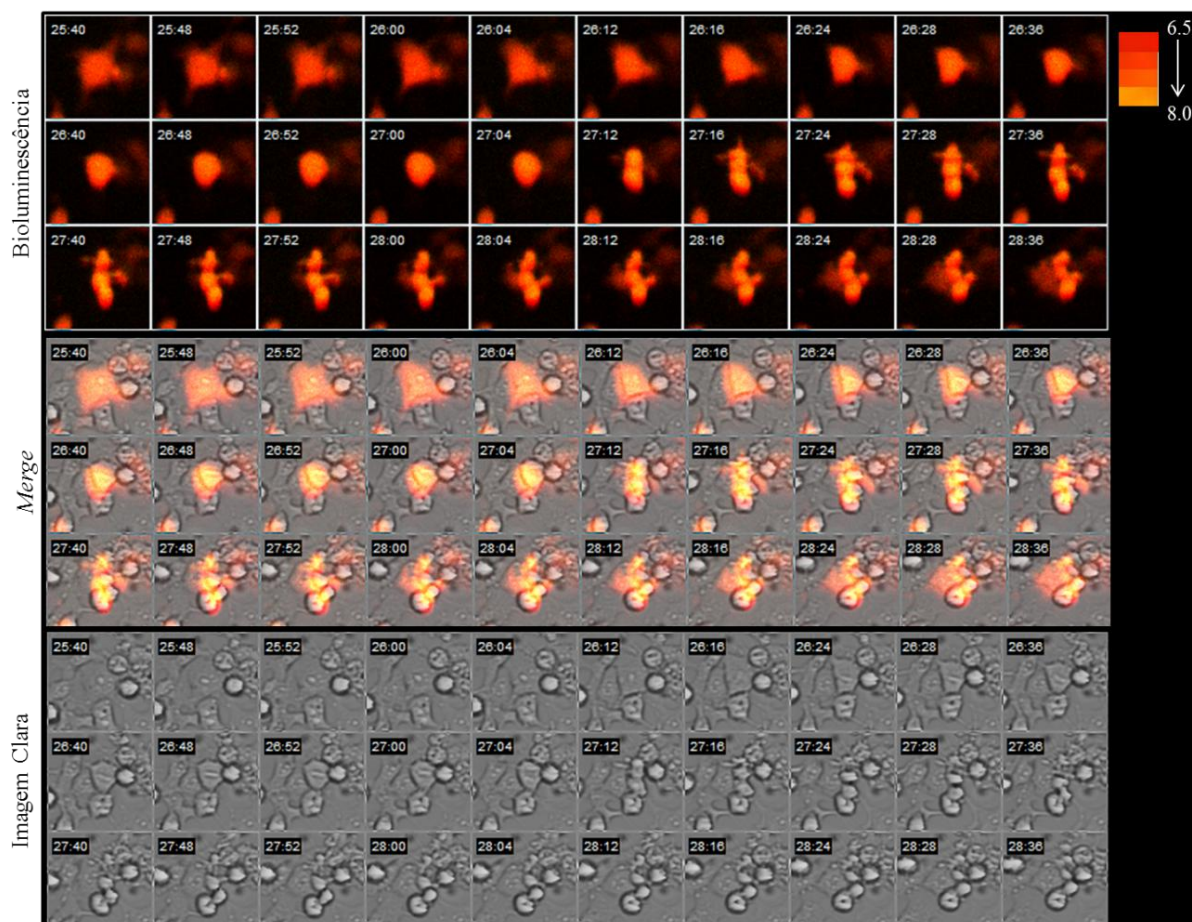


Figura 14. Imagem temporal da variação da cor da bioluminescência durante a divisão celular de células COS-1 transfectadas com a construção pCMV-Mac:cito no Cellgraph com o espelho dicróico. Imagens foram obtidas usando o tempo de exposição de 3 minutos em intervalos de 4 minutos com lente objetiva 20×. Na parte superior podemos ver a imagem da bioluminescência das células, seguido da combinação da luminescência com a imagem clara (*merge* das imagens das emissões verde e vermelha) e a imagem clara. Números indicam horas.

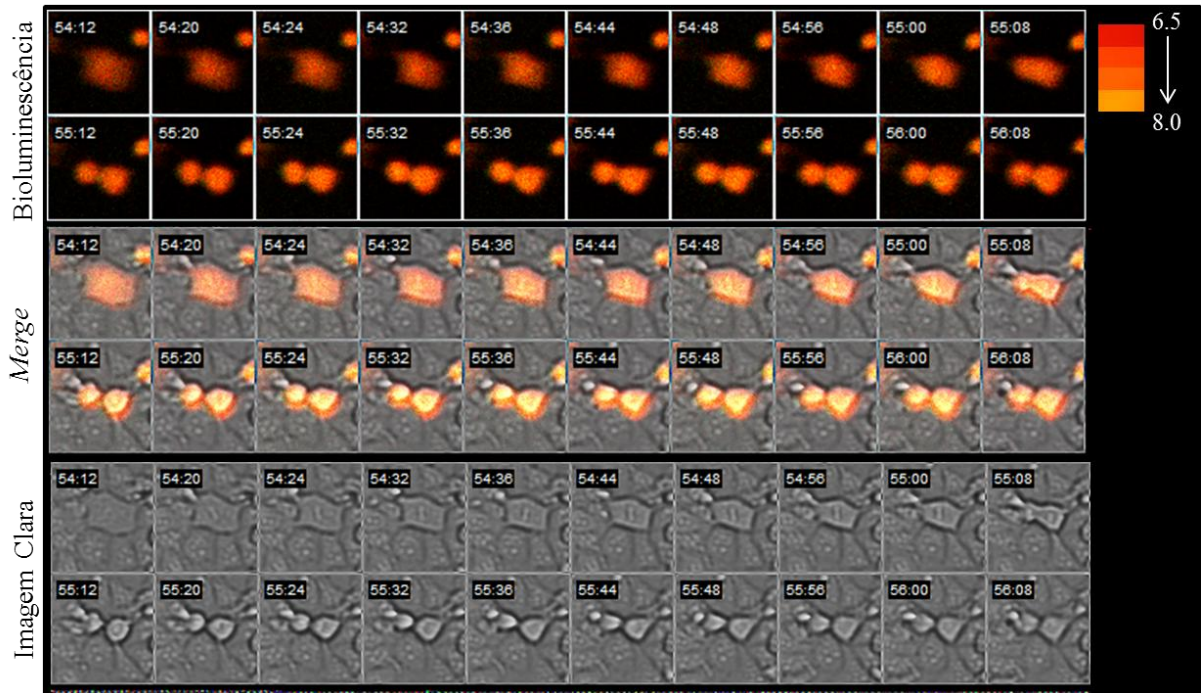


Figura 15. Imagem temporal da variação da cor da bioluminescência durante a divisão celular de células COS-1 transfetadas com a construção pCMV-Mac:NLS no Cellgraph com o espelho dicróico. Imagens foram obtidas usando o tempo de exposição de 3 minutos em intervalos de 4 minutos com lente objetiva 20 \times . Na parte superior podemos ver a imagem da bioluminescência das células, seguido da combinação da luminescência com a imagem clara (*merge* das imagens das emissões verde e vermelha) e a imagem clara. Números indicam horas.

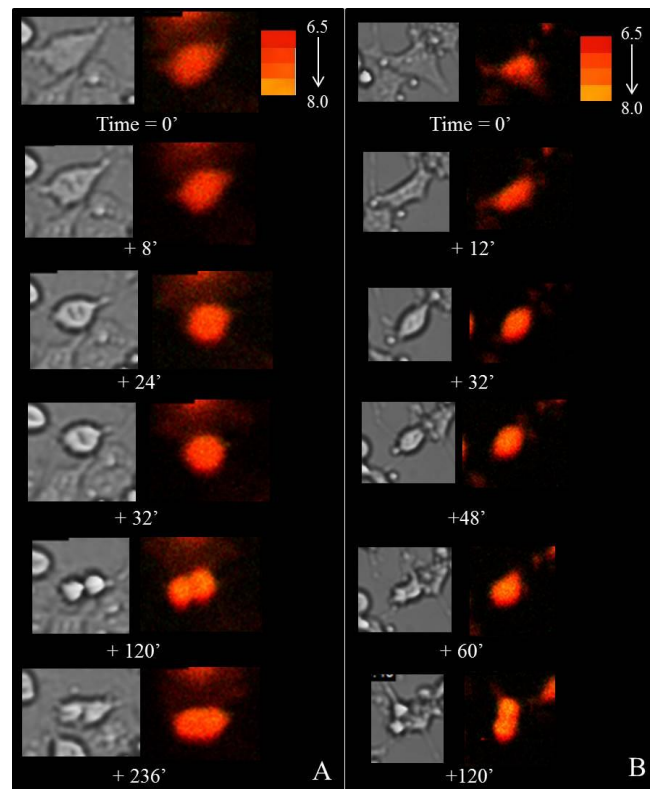


Figura 16. Imagem temporal da variação da cor da bioluminescência durante a divisão celular de células COS-1 transfetadas com as construções: (A) pCMV-Mac:cito e (B) pCMV-Mac:NLS no Cellgraph com o espelho dicróico. Imagens claras nas colunas à esquerda e bioluminescência nas colunas à direita. Imagens foram obtidas usando o tempo de exposição de 3 minutos em intervalos de 4 minutos com lente objetiva 20 \times .

De acordo com estudos anteriores, o pH intracelular varia durante o ciclo celular: sendo mais alcalino durante a proliferação celular (McQUEEN & BAILEY, 1991; GOTTLIEB, 1996; ISHAQUE & AL-RUBEAI, 1998; BIZZARRI *et al.*, 2006) nas fases S, G2 e M (MUSGROVE *et al.*, 1987; ISHAQUE & AL-RUBEAI, 1998), enquanto que ocorre uma acidificação do pH intracelular durante a fase G1/G0, aproximadamente 0,2 unidades de pH comparado com a fase S que está associada com a inibição do crescimento celular e apoptose (MUSGROVE *et al.*, 1987; McQUEEN & BAILEY, 1991; ISHAQUE & AL-RUBEAI, 1998; AMIRAND *et al.*, 2000; BIZZARRI *et al.*, 2006).

Amirand e colaboradores (2000) observaram um aumento do pH intracelular do citoplasma no final de um ciclo celular, uma característica especificamente relacionada com a mitose, sendo 0,24 unidades de pH mais alcalino durante a mitose quando comparado com a interfase. Uma alcalinização na fase mitótica foi também detectada quando comparado com o núcleo em interfase (de pH 7,31 para pH 7,37) (AMIRAND *et al.*, 2000). Usando o indicador fluorescente ratiométrico de pH baseado na GFP (E²GFP), Bizzarri e colaboradores (2006) mostraram, pela primeira vez, uma alcalinização durante o processo de divisão celular usando células CHO (BIZZARRI *et al.*, 2006). Outro estudo observou a proliferação celular induzida por uma alcalinização do pH celular em células tumorais (CARDONE *et al.*, 2005). Esses resultados estão de acordo com nossos resultados, usando pela primeira vez um sensor ratiométrico bioluminescente baseado em uma luciferase de vagalume, o qual mostrou uma alcalinização do pH da célula durante a divisão celular (**Fig. 14, 15 e 16**).

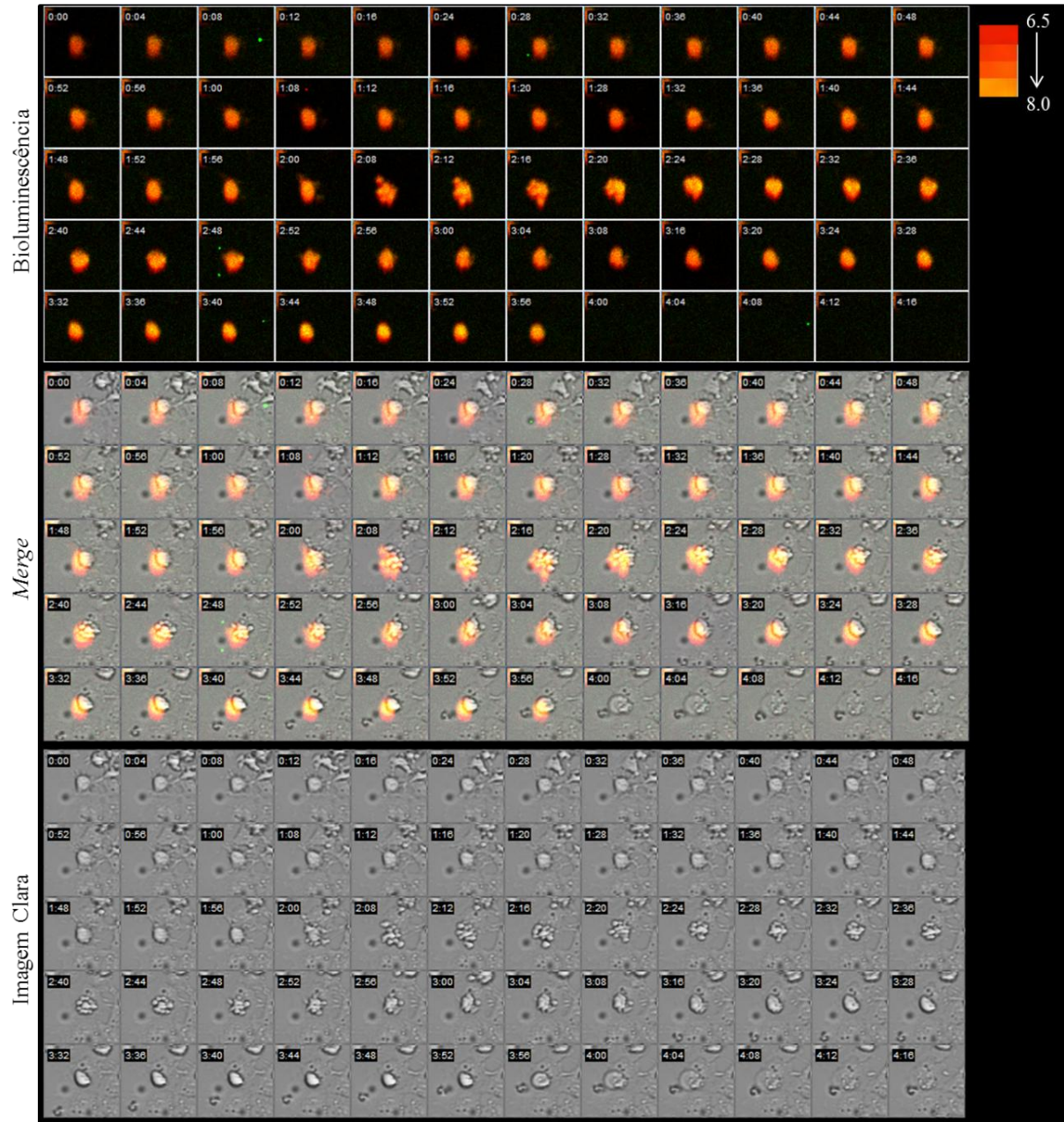


Figura 17. Imagem temporal da variação da cor da bioluminescência durante a apoptose de células COS-1 transfetadas com a construção pCMV-Mac:cito no Cellgraph com o espelho dicróico. Imagens foram obtidas usando o tempo de exposição de 3 minutos em intervalos de 4 minutos com lente objetiva 20 \times . Na parte superior podemos ver a imagem da bioluminescência das células, seguido da combinação da luminescência com a imagem clara (*merge* das imagens das emissões verde e vermelha) e a imagem clara. Números indicam horas.

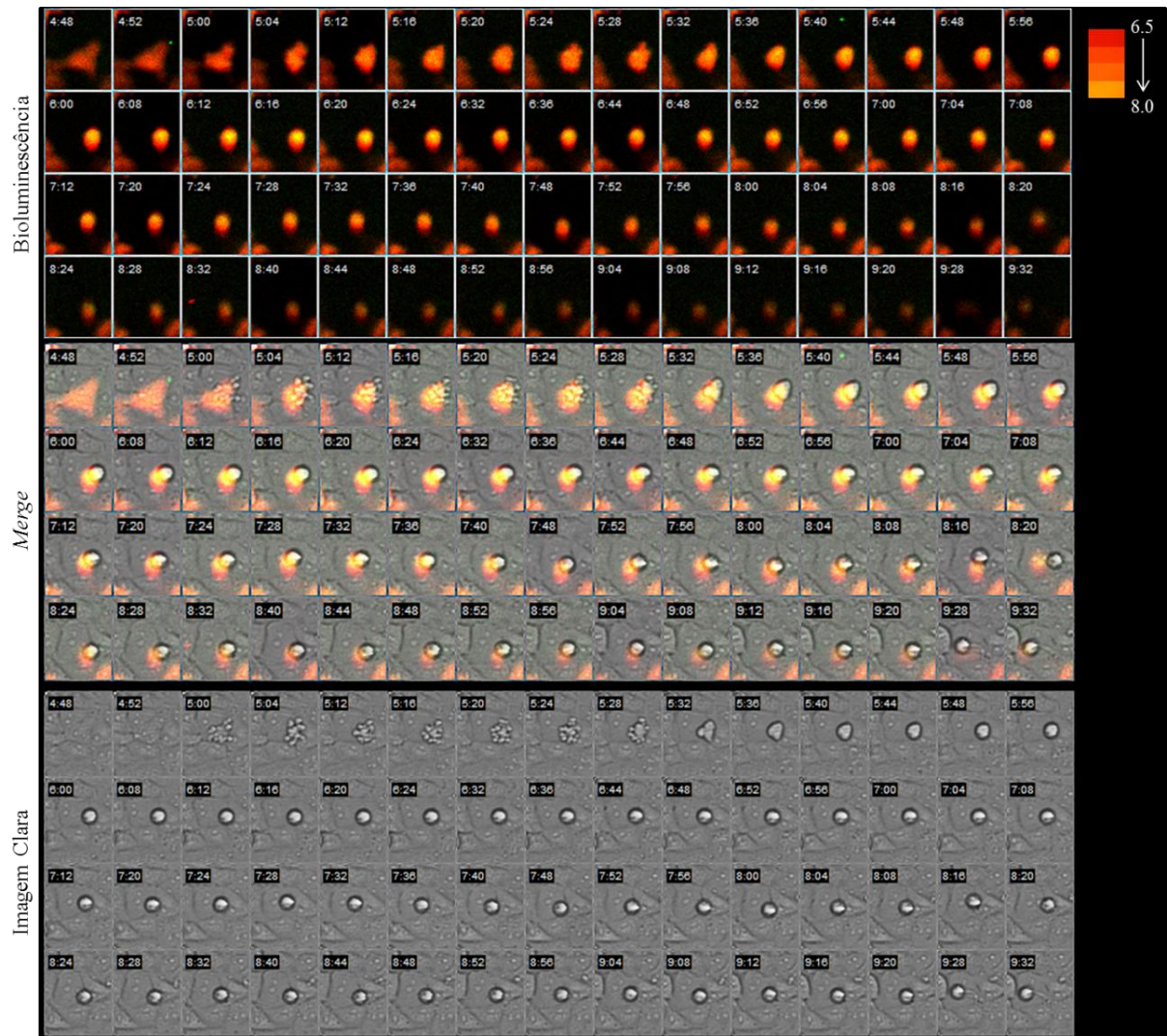


Figura 18. Imagem temporal da variação da cor da bioluminescência durante a apoptose de células COS-1 transfetadas com a construção pCMV-Mac:NLS no Cellgraph com o espelho dicróico. Imagens foram obtidas usando o tempo de exposição de 3 minutos em intervalos de 4 minutos com lente objetiva 20 \times . Na parte superior podemos ver a imagem da bioluminescência das células, seguido da combinação da luminescência com a imagem clara (*merge* das imagens das emissões verde e vermelha) e a imagem clara. Números indicam horas.

As **figuras 17 e 18** mostram uma fragmentação nuclear, característica da apoptose (LAGADIC-GOSSMANN *et al.*, 2004). Nesse trabalho observamos que durante ambos os eventos de divisão celular e apoptose, o pH intracelular se torna mais alcalino. Essa alcalinização pode ser um evento que ocorre mais especificamente antes da fragmentação do DNA e ativação da caspase (ver revisão LAGADIC-GOSSMANN *et al.*, 2004) e pode ocorrer em resposta a diferentes estímulos, como quando as células são privadas dos fatores de crescimento (GRENIER *et al.*, 2008). A maioria dos estudos concluiu que existe uma acidificação intracelular durante a apoptose (BARRY *et al.*, 1993; LI & EASTMAN, 1995; GOTTLIEB *et al.*, 1995; ISHAQUE & AL-RUBEAI, 1998; NILSSON *et al.*, 2006), mas existem alguns poucos estudos que reportaram uma alcalinização (ZHU & LOH, 1995; DAI *et al.*, 1998; KHALED *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2003).

A análise do pH intracelular de células de mamíferos normalmente usa agentes que induzem a apoptose, levando a uma acidificação intracelular ($\text{pH} < 6,8$), porém, taxas de acidificação podem variar dependendo do agente usado (GOTTLIEB, 1996). Considerando que em nossos experimentos a apoptose ocorreu espontaneamente, sendo que não utilizamos nenhum indutor de apoptose que possa causar acidificação intracelular, a alcalinização pode ter sido um processo natural.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE METAIS E EMPREGO DAS LUCIFERASES DE VAGALUMES COMO BIOSSENSORES RACIOMÉTRICOS DE METAIS

Para entendermos melhor o efeito de metais na sensibilidade espectral das luciferases, identificaremos o respectivo sítio de ligação e avaliaremos a viabilidade de uso destas luciferases como biossensores ratiométricos, comparamos o efeito de sais de metais nos espectros de diferentes luciferases, realizamos mutagênese sítio-dirigida e investigamos o efeito da concentração de cádmio, chumbo, mercúrio, níquel e zinco nas razões de intensidade de luz verde e vermelha.

5.3.1 Efeito de Metais Divalentes nos Espectros de Bioluminescência das Luciferases pH-Sensitivas

Avaliamos o efeito da concentração de metais tóxicos e potencialmente tóxicos nos espectros de bioluminescência *in vivo* da luciferase de *Macrolampis* sp2 (**Fig. 19**), uma vez que foi descrito que cátions de metais divalentes como Zn^{+2} , Cu^{+2} e Hg^{+2} deslocam o espectro de bioluminescência da luciferases de vagalumes para o vermelho (SELIGER & McELROY, 1964; VIVIANI & BECHARA, 1995). Como esperado, observou-se que os íons Zn^{+2} e Ni^{2+} na concentração de 2 mM resultaram num deslocamento apreciável para o vermelho.

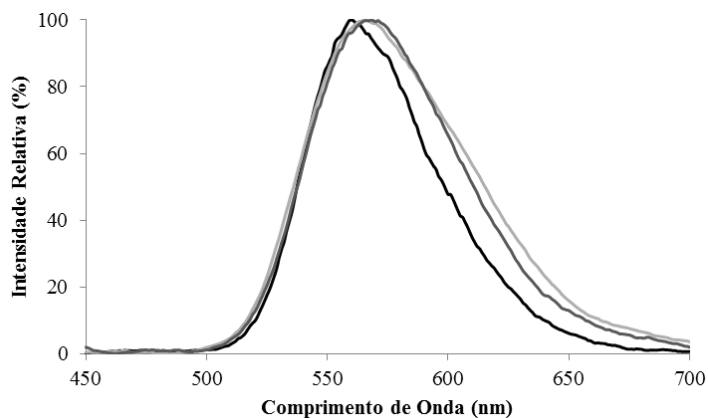


Figura 19. Efeito de metais divalentes na concentração de 2 mM no espectro de bioluminescência da luciferase de *Macrolampis* sp2: sem adição de metal (preto) e com adição de NiSO₄ (cinza escuro) e ZnSO₄ (cinza claro).

5.3.2 Identificação do Sítio de Ligação de Metais nas Luciferases de Vagalumes

As mais importante substituição para o espectro de bioluminescência e a sensibilidade ao pH que distingue a luciferase de *Macrolampis* sp2 das outras luciferases pH sensitivas é a substituição do resíduo conservado E354 por asparagina (E354N) (VIVIANI *et al.*, 2005). Considerando que E354 pode fazer uma ponte salina com H310 em luciferases como *P. pyralis* e *C. distinctus*, investigamos se os resíduos H310 e E354 podem também estar envolvidos na sensibilidade espectral a metais através de mutagênese sítio-dirigida.

5.3.2.1 Efeito das mutações N354E e E354N na sensibilidade aos metais

Primeiro comparamos o efeito de Zn²⁺, Ni²⁺ e Hg²⁺ nos espectros de bioluminescência das luciferases de *Macrolampis* sp2 e *C. distinctus* selvagens e dos mutantes Mac-N354E e Crt-E354N (**Fig. 20, 21 e 22**).

Na presença de Zn²⁺ e Ni²⁺, a luciferase de *C. distinctus* apresentou um maior deslocamento para o vermelho (**Fig. 20D e 21D**, respectivamente) do que a luciferase de *Macrolampis* sp2 que apresenta a substituição E354N, sendo que o Zn²⁺ causou um deslocamento semelhante no mutante Mac-N354E (**Fig. 20B**), resultado que indica que esse resíduo é crítico para a sensibilidade aos metais em luciferases de vagalumes.

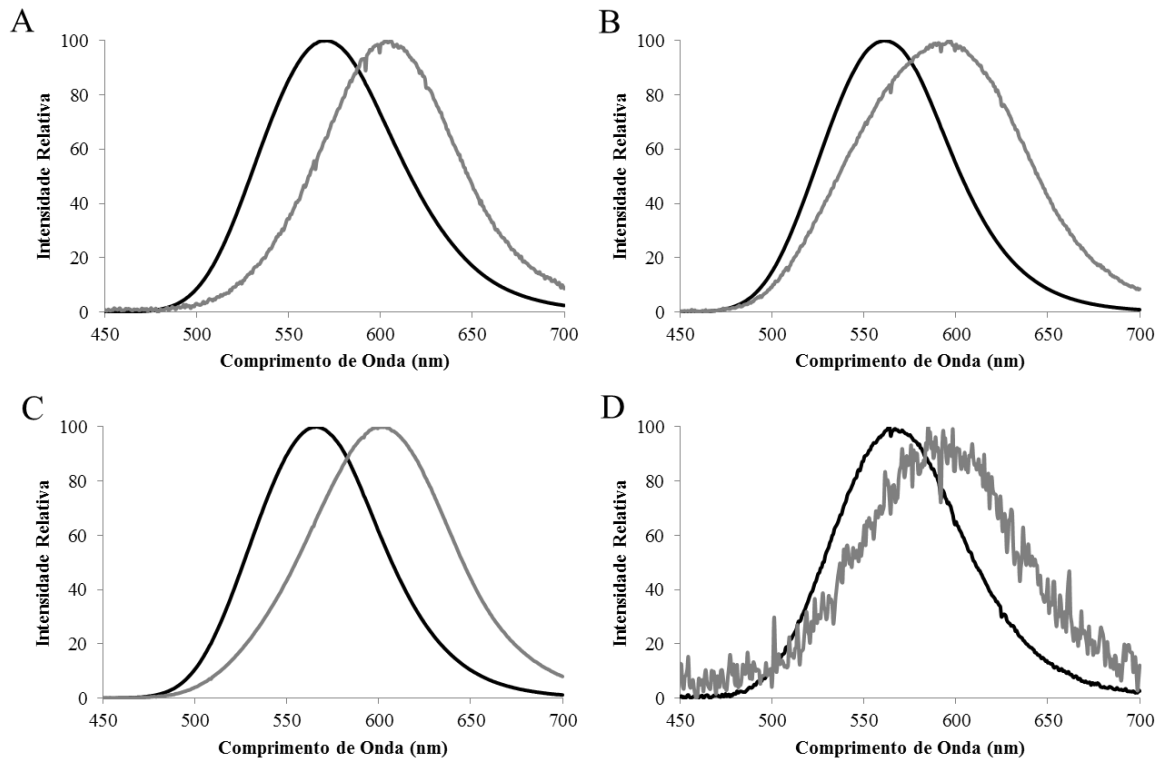


Figura 20. Efeito do ZnSO_4 2 mM (linhas cinzas) nos espectros de bioluminescência das luciferases: (A) *Macrolampis* sp2 selvagem, (B) *Cratomorphus distinctus* selvagem, (C) Crt-E354N e (D) Mac-N354E. Linhas pretas representam o controle negativo.

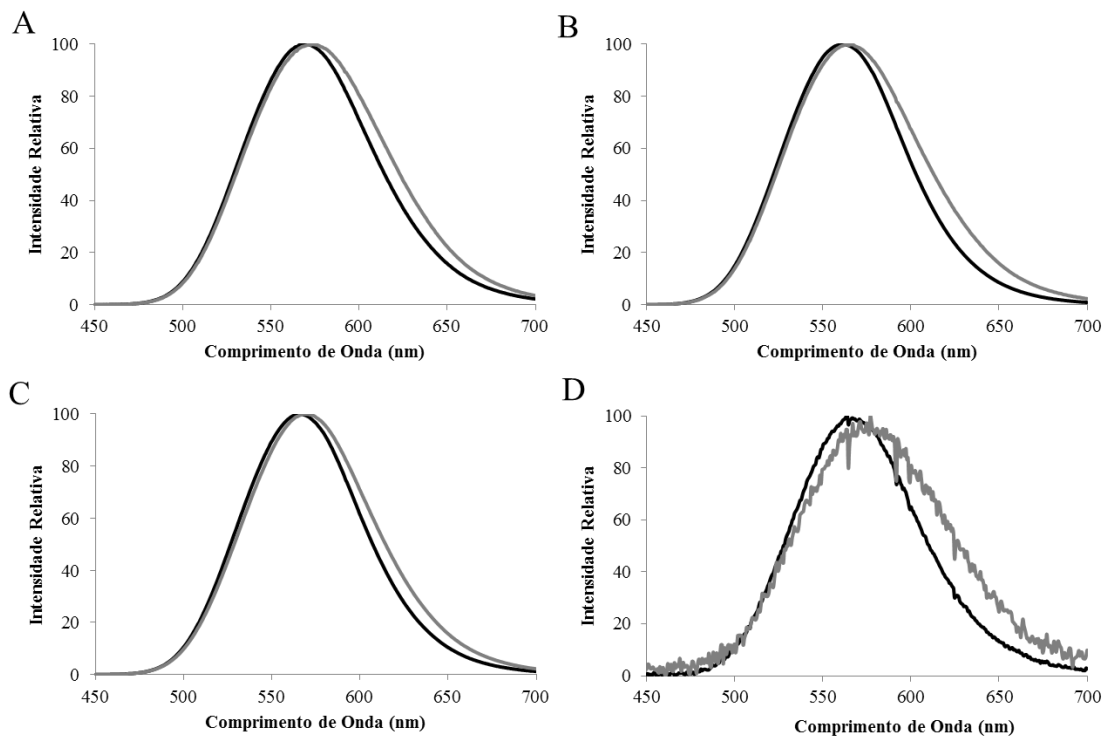


Figura 21. Efeito do NiSO_4 2 mM (linhas cinzas) nos espectros de bioluminescência das luciferases: (A) *Macrolampis* sp2 selvagem, (B) *Cratomorphus distinctus* selvagem, (C) Crt-E354N e (D) Mac-N354E. Linhas pretas representam o controle negativo.

No caso do Hg^{2+} , todas as luciferases selvagens e mutantes apresentaram um grande deslocamento do espectro para o vermelho (**Fig. 22**), com um deslocamento um pouco maior da luciferase de *C. distinctus* selvagem (**Fig. 22B**).

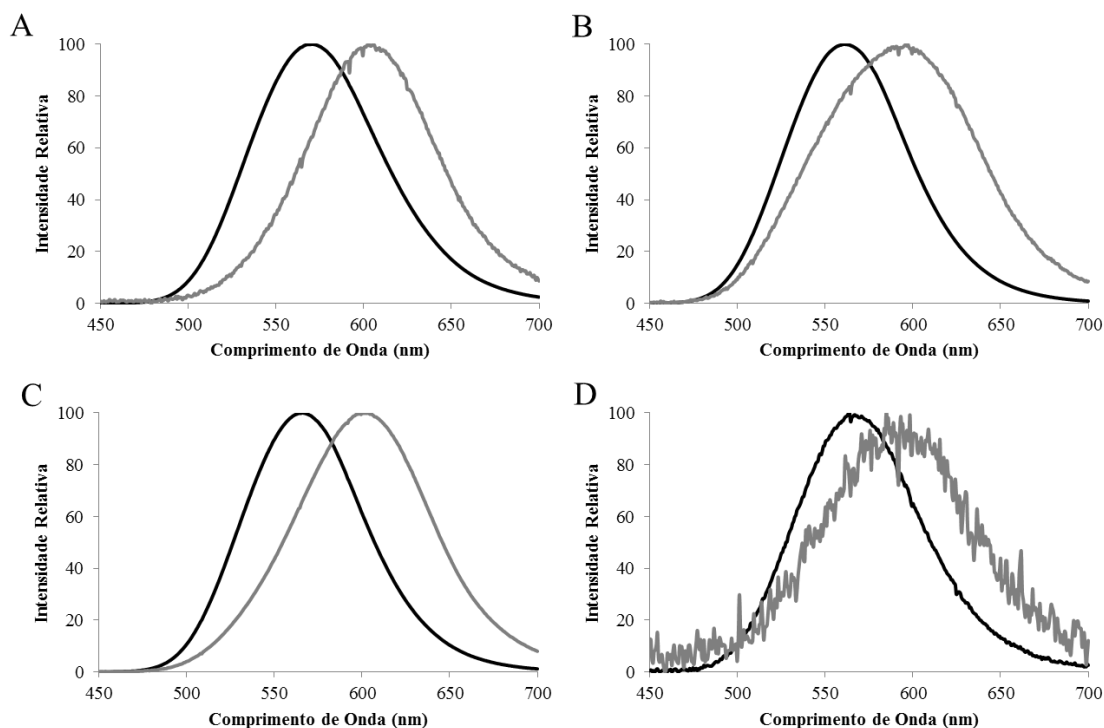


Figura 22. Efeito do HgCl_2 2 mM (1 mM em **D**) (linhas cinzas) nos espectros de bioluminescência das luciferases: (**A**) *Macrolampis* sp2 selvagem, (**B**) *Cratomorphus distinctus* selvagem, (**C**) Crt-E354N e (**D**) Mac-N354E. Linhas pretas representam o controle negativo.

5.3.3 Desenho de Novos Sítios Sensíveis a Metais na Luciferase de *Macrolampis* sp2

Considerando que o resíduo E354 em luciferases de vagalumes está aparentemente envolvido na sensibilidade espectral aos metais, decidimos então investigar se este resíduo e H310 podem ser substituídos por outros resíduos com cadeias laterais com propriedades quelantes, para ver se a sensibilidade espectral aos metais pode ser modificada. Analisamos o efeito de Cd^{2+} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{2+} e Zn^{+2} nos espectros de bioluminescência da luciferase pH-sensitiva de *Macrolampis* sp2 e dos mutantes Mac-H310C, Mac-N354C, Mac-N354E, Mac-N354H e Mac-H310C/N354C. Essas mutações causaram apenas um mínimo efeito no espectro de bioluminescência em pH 8,0, como mostrado a seguir.

5.3.3.1 Efeito das mutações nos espectros de bioluminescência e sensibilidade ao pH

N354H. A substituição Mac-N354H não alterou os espectros de bioluminescência *in vitro* em pH 8,0, porém ocasionou um deslocamento um pouco maior para o vermelho em tampão fosfato de sódio pH 6,0 (de 602 nm para 611 nm comparado com a enzima selvagem), com uma pequena diminuição da largura de meia banda (de 89 nm para 80 nm na enzima mutante) (**Fig. 23**). Como asparagina e histidina são dois aminoácidos hidrofílicos com polaridades próximas (NELSON & COX, 2006), isso pode explicar a ausência de efeito nas propriedades dessa enzima mutante.

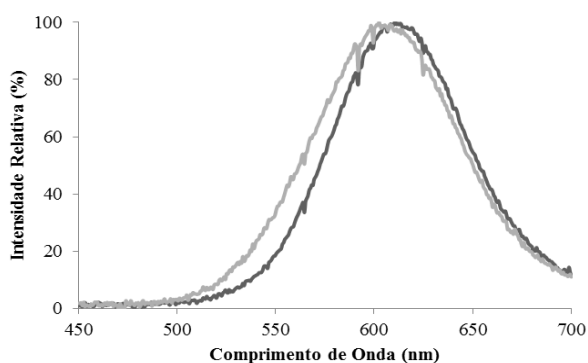


Figura 23. Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Macrolampis* sp2 (cinza claro) e do mutante Mac-N354H (cinza escuro) em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 6,0.

H310C e N354C. Com relação ao mutante Mac-H310C, essa substituição resultou num deslocamento para o laranja em tampão fosfato de sódio pH 8,0 (de 578 nm para 591 nm comparado com a enzima selvagem) (**Fig. 24A**) e um pequeno deslocamento para o vermelho em tampão fosfato de sódio pH 6,0 (de 602 nm para 605 nm), acompanhado de ligeira diminuição da largura de meia banda (de 89 nm para 83 nm) (**Fig. 24B**).

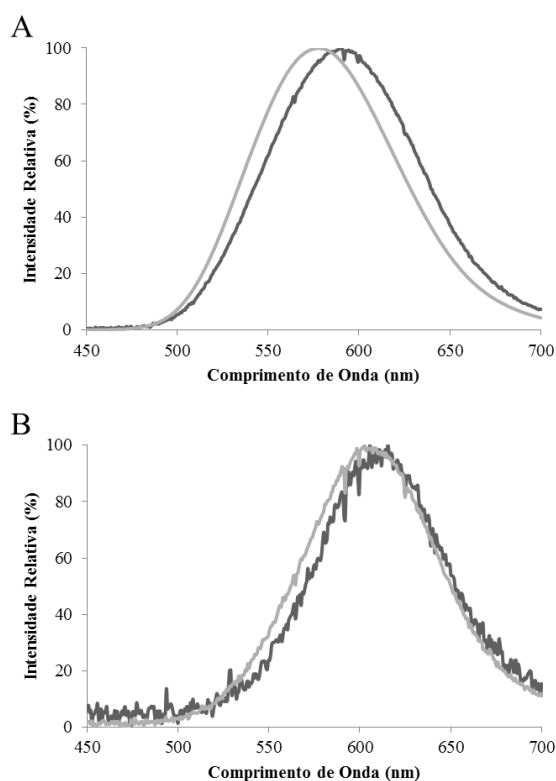


Figura 24. Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Macrolampis* sp2 (cinza claro) e do mutante Mac-H310C (cinza escuro) em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 8,0 (A) e pH 6,0 (B).

Já no mutante Mac-N354C, a substituição de asparagina por cisteína (ambos polares não carregados) resultou em maior deslocamento para o vermelho no espectro de bioluminescência em tampão fosfato de sódio pH 6,0 (de 602 nm para 614 nm comparado com a enzima selvagem) (Fig. 25). Em pH 8,0 não houve alteração do espectro.

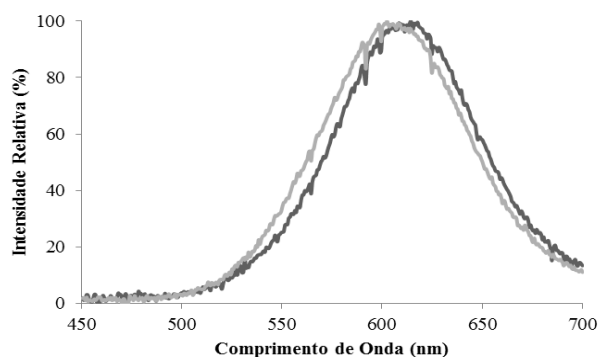


Figura 25. Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Macrolampis* sp2 (cinza claro) e do mutante Mac-N354C (cinza escuro) em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 6,0.

A dupla mutação Mac-H310C/N354C, também resultou num deslocamento do espectro para o laranja em tampão fosfato de sódio pH 8,0 (de 578 nm para 590 nm comparado com a enzima selvagem) e aumento da largura de meia banda de 93 nm para 111

nm (**Fig. 26A**), e em pH 6,0 um maior deslocamento para o vermelho (de 602 nm para 613 nm) (**Fig. 26B**).

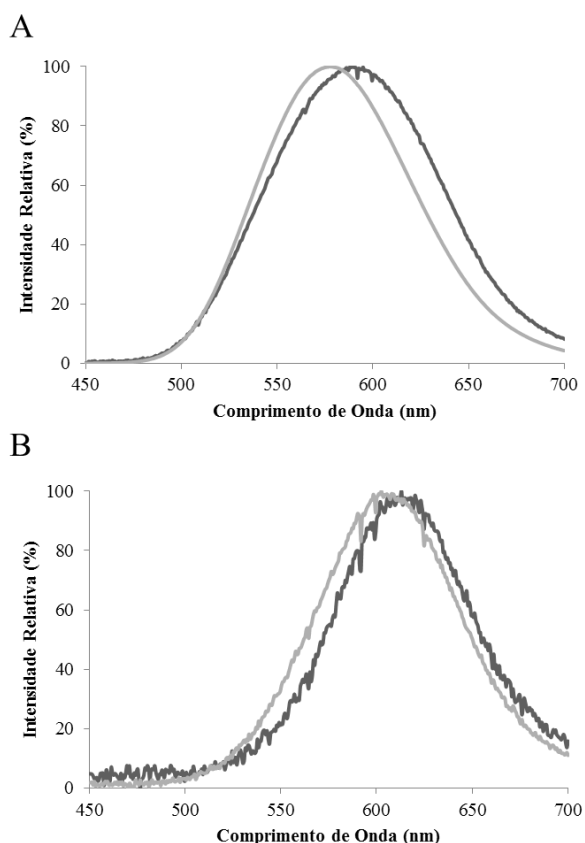


Figura 26. Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase de *Macrolampis* sp2 (cinza claro) e do mutante Mac-H310C/N354C (cinza escuro) em tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 8,0 (**A**) e pH 6,0 (**B**).

Com relação aos mutantes obtidos neste trabalho, o mutante que apresentou uma maior sensibilidade ao pH foi o Mac-N354C, com um deslocamento para o vermelho de 12 nm em pH 6,0 comparado com a enzima selvagem.

5.3.3.2 Efeito das mutações na atividade das luciferases mutantes

As luciferases mutantes apresentam atividade bioluminescente compatível, parecidas com a luciferase selvagem. As luciferases tiveram atividade decrescente na seguinte ordem: *Macrolampis* sp2 selvagem > Mac-H310C > Mac-N354C > Mac-H310C/N354C > Mac-H354E > Mac-N354H. Assim, as luciferase mutantes com maior atividade foram H310C e N354C, as outras apresentando cerca de $\frac{1}{3}$ da atividade da luciferase selvagem.

5.3.3.3 Efeito das mutações na sensibilidade espectral aos metais

Os mutantes investigados apresentaram deslocamento espectral que variou na seguinte ordem: (*Macrolampis* sp2) $\text{Hg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$, (Mac-H310C) $\text{Hg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, (Mac-N354C) $\text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, (Mac-N354E) $\text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$, (Mac-N354H) $\text{Hg}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ e (Mac-H310C/N354C) $\text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (**Fig. 27, 28, 29, 30 e 31**).

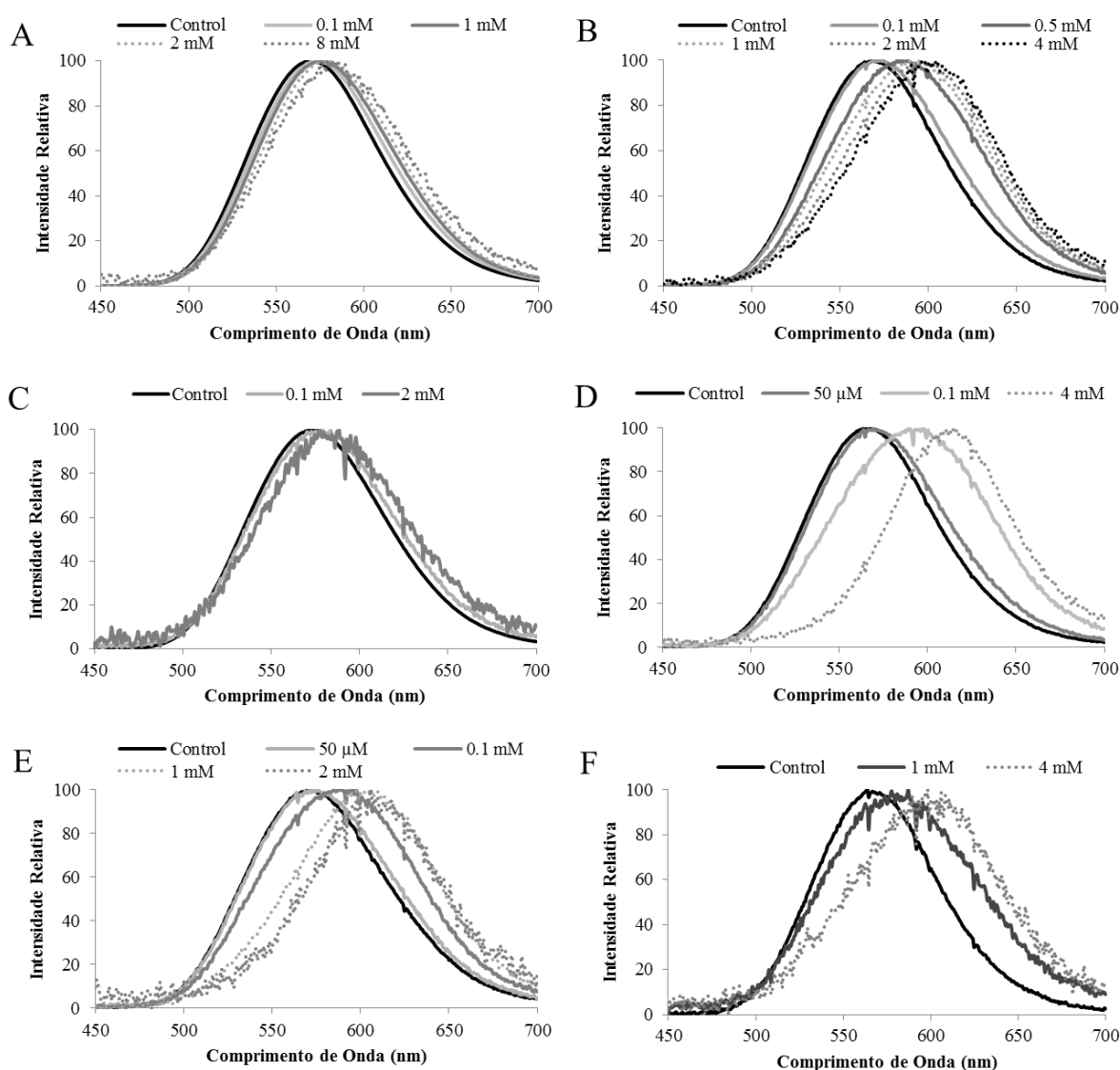


Figura 27. Espectros de bioluminescência na presença de diferentes concentrações de ZnSO_4 na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes: (A) selvagem, (B) Mac-N354H, (C) Mac-H310C, (D) Mac-N354C, (E) Mac-H310C/N354C e (F) Mac-N354E.

Os resultados da **figura 27** claramente mostram que a mutação de asparagina por histidina ou cisteína na posição 354 (Mac-N354H e Mac-N354C) aumenta consideravelmente o deslocamento para o vermelho na presença de Zn^{+2} (**Fig. 27B e D**, respectivamente).

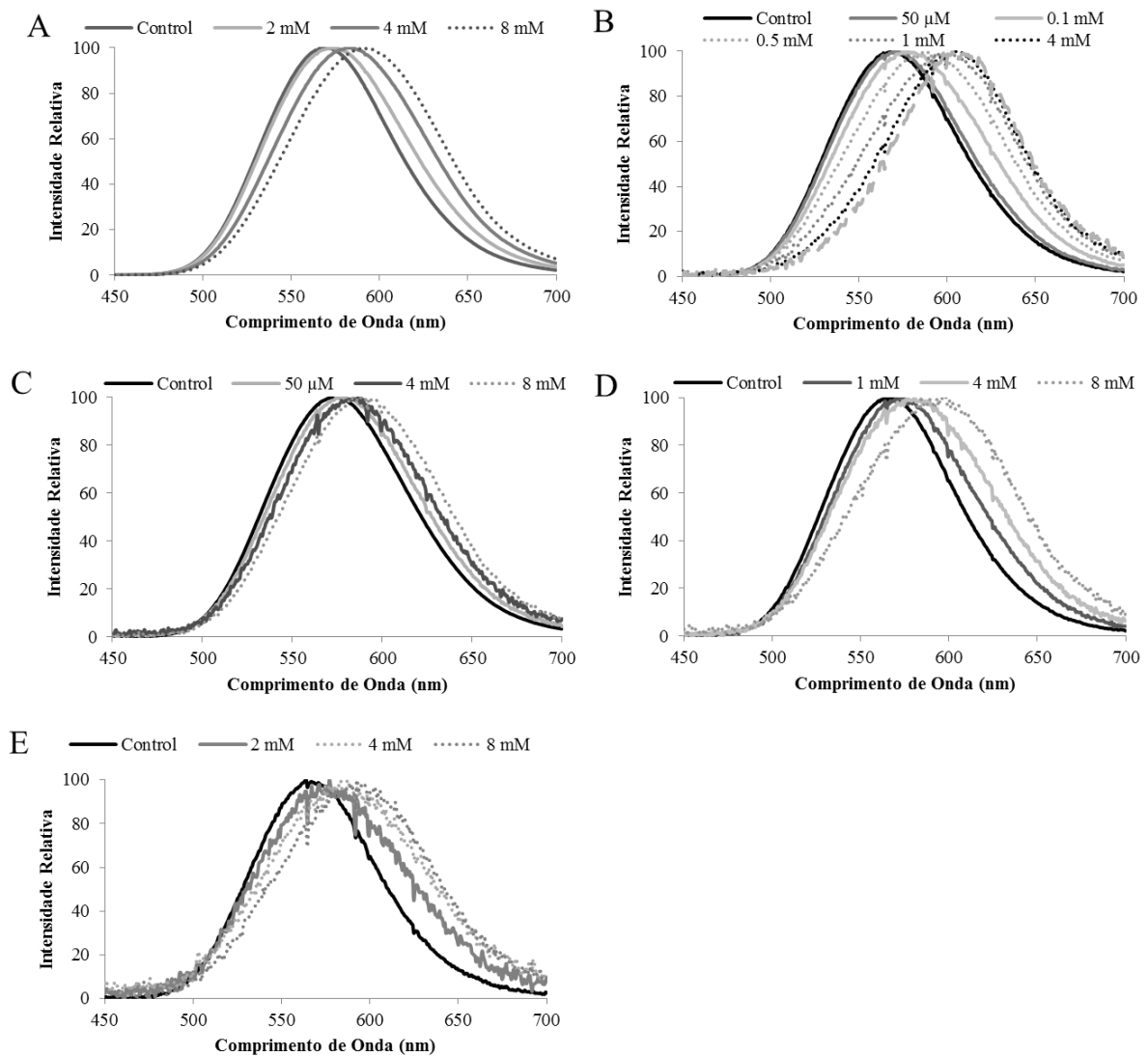


Figura 28. Espectros de bioluminescência na presença de diferentes concentrações de NiSO_4 na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes: (A) selvagem, (B) Mac-N354H, (C) Mac-H310C, (D) Mac-N354C e (E) Mac-N354E.

No caso do Ni^{2+} , a **figura 28** mostra que a mutação N354H apresentou o maior deslocamento para o vermelho (**Fig. 28B**), enquanto a substituição de histidina por cisteína na posição 310 (Mac-H310C) (**Fig. 28C**) apresentou o menor efeito. Esses resultados são totalmente consistentes com a alta afinidade de histidinas ao Ni^{2+} e confirma a importância das posições 310 e 354 para a ligação de níquel em luciferases de vagalumes.

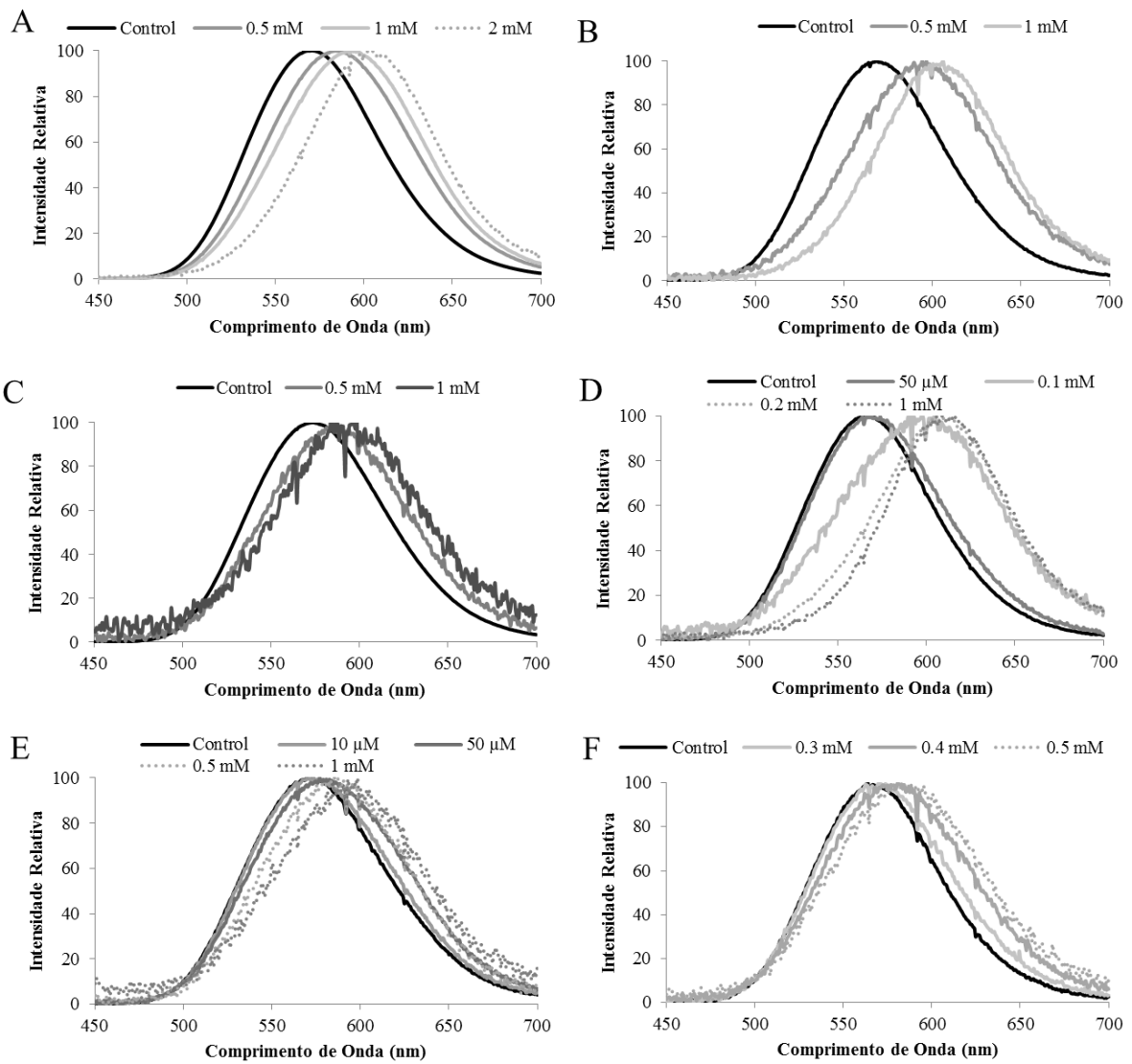


Figura 29. Espectros de bioluminescência na presença de diferentes concentrações de $HgCl_2$ na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes: (A) selvagem, (B) Mac-N354H, (C) Mac-H310C, (D) Mac-N354C, (E) Mac-H310C/N354C e (F) Mac-N354E.

A respeito do Hg^{2+} (Fig. 29), os mutantes Mac-N354C e Mac-N354H apresentaram maior deslocamento para o vermelho com menor concentração do metal (Fig. 29D e B, respectivamente).

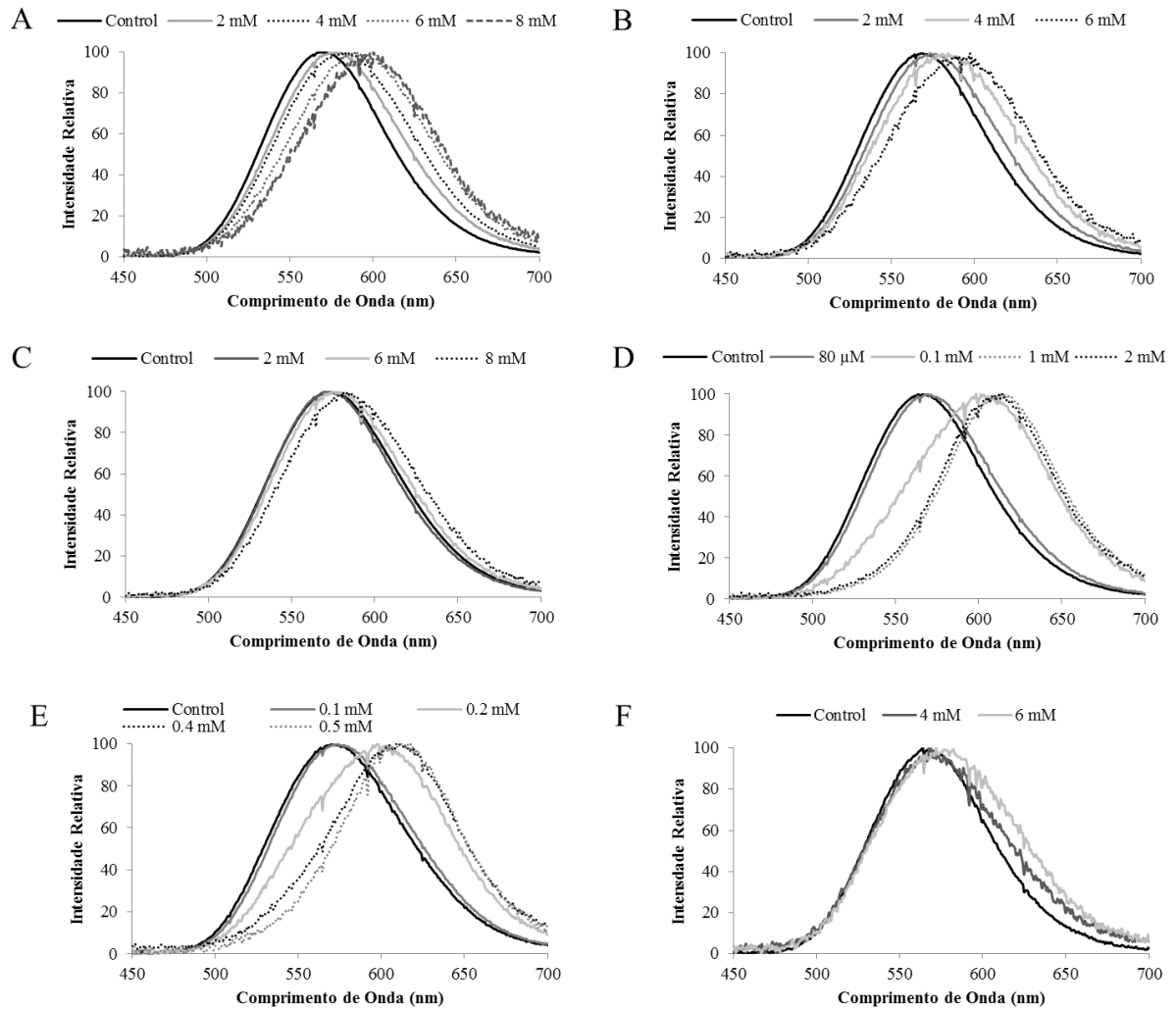


Figura 30. Espectros de bioluminescência na presença de diferentes concentrações de CdSO_4 na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes: (A) selvagem, (B) Mac-N354H, (C) Mac-H310C, (D) Mac-N354C, (E) Mac-H310C/N354C e (F) Mac-N354E.

Com relação ao Cd^{2+} (Fig. 30), o mutante Mac-N354C foi o mais sensível, com um deslocamento espectral de 34 nm na concentração de 0,1 mM (de 564 nm para 598 nm) (Fig. 30D), seguido de Mac-H310C/N354C, com um deslocamento de 42 nm na presença de CdSO_4 0,5 mM (de 571 nm para 612 nm) (Fig. 30E).

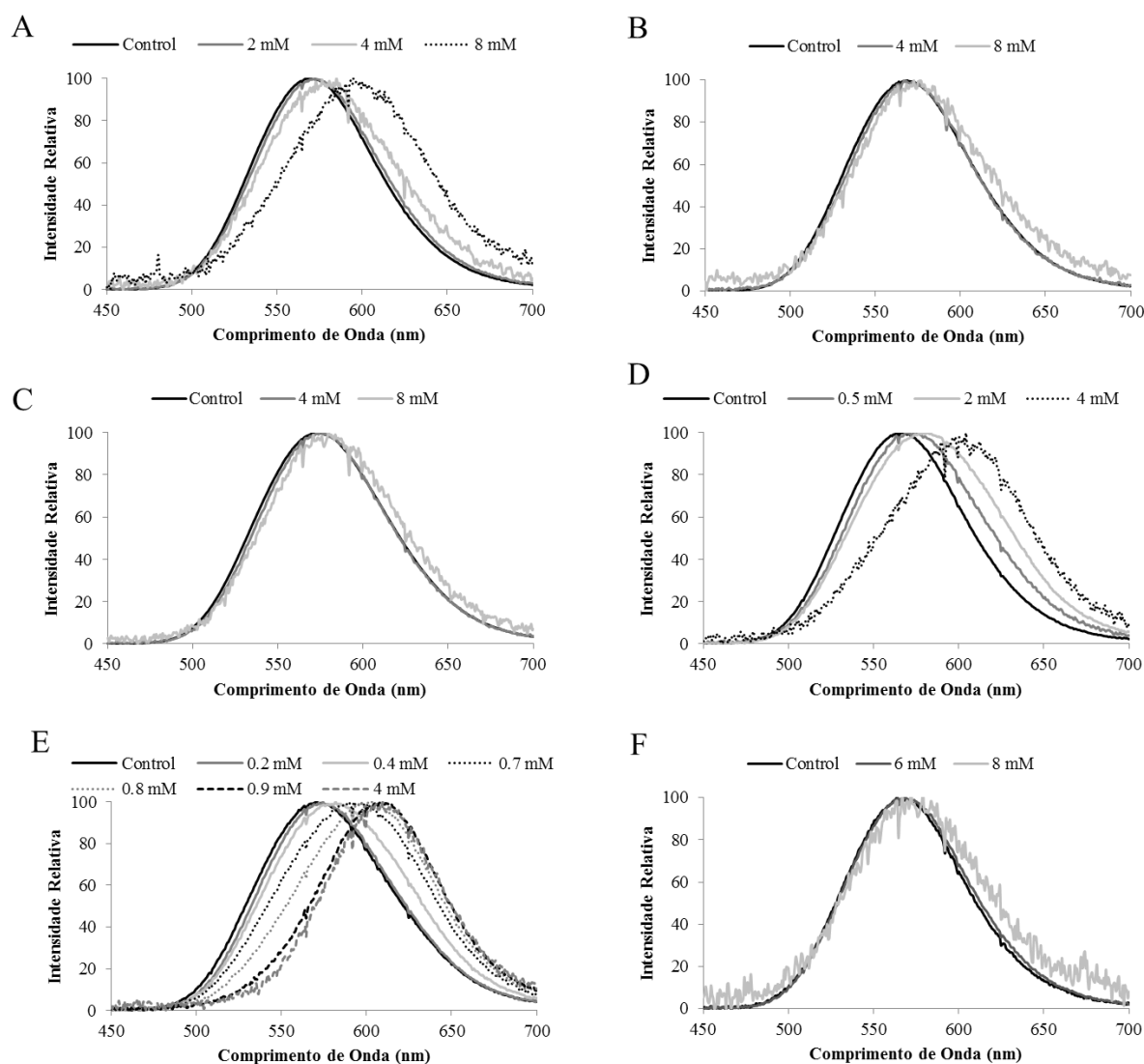


Figura 31. Espectros de bioluminescência na presença de diferentes concentrações de PbCl_2 na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes: (A) selvagem, (B) Mac-N354H, (C) Mac-H310C, (D) Mac-N354C, (E) Mac-H310C/N354C e (F) Mac-N354E.

O Pb^{2+} foi um dos metais com os menores efeitos no deslocamento do espectro (**Fig. 31**), sendo o mutante Mac-H310C/N354C o mais sensível (**Fig. 31E**).

Em geral, a substituição H310C diminui a sensibilidade a cátions de metais quando comparado com as substituições no resíduo N354 por cisteína ou histidina. Os resultados confirmam a importância do glutamato carregado negativamente na posição 354, e outros resíduos quelantes como cisteínas (sulfidríla) e histidinas (imidazol) nas posições 310 e 354 para a sensibilidade a metais divalentes, especialmente histidinas. Dentre todos os mutantes, os mais sensíveis a esses metais são os na posição 354, os quais incluem a cisteína (para Cd^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+}), a histidina (para Ni^{2+} e Zn^{2+}) ou o glutamato (para Zn^{2+}); sendo o mutante Mac-N354C o mais sensível para Cd^{2+} e Hg^{2+} , causando o maior deslocamento para o vermelho em menores concentrações desses metais. Dentre esses dois metais, esse mutante apresentou

maior sensibilidade ao Cd^{2+} , com o maior deslocamento para o vermelho dentre todas as luciferases e todos os metais (deslocamento de 54 nm na presença de CdSO_4 4 mM, de 564 nm para 618 nm).

Em seguida, para compararmos o efeito de metais nos espectros de bioluminescência de luciferases purificadas e não purificadas, analisamos o efeito da concentração do cátion de metal no espectro de bioluminescência da luciferase de *Macrolampis* sp2 usando extrato bruto e amostras purificadas. O espectro com Ni^{2+} não apresentou nenhuma diferença entre o extrato bruto e a enzima purificada. Porém, Hg^{2+} e Zn^{2+} apresentaram um maior deslocamento no espectro da enzima purificada com relação ao extrato bruto nas concentrações de 0,5 mM e 4,0 mM, respectivamente (de 585 nm para 602 nm para Hg^{2+} e de 580 nm para 584 nm para Zn^{2+} , **Fig. 32C e A**, respectivamente). Este resultado pode ser explicado em princípio pela competição de outras proteínas presentes nos extratos brutos na ligação desses metais.

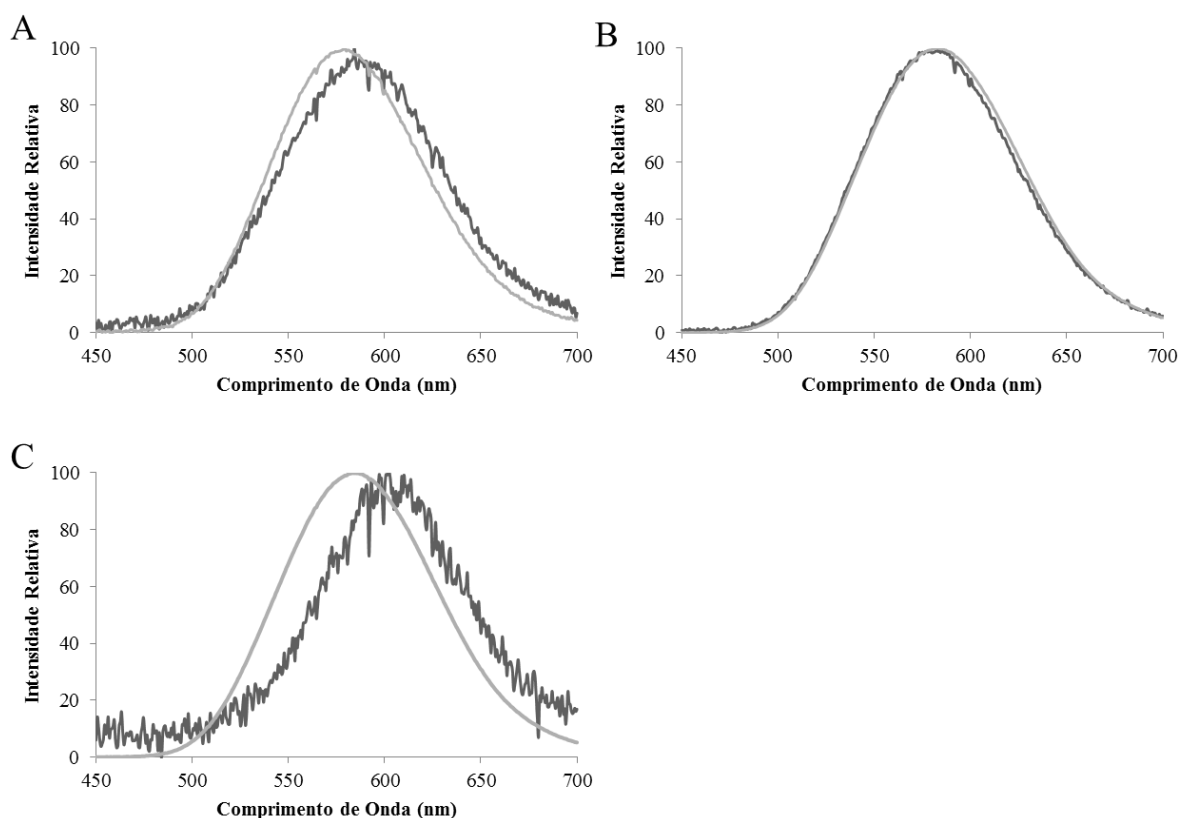


Figura 32. Comparação do efeito dos metais no espectro de bioluminescência da luciferase de *Macrolampis* sp2 em extrato bruto (pPro-Mac) (cinza claro) e purificada (pCold-Mac) (cinza escuro): (A) ZnSO_4 4 mM, (B) NiSO_4 4 mM e (C) HgCl_2 0,5 mM.

Também verificamos uma possível interferência da cauda de histidina no espectro de bioluminescência da luciferase recombinante na presença de níquel, comparando o efeito desse metal no espectro de bioluminescência das diferentes construções da luciferase de

Macrolampis sp2 com vetores que conferem caudas de histidina (pCold-Mac, pPro-Mac) e sem cauda de histidina (pBl-Mac) (**Fig. 33C, A e B**, respectivamente). Entretanto, nenhuma diferença pôde ser detectada no pico ou na largura do espectro de bioluminescência das luciferases expressas com ou sem cauda de histidina.

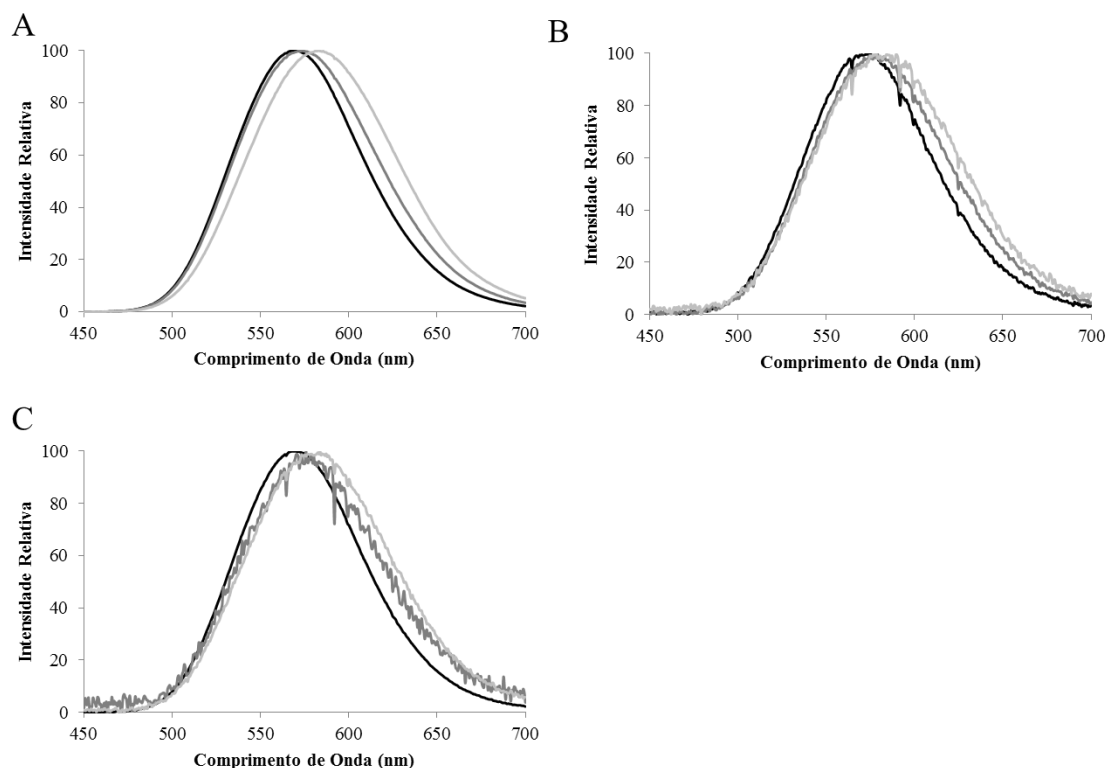


Figura 33. Comparação do efeito de NiSO_4 2 mM (cinza escuro) e 4 mM (cinza claro) nos espectros de bioluminescência da luciferase de *Macrolampis* sp2 com e sem cauda de histidina: **(A)** pPro (6 His no N-terminal), **(B)** pBl (sem cauda de histidina) e **(C)** pCold (6 His no N-terminal). Linhas pretas representam o controle negativo.

5.3.3.3.1 Sensibilidade espectral aos metais

A sensibilidade espectral da bioluminescência a metais está relacionada à magnitude do deslocamento em relação à concentração do metal: quanto o maior deslocamento para o vermelho e a menor concentração do metal, maior é a sensibilidade espectral ao metal. Assim sendo, usamos como um parâmetro de sensibilidade (S) a razão do deslocamento espectral em frequência ou recíproco de comprimento de onda (cm^{-1}) e a concentração do metal (mM). A **figura 34** e as **tabelas 3 e 4** resumizam a sensibilidade das luciferases mutantes aos diferentes metais. Dentre todos os mutantes, Mac-N354C apresentou uma maior sensibilidade tanto ao Zn^{+2} quanto ao Cd^{2+} e Hg^{+2} (**Fig. 27D, 30D e 29D**, respectivamente), com o menor limite de detecção (<100 μM), enquanto que Mac-N354H foi o mais sensível ao Ni^{2+} (**Fig. 28B**).

Além disso, é desejável que a atividade luminescente da luciferase não seja severamente afetada pela concentração de metal. Entre os cátions testados, Cd^{2+} , Hg^{2+} e Zn^{2+} causaram maior deslocamento para o vermelho (34 nm) para Mac-N354C, Mac-N354C e Mac-H310C/N354C, respectivamente, com o menor impacto na atividade da bioluminescência na concentração de 0,10 mM (redução de aproximadamente 20%, 30% e 50% da atividade, respectivamente); além do Zn^{2+} apresentar o menor impacto na atividade da bioluminescência (aproximadamente 25% e 45% para Mac-N354E) em altas concentrações (2 e 4 mM). O Hg^{2+} foi o metal que mais causou impacto na atividade (aproximadamente 65% Mac-H310C/N354C), mesmo em baixa concentração (0,1 mM) (**Tab. 4**).

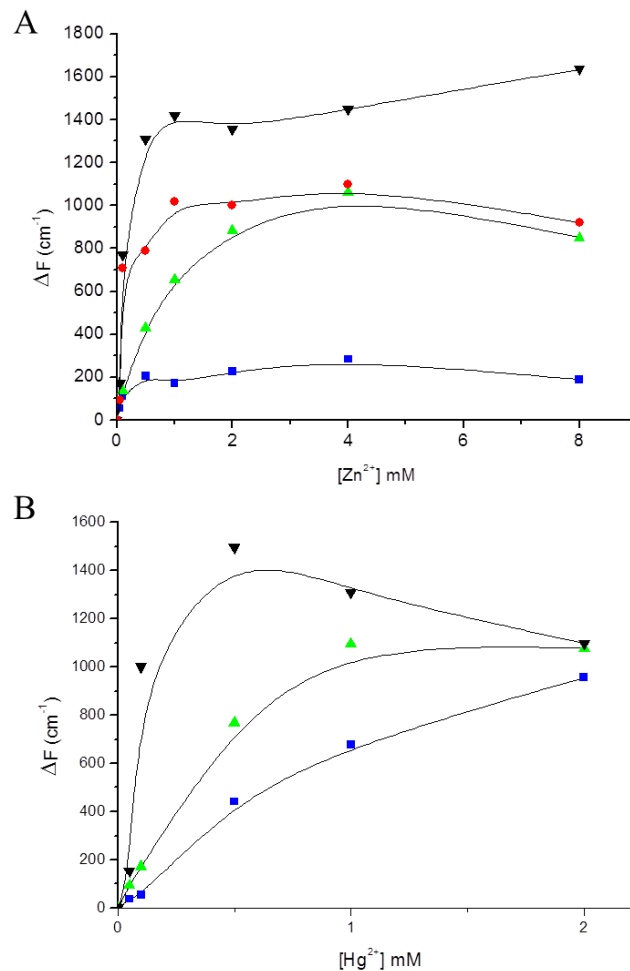


Figura 34. Efeito da concentração do metal (mM) no deslocamento espectral medido em recíproco da variação do comprimento de onda ΔF (cm^{-1}): *Macrolampis* sp2 (azul), Mac-N354H (verde), Mac-H310C/N354C (vermelho) e Mac-N354C (preto).

Tabela 3. Sensibilidade espectral e efeito da concentração de sais de metais na atividade luminescente da luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes. Tabela completa disponível na **tabela 4**.

| Luciferase | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | ZnSO ₄ | | HgCl ₂ | | NiSO ₄ | CdSO ₄ | PbCl ₂ |
|------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | Atividade Relativa * | Sensibilidade Espectral ** | Atividade Relativa * | Sensibilidade Espectral ** | Atividade Relativa * | Atividade Relativa * | Atividade Relativa * |
| | | (%) | (cm ⁻¹ /mM ⁻¹) | (%) | (cm ⁻¹ /mM ⁻¹) | (%) | (%) | (%) |
| Selvagem | 570 | 77 | 454 | 18 | 830 | 90 | 36 | - |
| Mac-H310C | 573 | 20 | 1080 | 11 | - | 85 | - | - |
| Mac-N354C | 564 | 8 | 10750 | 6 | 7780 | 72 | 13 | 45 |
| Mac-H310C/N354C | 571 | 15 | 1820 | 4 | - | - | 11 | 32 |
| Mac-N354H | 568 | 20 | 1080 | 7 | 1740 | 23 | 21 | 70 |

* Atividade relativa foi medida na presença do metal a 1 mM

** Sensibilidade espectral foi medida como a inclinação do efeito da concentração de metal no deslocamento espectral da **figura 34**

Tabela 4. Efeito da concentração de metal na atividade luminescente da luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes.

| | | <i>Macrolampis</i> sp2 | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-----|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|
| | | Selvagem | | Mac-N354E | | Mac-N354C/H310C | | Mac-H310C | | Mac-N354C | | Mac-N354H | |
| Metal [mM] | | atividade relativa (%) | deslocamento (nm) | atividade relativa (%) | deslocamento (nm) | atividade relativa (%) | deslocamento (nm) | atividade relativa (%) | deslocamento (nm) | atividade relativa (%) | deslocamento (nm) | atividade relativa (%) | deslocamento (nm) |
| ZnSO ₄ | 0 | 100 | 570.2 | 100 | 564.0 | 100 | 570.8 | 100 | 573.3 | 100 | 564.0 | 100 | 568.3 |
| | 0.1 | 90.09 | 573.9 (3,7) | 96.41 | 564.0 (0) | 49.28 | 594.9 (34,1) | 44.30 | 579.0 (5,7) | 21.74 | 589.6 (25,6) | 60.61 | 572.7 (4,4) |
| | 0.5 | 82.88 | 577.0 (6,8) | 91.78 | 575.1 (11,1) | 22.58 | 597.8 (27,0) | 29.91 | 588.4 (15,1) | 2.97 | 609.0 (45,0) | 35.70 | 582.5 (14,2) |
| | 1 | 76.74 | 575.8 (5,6) | 89.33 | 587.2 (23,2) | 14.61 | 606.0 (35,2) | 20.24 | 586.6 (13,3) | 7.57 | 613.1 (49,1) | 20.21 | 590.2 (21,9) |
| | 2 | 30.10 | 577.7 (7,5) | 76.77 | 586.6 (22,6) | 8.17 | 605.4 (34,6) | 9.86 | 588.4 (15,1) | 4.38 | 610.7 (46,7) | 17.35 | 598.4 (30,1) |
| NiSO ₄ | 0 | 100 | 570.2 | 100 | 564.0 | - | - | 100 | 573.3 | 100 | 564.0 | 100 | 568.3 |
| | 0.1 | 91.36 | 570.8 (0,6) | 64.41 | 564.0 (0) | - | - | 98.16 | 579.0 (5,7) | 86.64 | 566.5 (2,5) | 46.38 | 575.1 (6,8) |
| | 0.5 | 89.36 | 573.9 (3,7) | 38.67 | 571.4 (7,4) | - | - | 96.98 | 581.3 (8,0) | 78.37 | 570.2 (6,2) | 35.21 | 589.6 (21,3) |
| | 1 | 90.45 | 575.8 (5,6) | 40.72 | 573.9 (9,9) | - | - | 85.17 | 578.3 (5,0) | 72.37 | 572.7 (8,7) | 22.64 | 603.1 (34,8) |
| | 2 | 82.29 | 573.9 (3,7) | 32.77 | 577 (13,0) | - | - | 77.84 | 580.2 (6,9) | 57.90 | 573.9 (9,9) | 19.95 | 600.1 (31,8) |
| HgCl ₂ | 0 | 100 | 570.2 | 100 | 564.0 | 100 | 570.8 | 100 | 573.3 | 100 | 564.0 | 100 | 568.3 |
| | 0.1 | 86.78 | 572.0 (1,8) | 73.03 | 564.0 (0) | 34.77 | 586.6 (15,8) | 70.02 | 579.0 (5,7) | 67.49 | 597.8 (33,8) | 53.87 | 569.6 (1,3) |
| | 0.5 | 58.90 | 584.9 (14,7) | 30.04 | 583.3 (20,3) | 28.41 | 585.5 (14,7) | 26.98 | 585.5 (12,2) | 8.64 | 616.0 (52,0) | 14.27 | 594.3 (16,0) |
| | 1 | 17.54 | 593.1 (22,9) | 6.68 | 584.9 (20,9) | 3.96 | 598.4 (27,6) | 11.04 | 586.6 (13,3) | 6.21 | 609.0 (45,0) | 7.29 | 606.0 (37,7) |
| | 2 | 4.34 | 603.1 (32,9) | - | - | 0.49 | 607.2 (35,4) | 0.31 | 607.2 (33,9) | 1.20 | 601.3 (37,3) | 0.64 | 605.4 (37,1) |
| CdSO ₄ | 0 | 100 | 570.2 | 100 | 564.0 | 100 | 570.8 | 100 | 573.3 | 100 | 564.0 | 100 | 568.3 |
| | 0.1 | - | - | - | - | 105.89 | 572.7 (1,9) | - | - | 78.19 | 598.4 (34,4) | - | - |
| | 0.5 | - | - | - | - | 15.49 | 612.5 (41,7) | - | - | 16.01 | 610.7 (46,7) | - | - |
| | 1 | 36.22 | 575.8 (5,6) | 13.52 | 564.0 (0) | 10.72 | - | - | - | 12.56 | 616.0 (52,0) | 21.10 | 570.8 (2,5) |
| | 2 | 15.75 | 577.0 (6,8) | 9.58 | 564.0 (0) | 6.00 | - | 19.69 | 573.3 (0) | 6.81 | 614.2 (50,2) | 10.35 | 573.3 (5,0) |
| PbCl ₂ | 0 | 100 | 570.2 | 100 | 564.0 | 100 | 570.8 | 100 | 573.3 | 100 | 564.0 | 100 | 568.3 |
| | 0.1 | - | - | - | - | 85.37 | 570.8 (0) | - | - | 91.73 | 568.3 (4,3) | - | - |
| | 0.5 | - | - | - | - | 44.00 | 580.8 (10,0) | - | - | 74.82 | 569.6 (5,6) | - | - |
| | 1 | 1.30 | 580.2 (10,0) | 43.74 | 564.0 (0) | 32.01 | 603.7 (32,9) | - | - | 44.98 | 574.5 (10,5) | 69.90 | 570.8 (2,5) |
| | 2 | - | - | 36.14 | 564.0 (0) | 15.43 | 607.8 (37,0) | 19.69 | 575.1 (1,8) | 20.51 | 581.9 (7,9) | 33.83 | 573.9 (5,6) |

5.3.4 Medida Raciométrica da Concentração de Metais

Para saber se é possível usar a mudança espectral para quantificar os metais, analisamos se existe uma relação entre a concentração do cátion e a razão das intensidades do espectro de bioluminescência ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) na região do vermelho e do verde na luciferase de *Macrolampis* sp2 e seus mutantes ($\lambda_{\text{vermelho}} = 616 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{verde}} = 563 \text{ nm}$).

Como esperado, uma relação linear entre a razão de intensidades (R) e a concentração de Cd^{2+} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{2+} e Zn^{+2} foi encontrada usando as diferentes luciferases (**Fig. 35, 36, 37, 38 e 39**).

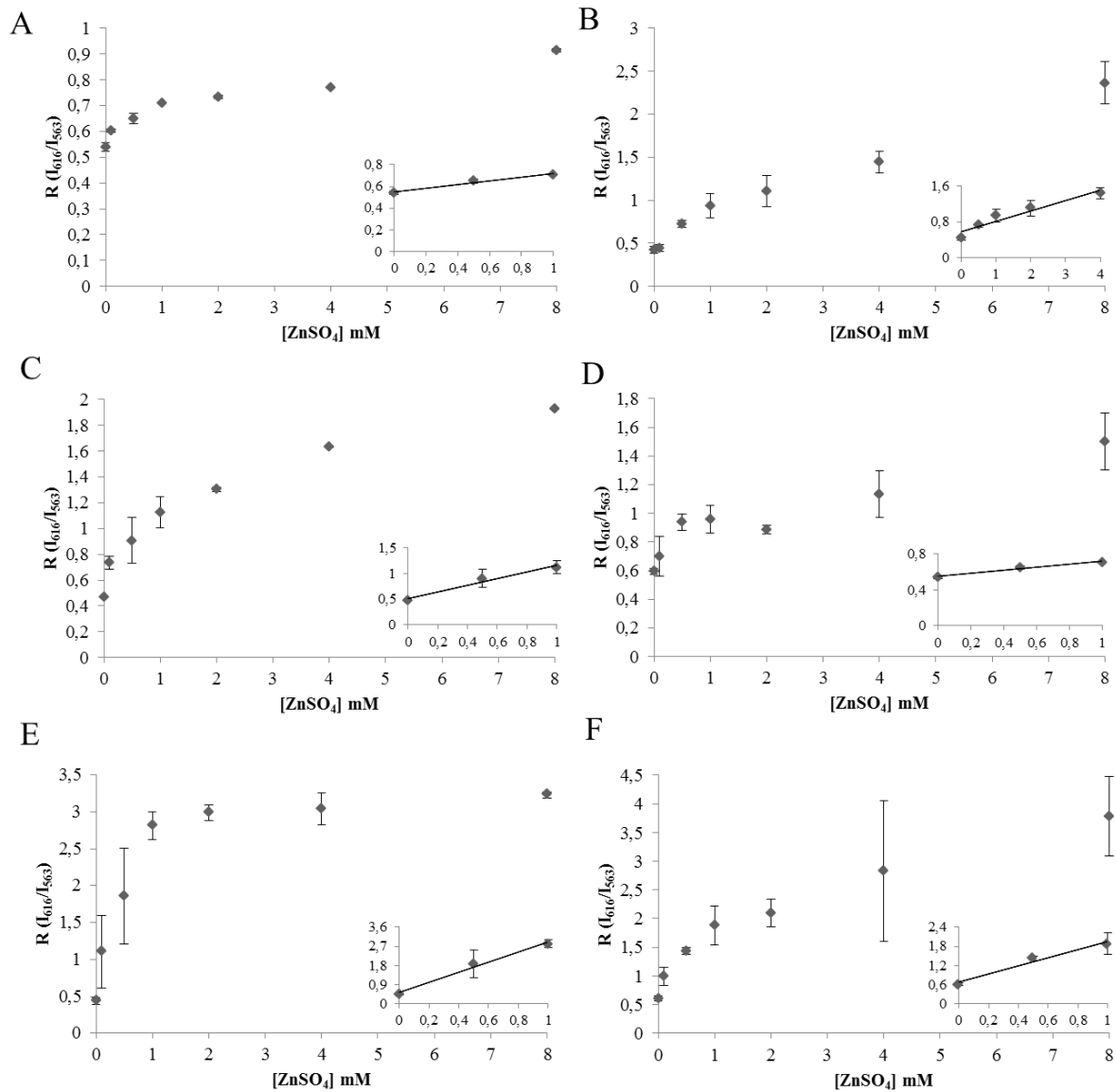


Figura 35. Efeito da concentração de ZnSO_4 na razão das intensidades da bioluminescência no λ_{verde} e $\lambda_{\text{vermelho}}$ ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) usando a luciferase de *Macrolampis* sp2 modificada: (A) selvagem, (B) Mac-N354E, (C) Mac-N354H, (D) Mac-H310C, (E) Mac-N354C e (F) Mac-H310C/N354C. Inseto: intervalo linear da curva.

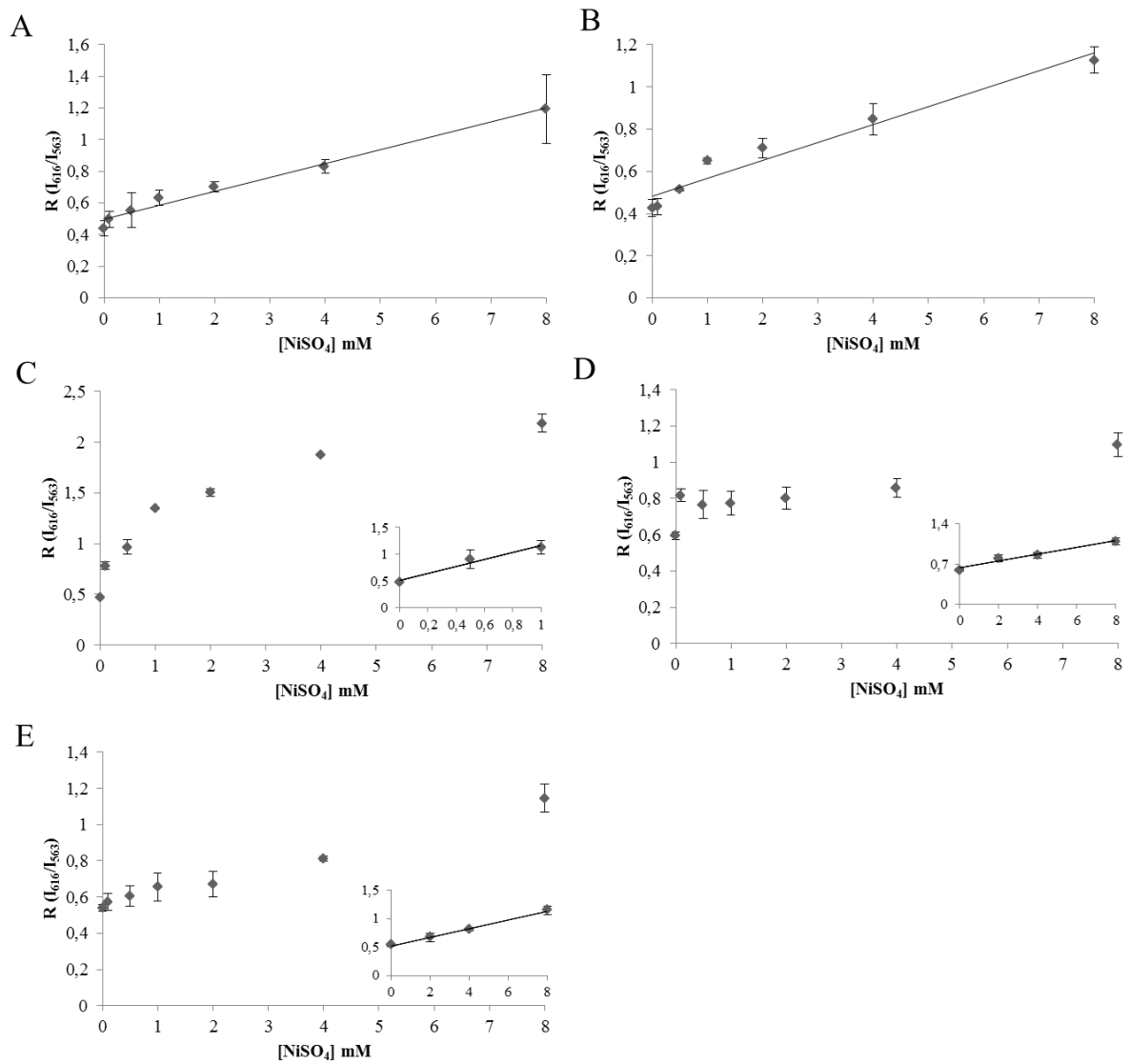


Figura 36. Efeito da concentração de NiSO_4 na razão das intensidades da bioluminescência no λ_{verde} e $\lambda_{\text{vermelho}}$ ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) usando a luciferase de *Macrolampis* sp2 modificada: (A) Mac-N354C, (B) Mac-N354E, (C) Mac-N354H, (D) Mac-H310C e (E) selvagem. Inseto em C, D e E: intervalo linear da curva.

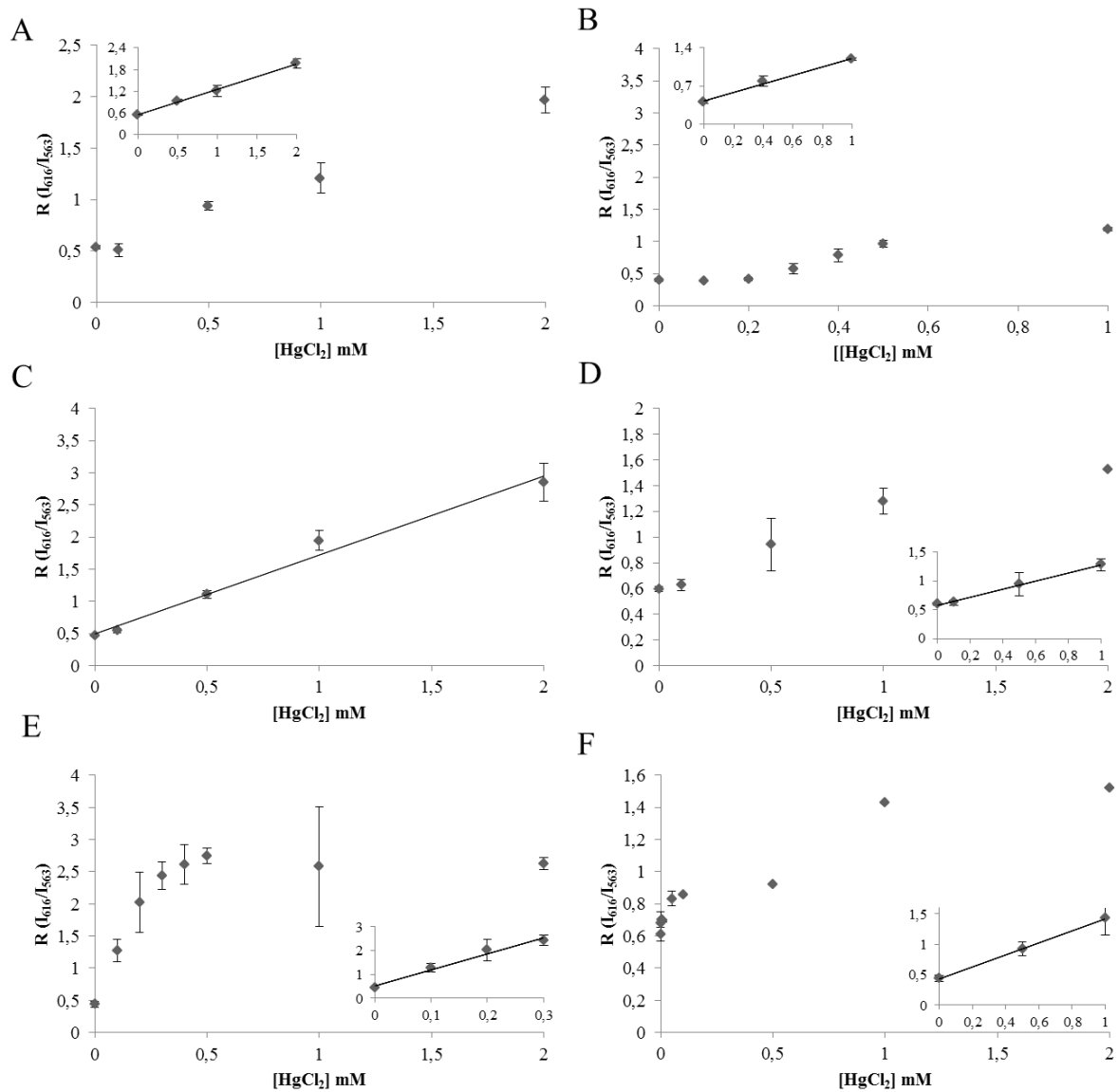


Figura 37. Efeito da concentração de HgCl_2 na razão das intensidades da bioluminescência no λ_{verde} e $\lambda_{\text{vermelho}}$ ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) usando a luciferase de *Macrolampis* sp2 modificada: (A) selvagem, (B) Mac-N354E, (C) Mac-N354H, (D) Mac-H310C, (E) Mac-N354C e (F) Mac H310C/N354C. Inseto em A, B, D, E e F: intervalo linear da curva.

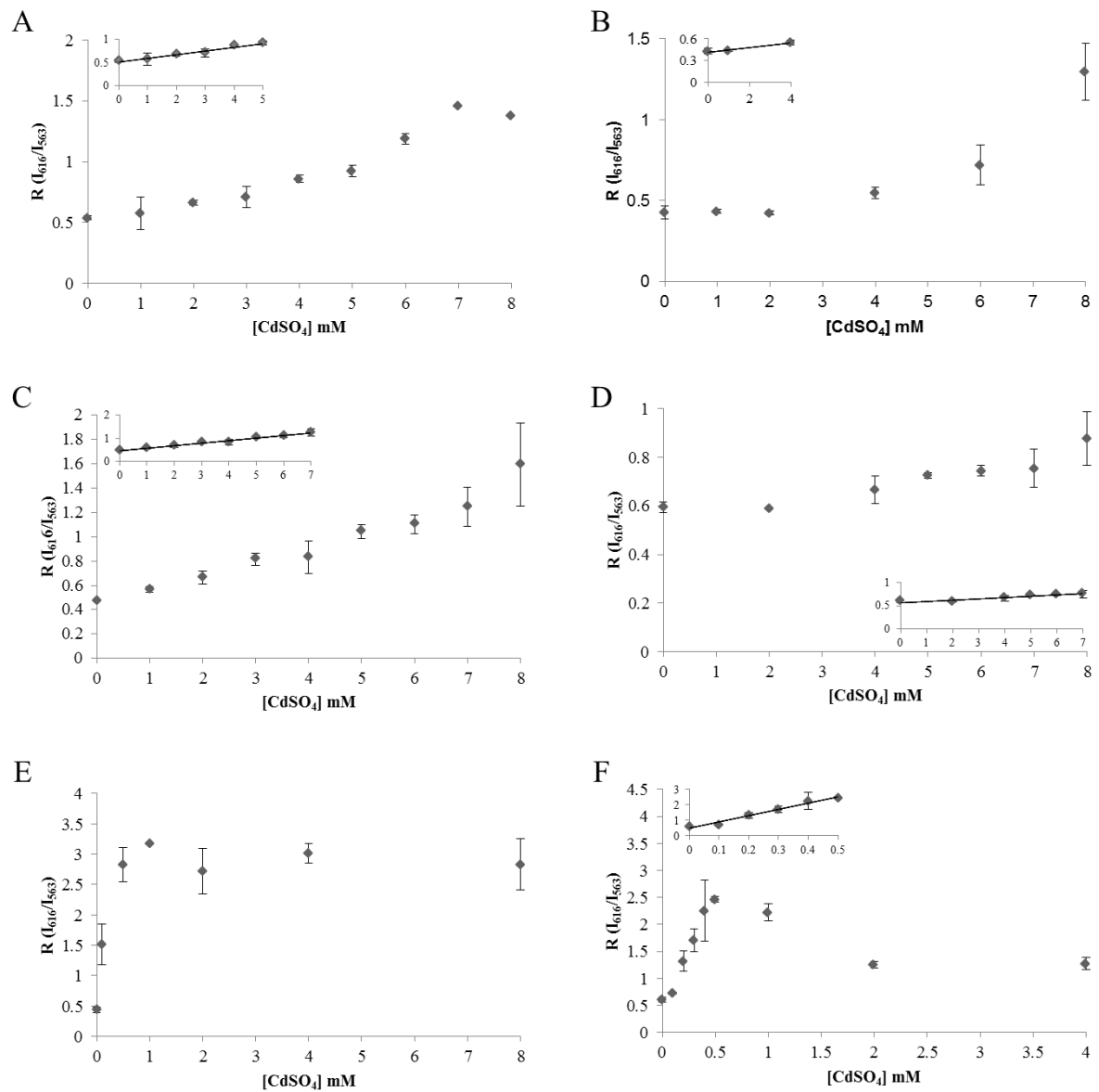


Figura 38. Efeito da concentração de CdSO_4 na razão das intensidades da bioluminescência no λ_{verde} e $\lambda_{\text{vermelho}}$ ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) usando a luciferase de *Macrolampis* sp2 modificada: (A) selvagem, (B) Mac-N354E, (C) Mac-N354H, (D) Mac-H310C, (E) Mac-N354C e (F) Mac-H310C/N354C. Inseto em A, B, C, D e F: intervalo linear da curva.

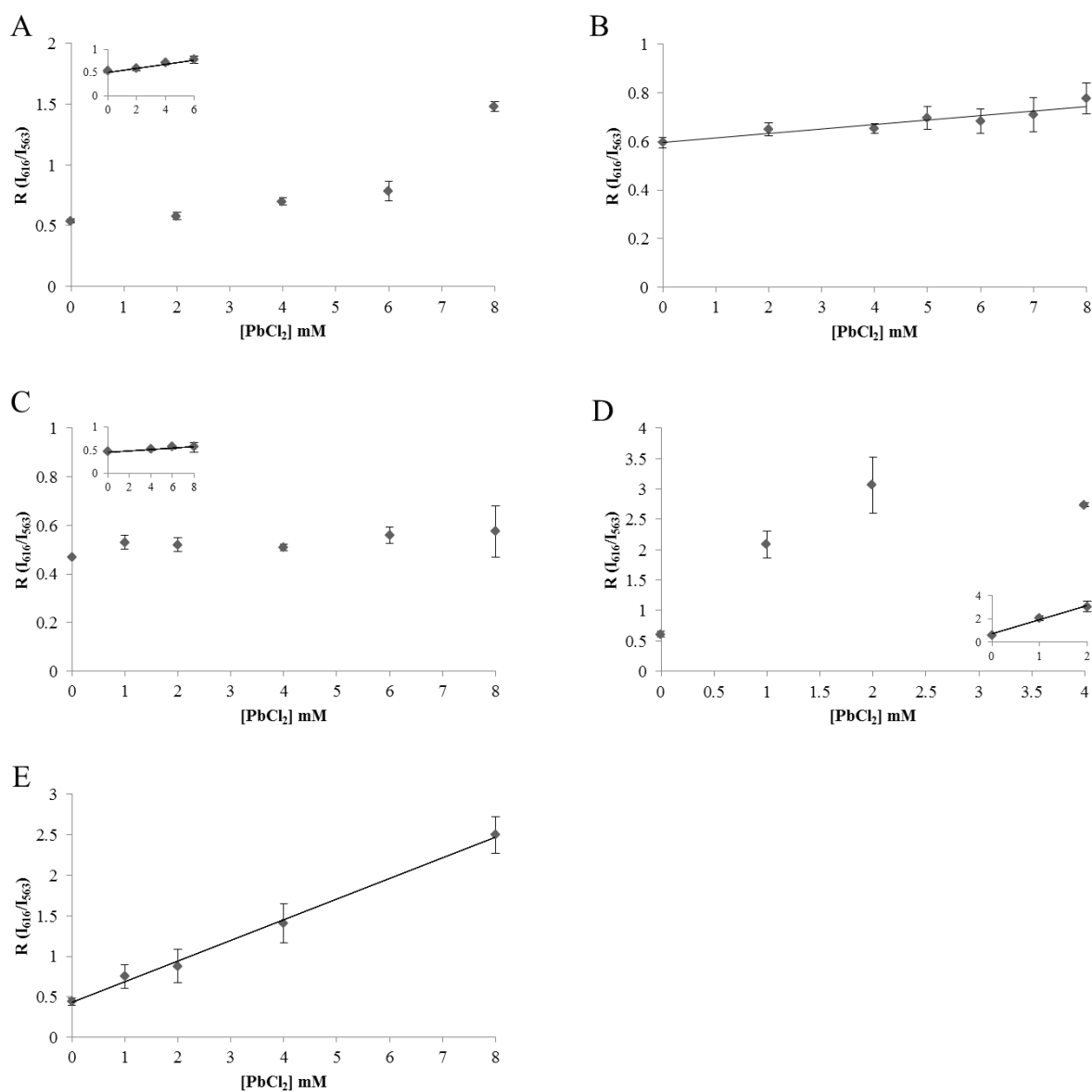


Figura 39. Efeito da concentração de PbCl_2 na razão das intensidades da bioluminescência no λ_{verde} e $\lambda_{\text{vermelho}}$ ($R = I_{\text{vermelho}}/I_{\text{verde}}$) usando a luciferase de *Macrolampis* sp2 modificada: (A) selvagem, (B) Mac- H310C, (C) Mac-N354H, (D) Mac-H310C/N354C e (E) Mac-N354C. Inseto em A, C e D: intervalo linear da curva.

Nos mutantes mais sensíveis, a curva da concentração de metal $\times R$ é mais inclinada e estendida para concentrações mais baixas, dando o limite de detecção da análise ratiométrica (mínima concentração que resulta num deslocamento espectral mensurável). Entre as luciferases mutantes, Mac-N354C apresenta o menor limite de detecção para Cd^{2+} , Zn^{2+} e Hg^{2+} ($< 0,1$ mM), enquanto que o mutante Mac-N354H apresenta menor limite de detecção para Ni^{2+} ($< 0,1$ mM).

Uma vez que a concentração intracelular estimada para zinco em células humanas é em torno de 200–300 μM (HOWARD *et al.*, 1991), é possível em princípio, usar os mutantes Mac-N354C ou Mac-H310C/N354C, os quais possuem um limite de detecção abaixo de 100

μM , para detectar flutuações de concentração de zinco de maior magnitude dentro dessas células.

5.3.4.1 Comparação das luciferases pH- e metal-sensitivas com outros biossensores luminescentes de pH e metais

Biossensores luminescentes para metais podem ser divididos em fluorescentes e quimio- ou bioluminescentes. A maioria dos biossensores luminescentes usados atualmente é fluorescente. Os biossensores fluorescentes podem ainda ser divididos naqueles que são baseados na intensidade, nos quais a intensidade num único comprimento de onda aumenta ou diminui em resposta à concentração de metal; e os ratiométricos, nos quais ocorrem mudanças espectrais que podem ser quantificadas pela razão das intensidades em diferentes comprimentos de onda, possuindo vantagens de especificidade e seletividade.

Similarmente aos sensores fluorescentes, biossensores bioluminescentes são normalmente baseados em medidas da intensidade da luminescência. Biossensores não específicos *light off* baseados em bactérias bioluminescentes são há muito utilizados para detectar metais, enquanto que biossensores bioluminescentes *light on* baseados no *lux-CDABE* e em luciferases de vagalumes já foram desenvolvidos para detectar mercúrio e arsênio disponível baseado no aumento da intensidade da bioluminescência (SELIFONOVA *et al.*, 1993; HATTORI *et al.*, 2013).

Com exceção de sistemas BRET usados para avaliar interações de proteínas, o uso de biossensores bioluminescentes ratiométricos é incomum, não existindo ainda para detecção de mudanças de pH ou concentração de metais. Aqui apresentamos o primeiro biossensor ratiométrico para o pH e metais usando uma única luciferase de vagalume. Em geral, nosso biossensor ratiométrico tem a vantagem de ser mais específico do que biossensores baseados em intensidade, sendo insensíveis a variações de concentração de luciferase e dos substratos ATP e luciferina, e não sofrendo os efeitos colaterais de biossensores fluorescentes, como fototoxicidade, auto-absorção e autofluorescência.

Comparação com outros biossensores luminescentes de pH. No caso de biossensores de pH, o uso de biossensores fluorescentes tem sido mais comum. Técnicas para análise do pH com o uso de fluoróforo sensíveis ao pH foram as primeiras a serem utilizadas para análise do pH em células de mamíferos e bacterianas, porém seu uso é limitado uma vez que esse composto mede o pH intracelular somente do citosol ou do núcleo (BREEUWER *et al.*, 1996; PORCELLI *et al.*, 2001; CONCHA, 2009). Já o uso da GFP permite uma medida mais

específica do pH; porém, o uso da fluorescência pode causar danos celulares como fototoxicidade devido à necessidade da irradiação por luz azul (BREEUWER *et al.*, 1996; ASAI *et al.*, 2007; NAKAJIMA *et al.*, 2010; MAHON *et al.*, 2011; BENCINA, 2013).

A aplicação de proteínas bioluminescentes (luciferases ou fotoproteínas) para análise do pH intracelular é recente. Hattori e colaboradores (2013) construíram um indicador fotoinativável bioluminescente baseado na combinação de um fragmento de luciferase em complementação com a fotoproteína 1 (LOV-2) para a medida da acidificação intracelular. A irradiação de luz diminui a atividade da bioluminescência e é recuperada gradualmente. Os autores mostraram que o tempo de recuperação estava correlacionado com o pH, independentemente das concentrações de luciferina ou ATP, fornecendo uma metodologia em tempo real *in vivo* para estimar a acidificação em células apoptóticas e autofágicas. Apesar da potencial aplicabilidade dessa tecnologia, isso requer duas proteínas distintas (LOV-2 e a complementação com a luciferase) com diferentes requerimentos bioquímicos (ATP e FMNH₂), a fotoirradiação usando luz azul com seu potencial de efeito fototóxico, aumentando a complexidade da análise (HATTORI *et al.*, 2013). Por outro lado, sensores bioluminescentes ratiométricos para estas finalidades ainda não são conhecidos.

O uso de luciferase de vagalume como biossensor ratiométrico de pH pode ser usado para estimar pH no intervalo fisiológico de pH 6,0–8,5. Além disto, o gene da luciferase pode ser endereçado para diferentes compartimentos celulares e tipos de células, para averiguar variações fisiológicas e patológicas de pH em tempo real.

Comparação com sensores luminescentes de metais. Sensores de mercúrio estão entre os mais importantes devido à sua toxicidade (ver revisões KIM *et al.*, 2012; HESSELS & MERKX, 2015), uma vez que concentrações de 100 µM de HgCl₂ em células de mamíferos são tóxicas e afetam a divisão celular, enquanto que concentrações em torno de 10 µM são responsáveis por causar três vezes mais aberrações/anormalidades (HOWARD *et al.*, 1991). Foram desenvolvidos sensores baseados no gene *lux-CDABE* com um baixo limite de detecção (concentrações menores que 0,01 mM) (XU *et al.*, 2015), porém, para estimar a biodisponibilidade desse metal em células não é fácil.

Sensores de zinco que usam proteínas fluorescentes para estimar concentrações intracelulares são importantes para investigar a homeostase celular (ver revisão LIU *et al.*, 2014). Esses tipos de sensores estão sendo usados para detectar o zinco em amostras de água e células vivas num alcance de 0,5–10 µM (AYDIN *et al.*, 2014; HOSSEINI *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2015; TIAN *et al.*, 2015).

Nossa abordagem ratiométrica usando uma única luciferase de vagalume se mostra especialmente interessante para estimar concentrações de zinco que tem interesse fisiológico, e biodisponibilidade de mercúrio e cádmio dada suas toxicidades.

Com relação ao zinco, as luciferases Mac-N354C e H310C/N354C, são interessantes por possuírem um limite de detecção abaixo de 100 μM desde que a concentração intracelular estimada de zinco em células humanas está em torno de 200–300 μM (MARET, 2015), Entretanto, devido a concentração de Zn^{2+} livre no citosol de muitas outras células ser estimado entre 0,1–1 nM (LIU *et al.*, 2014), nossa abordagem ratiométrica ainda precisa de melhoramento para chegar a tal limite de detecção.

Com relação ao Hg^{2+} , a luciferase mutante Mac-N354C foi a mais sensível, apresentando um limite de detecção abaixo de 0,1 mM. Entretanto esta sensibilidade ainda é menor do que a requerida para detectar concentrações de mercúrio que são tóxicas (menores que 0,01 mM), portanto é necessário investigar e melhorar a sensibilidade dessa luciferase a esse metal.

Entre todas as combinações testadas, o maior efeito foi observado para o Cd^{2+} com a luciferase mutante Mac-N354C que causou o maior deslocamento para o vermelho entre todos os mutantes e metais, com um limite de detecção próximo de 50 μM . Uma vez que o cádmio causa diversos problemas no organismo mesmo em baixas concentrações (HORIGUCHI *et al.*, 2011), incluindo potencial carcinogênico e doenças cardiovasculares (ver revisão KIM *et al.*, 2012), a luciferase Mac-N354C se mostrou potencialmente útil para estimar concentrações intracelulares deste metal.

Vantagens adicionais da análise ratiométrica. Estes tipos de biossensores ratiométricos e metodologia associada oferecem a vantagem potencial de reportar dois eventos simultâneos em tempo real usando dois parâmetros: (I) a intensidade, que pode ser usada para reportar localização, expressão gênica ou concentração de ATP e (II) o espectro (análise ratiométrica), reportando flutuações de metais ou pH dentro da célula. Uma vez que as concentrações de ATP e D-luciferina não afetam o espectro de bioluminescência, a análise ratiométrica do pH ou metais é insensível a oscilações desses substratos dentro da célula. Assim, considerando que o rendimento quântico para algumas luciferases de besouros é conhecido, os valores da concentração da luciferase intracelular ou ATP podem ser a princípio estimados com precisão. Desta forma, este biossensor pode ser usado para reportar simultaneamente variações de pH, associadas ou não, com variações de ATP resultantes de alterações metabólicas em processos celulares normais e patológicos, incluindo fermentação do músculo lático, apoptose e

inflamação, fornecendo então o primeiro sistema repórter dual que emprega um único gene de luciferase. Finalmente, este tipo de biossensor e metodologia associada podem substituir o uso de alguns sistemas de genes repórteres duplos ou triplos que consomem tempo e são mais caros, para a análise simultânea de eventos celulares distintos em células eucarióticas, especialmente em células de mamíferos em tempo real. Apesar dessas vantagens, investigações futuras são necessárias para melhorar a sensibilidade, especificidade e, portanto, a viabilidade da aplicação da luciferase de vagalume como biossensor ratiométrico para metais ou pH dentro de células.

6 CONCLUSÕES

Mostramos aqui que a luciferase pH-sensitiva de *Macrolampis* sp2 é viável para a indicação ratiométrica do pH intracelular em bactérias e células de mamíferos. Imagens da bioluminescência de células de mamíferos transfectadas com a luciferase de *Macrolampis* sp2 exibiram uma alcalinização do pH durante a divisão celular e apoptose, sendo o primeiro relato desse evento usando imagem da bioluminescência, mostrando que essa abordagem pode ser usada para avaliar variações do pH intracelular em células patogênicas ou células durante a apoptose.

Mostramos também que os resíduos H310 e N354 constituem dois sítios críticos para ligação de metais responsáveis pela sensibilidade espectral das luciferases de vagalumes. Por meio da engenharia desses sítios, usando mutagênese sítio-dirigida, aumentamos a sensibilidade espectral de bioluminescência a metais fisiologicamente importantes como Zn^{2+} , e metais tóxicos, especialmente Cd^{2+} e Hg^{2+} . A resposta linear dessas luciferases modificadas à concentração de metais em dois comprimentos de onda diferentes (verde e vermelho) permitiu determinar a concentração de metais, demonstrando o potencial de aplicabilidade das luciferases e seus genes como biossensores bioluminescentes intracelulares de biodisponibilidade e intoxicação por metais.

Essas abordagens ratiométricas para estimar pH e concentração de metais intracelular usando uma única luciferase podem ser associadas com a intensidade da bioluminescência para analisar eventos de expressão gênica e/ou concentração intracelular de ATP, fornecendo o primeiro sistema repórter dual que emprega um único gene de luciferase de vagalume para análise simultânea de pH ou concentração de metais intracelular, e concentração de ATP ou nível de expressão gênica. O uso de um único gene repórter bioluminescente exibindo dois parâmetros (a razão da intensidade da bioluminescência em diferentes comprimentos de onda e a intensidade da bioluminescência) pode reduzir o tempo consumido, a complexidade e o preço de ensaios celulares que empregam diferentes genes repórteres para avaliar citotoxicidade e análise de distintos eventos celulares em células eucarióticas, especialmente em células de mamíferos por imagem em tempo real.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL-HALLEEM, D. *et al.* A luxCDABE-based bioluminescent bioreporter for the detection of phenol. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, v. 29, p. 233–237, 2002b.

ABD-EL-HALLEEM, D. *et al.* Acinetobacter bioreporter assessing heavy metals toxicity. **J. Basic Microbiol.**, v. 46, p. 339–347, 2006.

ALHADRAMI, H. A. Biosensors: Classifications, medical applications and future prospective. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 2017. doi: 10.1002/bab.1621.

ALIPOUR, B. S. *et al.* Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyrus turkestanicus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 325, p. 215–222, 2004.

AMARAL, D. T.; PRADO, R. A.; VIVIANI, V. R. Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera: Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single abdominal lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v. 11, p. 1259–1267, 2012.

AMARAL, D. T.; OLIVEIRA, G.; SILVA, J. R.; VIVIANI, V. R. A new orange emitting luciferase from the Southern-Amazon *Pyrophorus angustus* (Coleoptera: Elateridae) click-beetle: structure and bioluminescence color relationship, evolutionary and ecological considerations. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 15, p. 1148–1154, 2016.

AMARANTE-MENDES, G. P. Apoptose: programa molecular de morte celular. **Einstein**, v. 1, p. 15–18, 2003.

AMIRAND, C. *et al.* Intracellular pH in one-cell mouse embryo differs between subcellular compartments and between interphase and mitosis. **Biol. Cell**, v. 92, p. 409–419, 2000.

ANDO, Y. *et al.* Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission. **Nature Photonics**, v. 2, p. 44–47, 2008.

ÄNKÖ, M. L.; KURITTU, J.; KARP, M. An *Escherichia coli* biosensor strain for amplified and high throughput detection of antimicrobial agents. **J. Biomol. Screen.**, v. 7, p. 119–125, 2002.

ARORA, N. Recent advances in biosensors technology: A review. **Octa. J. Biosci.**, v. 1, p. 147–150, 2013.

AROSIO, D. *et al.* Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. **Nature Methods**, v. 7, n. 7, p. 516–520, 2010.

ASAI, R. *et al.* Beetle luciferases in measuring gene expression and imaging cell functions. In: VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. **Luciferases and fluorescent proteins: Principles and advances in biotechnology and bioimaging**. Transworld Research Network: India, 2007. p. 151–160.

AYDIN, Z.; WEI, Y.; GUO, M. An “off-on” optical sensor for mercury ion detection in aqueous solution and living cells. **Inorg. Chem. Comm.**, v. 50, p. 84–87, 2014.

BALUT, C. *et al.* Measurement of cytosolic and mitochondrial pH in living cells during reversible metabolic inhibition. **Kidney International**, v. 73, p. 226–232, 2008.

BARRY, M. A.; REYNOLDS, J. E.; EASTMAN, A. Etoposide-induced apoptosis in human hl-60 cells is associated with intracellular acidification. **Cancer Research**, v. 53, p. 2349–2357, 1993.

BECHARA, E. J. H.; VIVIANI, V. R. Luzes vivas na escuridão: Fatos e casos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, p. 3–40, 2015.

BENCINA, M. Illumination of the spatial order of intracellular pH by genetically encoded pH-sensitive sensors. **Sensors**, v. 13, p. 16736–16758, 2013.

BILLARD, P.; DUBOW, M. S. Bioluminescence-based assays for detection and characterization of bacteria and chemicals in clinical laboratories. **Clin. Biochem.**, v. 31, p. 1–14, 1998.

BIZZARRI, R. *et al.* Development of a novel GFP-based ratiometric excitation and emission pH indicator for intracellular studies. **Biophys. J.**, v. 90, p. 3300–3314, 2006.

BOND, J.; VARLEY, J. Use of Flow Cytometry and SNARF to calibrate and measure intracellular pH in NS0 cells. **Cytometry Part A**, v. 64A, p. 43–50, 2005.

BOSCH-OREA, C.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Biosensors and bioassays for environmental monitoring. In: PALCHETTI, I.; HANSEN, P.; BARCELÓ, D. **Comprehensive Analytical Chemistry**. Elsevier, v. 77, 2017. p. 337–383.

BRANCHINI, B. R. *et al.* A mutagenesis study of the putative luciferin binding site residues of firefly luciferase. **Biochem.**, v. 42, p. 10429–10436, 2003.

BRANCHINI, B. R. *et al.* Red- and green-emitting firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications. **Anal. Biochem.**, v. 345, p. 140–148, 2005.

BRANCHINI, B. R. *et al.* Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: Molecular cloning and expression. **Comp. Biochem. Physiol., Part B**, v. 145, p. 159–167, 2006.

BRANCHINI, B. R. *et al.* Thermostable red and green light-producing firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications. **Anal. Biochem.**, v. 361, p. 253–262, 2007.

BREEUWER, P. *et al.* A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6-)carboxyfluorescein succinimidyl ester. **App. Environm. Microbiol.**, v. 62, p. 178–183, 1996.

BUONASERA, K. *et al.* Biosensors: new frontiers for the environmental analysis. **Revista Politécnica**, ano 7, n. 13, p. 93–100, 2011.

CAMPBELL, A. K. **Chemiluminescence**: principles and applications in biology and medicine. Ellis Horwood: Chichester, UK, 1988. 608 p.

CARDONE, R. A. *et al.* The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. **Nature Rev. Cancer**, v. 5, p.786–795, 2005.

CHIEN-YUAN, C.; KARUBE, I. Biosensors and flow injection analysis. **Cur. Op. Biotech.**, v. 3, p. 31–19, 1992.

CODY, S. H. *et al.* Intracellular pH mapping with SNARF-1 and confocal microscopy. I: A quantitative technique for living tissues and isolated cells. **Micron.**, v. 24, p. 573–580, 1993.

CONCHA, M. G. S. **Generación de un sensor de pH genéticamente codificado capaz de medir pH extracelular en microdominios en membranas basolaterales de células epiteliales**. 2009. 93 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Bioquímica) - Faculdade de Ciências, Universidade Austral do Chile, Valdivia, 2009.

CONTI E., FRANKS N. P., BRICK, P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. **Structure**, v. 4, p. 287–298, 1996.

CORBISIER, P. *et al.* Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental sample. **Anal. Chem. Acta.**, v. 387, p. 235–244, 1999.

COSTA, G. S. **Aplicação de biossensor microbiano bioluminescente na detecção de HG (II)**. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; PIOVANI, M. R. Avaliação do teor de metais em sedimento do Rio Betari no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira - PETAR, São Paulo, Brasil. **Quím. Nova**, v. 29, p. 40–45, 2006.

CROWSON, R. A. A review of the classification of Cantharoidea (Coleoptera), with the definition of two new families, Cneoglossidae and Omethidae. **Rev. Univ. Madrid**, v. 21, p. 35–77, 1972.

CUI, D. *et al.* Novel fluorescent pH sensors based on intramolecular hydrogen bonding ability of naphthalimide. **Org. Lett.**, v. 6, p. 2757–2760, 2004.

CURRIN, R. T. *et al.* Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox. **FASEB J.**, v. 5, p. 207–210, 1991.

DAI, H. *et al.* Increase of intracellular pH in p53-dependent apoptosis of thymocytes induced by gamma radiation. **Radiation Res.**, v. 150, p. 183–189, 1998.

DANSEN, T. *et al.* Peroxisomes in human fibroblasts have a basic pH. **Nature Cell Biol.**, v. 2, p. 51–53, 2000.

DAUNERT, S. *et al.* Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. **Chem. Review**, v. 100, p. 2705–2738, 2000.

DEVINE, J. H. *et al.* Luciferase from the east European firefly *Luciola mingrelica*: cloning and nucleotide sequence of cDNA, overexpression in *E. coli* and purification of the enzyme. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1173, p. 121–132, 1993.

ELTZOV, E.; MARKS, R. S. Whole-cell aquatic biosensors. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 400, p. 895–913, 2011.

EMAMZADEH, A. R. *et al.* cDNA Cloning, expression and homology modeling of a luciferase from the firefly *Lampyroidea maculata*. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 39, p. 578–585, 2006.

FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. P.; CUNHA, C. L. N. Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax* (Garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Rev. Gestão Cost. Int.**, v. 10, p. 229–241, 2010.

FONTENELE, A. P. G.; PEDROTTI, J. J.; FORNARO, A. Avaliação de metais traços e íons majoritários em águas de chuva na cidade de São Paulo. **Quím. Nova**, v. 32, p. 839–844, 2009.

FUTRA, D. *et al.* Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in alginate microspheres for monitoring heavy metal toxicity in environmental waters. **Sensors**, v. 14, p. 23248–23268, 2014.

GABRIEL, G. V. M.; LOPES, P. S.; VIVIANI, V. R. Suitability of *Macrolampis* firefly and *Pyrearinus* click beetle luciferases for bacterial light off toxicity biosensor. **Anal. Biochem.**, v. 445, p. 72–78, 2014.

GIREESH-BADU, P.; CHAUDHARI, A. Development of a broad-spectrum fluorescent heavy metal bacterial biosensor. **Mol. Biol. Rep.**, v. 39, p. 11225–11229, 2012.

GOMES, S. A. A. S.; REBELO, M., J. F. A new laccase biosensor for polyphenols determination. **Sensors**, Basel, v. 3, p. 166–175, 2003.

GOTTLIEB, R. A. *et al.* Cell acidification in apoptosis: Granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H⁺-ATPase. **PNAS**, v. 92, p. 5965–5968, 1995.

GOTTLIEB, R. A. Cell acidification in apoptosis. **Apoptosis**, v. 1, p. 40–48, 1996.

HAN, A. *et al.* Fluorescent sensor for Hg²⁺ detection in aqueous solution. **Sensors and Actuators B**, v. 198, p. 274–277, 2014.

HARMEL, V. C. **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais.** 2004. 100 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2004.

HASTINGS, J. W. Biological diversity, chemical mechanisms and evolutionary origins of bioluminescent systems. **J. Mol. Evol.**, Basingstoke, v. 19, p. 309–321, 1983.

HATTORI, M. *et al.* Sustained accurate recording of intracellular acidification in living tissues with a photo-controllable bioluminescent protein. **PNAS**, v. 110, p. 9332–9337, 2013.

HERRING, P. J. A classification of luminous organisms. In: HENRRING, P. **Bioluminescence in action**. London: Academic Press, 1978. p. 461–476.

HESSELS, A. M.; MERKX, M. Genetically-encoded FRET-based sensors for monitoring Zn²⁺ in living cells. **Metallomics**, v. 7, p. 258–266, 2015.

HIRANO, T. *et al.* Spectroscopic studies of the color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence with amino-analogs of luciferin and oxyluciferin. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 11, p. 1281–1284, 2012.

HORIGUCHI, H.; OGUMA, E.; KAYAMA, F. Cadmium induces anemia through interdependent progress of hemolysis, body iron accumulation, and insufficient erythropoietin production in rats. **Toxicol. Sci.**, v. 122, p. 198–210, 2011.

HOSSEINI, M. *et al.* A turn-on fluorescent sensor for Zn²⁺ based on new Schiff's base derivative in aqueous media. **Sensors and Actuators B**, v. 198, p. 411–415, 2014.

HOWARD, W. *et al.* Induction of chromosome changes by metal compounds in cultured CHO cells. **Toxicol. Lett.**, v. 56, p. 179–186, 1991.

HU, J. *et al.* A convenient ratiometric pH probe and its application for monitoring pH change in living cells. **Sensors and Actuators B**, v. 196, p. 194–202, 2014.

IMANI, M. *et al.* Design and introduction of a disulfide bridge in firefly luciferase: increase of thermostability and decrease of pH sensitivity. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 9, p. 1167–1177, 2010.

ISHAQUE, A.; AL-RUBEAI, M. Use of intracellular pH and annexin-V flow cytometric assays to monitor apoptosis and its suppression by *bcl-2* over-expression in hybridoma cell culture. **J. Immunol. Methods**, v. 221, p. 43–57, 1998.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2. ed. (the "Gold Book"). Copiado de A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line correta versão: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) criado por M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; atualizações copiadas por A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook. In: IUPAC, **International Union of Pure and Applied Chemistry**. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/B00663.html>>. Acesso em: 25.08.2011.

IVASK, A.; VIRTA, M.; KAHRU, A. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil. **Soil Biol. Biochem.**, v. 34, p. 1439–1447, 2002.

IVASK, A. *et al.* Recombinant luminescent bacterial sensors for the measurement of bioavailability of cadmium and lead in soils polluted by metal smelters. **Chemosphere**, v. 55, p. 147–156, 2004.

IVASK, A.; RÕLOVA, T.; KAHRU, A. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. **BMC Biotechnol.**, v. 9:41, 2009.

JANKOWSKI, A. *et al.* In Situ measurements of the pH of mammalian peroxisomes using the fluorescent protein pHluorin. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 48748–48763, 2001.

JORDÃO, C. P. *et al.* Contaminação de sedimentos fluviais por metais pesados nas proximidades de uma indústria metalúrgica em Minas Gerais. **Geochim. Brasil**, v. 4, p. 9–15, 1990.

KAJIYAMA, N.; NAKANO, E. Isolation and characterization of mutants of firefly luciferase which produce different colors of light. **Protein Eng.**, v. 4, p. 691–693, 1991.

KHALED, A. R. *et al.* Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. **PNAS**, v. 96, p. 14476–14481, 1999.

KIM, J. *et al.* Early mitochondrial hyperpolarization and intracellular alkalinization in lactacystin-induced apoptosis of retinal pigment epithelial cells. **JPET**, v. 305, p. 474–481, 2003.

KIM, H. N. *et al.* Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, p. 3210–3244, 2012.

KNEEN, M. *et al.* Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. **Biophys. J.**, v. 74, p. 1591–1599, 1998.

KOKSHAROV, M. I.; UGAROVA, N. N. Random mutagenesis of *Luciola mingrelica* firefly luciferase mutant enzymes with bioluminescence spectra showing low pH sensitivity. **Biochem.**, v. 73, p. 862–869, 2008.

KRATASYUK, V. A.; ENSIMBEKOVA, E. N.; VETROVA, E. V. Biosensors based on bacterial bioluminescence for environmental monitoring. In: TSUJI, A. *et al.* **Bioluminescence and Chemiluminescence: progress and perspectives**. Yokohama: World Scientific, 2004. p. 413–416.

KRULWICH, T. A.; SACHS, G.; PADAN, E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. **Nature**, v. 9. p. 330–343, 2011.

KURVET, I. *et al.* *LuxCDABE*—transformed constitutively bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity screening: comparison with naturally luminous *Vibrio fischeri*. **Sensors**, v. 11, p. 7865–7878, 2011.

KWON, H. *et al.* Bioluminescence imaging of dual gene expression at the single-cell level. **Biotechniques**, v. 48, p. 460–462, 2010.

LAGADIC-GOSSMANN, D.; HUC, F.; LECUREUR, V. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, p. 953–961, 2004.

LAM, Y.; LIN, A. K. L. C.; HO, C. A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation of intracellular environment in human normal and sickle cell blood. **Blood**, v. 54, p. 196–209, 1979.

LAWRENCE, J. F., NEWTON, A. F. Jr. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references, and data on family-group names). In: PAKALUK, J.; SLIPINSKY, S. A. **Biology, phylogeny and classification of Coleoptera**. Poland: Warsaw, 1995, p. 779–1006.

LEMASTERS, J. J. *et al.* The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1366, p. 177–196, 1998.

LI, J.; EASTMAN, A. Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. **J. Biom. Chem.**, v. 270, p. 3203–3211, 1995.

LI, Y. *et al.* Cloning and sequencing of a cDNA for the firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1339, p. 39–52, 1997.

LIAO, V. H. *et al.* Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein-based bacterial biosensors. **Environm. Pollution**, v. 142, p. 17–23, 2006.

LIN, K.; HUANG, T. Design of heavy metals monitoring system in water based on WSN and GPRS. **Sensors & Transducers**, v. 168, p. 150–154, 2014.

LIU, H.; VENKATESAN, P.; WU, S. A sensitive and selective fluorescent sensor for Zinc(II) and its application to living cell imaging. **Sensors and Actuators B**, v. 203, p. 719–725, 2014.

LLOPIS, J. *et al.* Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. **PNAS**, v. 95, p. 6803–6808, 1998.

MAHON, M. J. pHluorin2: an enhanced, ratiometric, pH-sensitive green fluorescent protein. **Adv. Biosci. Biotechnol.**, v. 2, p. 132–137, 2011.

MARQUES, S. M.; GONÇALVES, L. M.; ESTEVES DA SILVA, J. C. An optimized firefly luciferase bioluminescent assay for the analysis of free fatty acids. **Photochem. Photobiol.**, v. 91, p. 980–984, 2015.

MARET, W. Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules. **Metallomics**, v. 7, p. 202–211, 2015.

MARSULLO, T. *et al.* Development of a biosensor for copper detection in aqueous solutions using an *Anemonia sulcata* recombinant GFP. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 172, p. 2175–2187, 2014.

MATOKA, C. M.; OMOLO, S. O.; OCHIENG' ODALO, J. Heavy metal bioaccumulation as indicators of environmental pollution and health risks. **IOSR-JESTFT**, v. 8, p. 24–31, 2014.

McELROY, W. D., DeLUCA, M. Chemistry of firefly bioluminescence. In: HERRING, P. J. (Ed.). **Bioluminescence in Action**. New York: Academy Press, 1978. p. 109–127.

McQUEEN, A. BAILEY, J. E. Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion: correlation with effects on intracellular pH. **Biop. Eng.**, v. 6, p. 49–61, 1991.

MICHELINI, E. *et al.* Analytical and biotechnological use of bioluminescent proteins. In: VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. **Luciferases and fluorescent proteins: Principles and advances in biotechnology and bioimaging**. Transworld Research Network: India, 2007. p. 161–182.

MIRASOLI, M. *et al.* Development and characterization of a fluorescent whole-cell biosensor for L-arabinose with internal response correcting using two GFP mutants. In: STANLEY, P. E.; KRICKA, L. J. **Bioluminescence and Chemiluminescence: progress and current applications**. Singapore: World Scientific, 2002. p. 331–334.

MIRASOLI, M.; MICHELINI, E. Analytical bioluminescence and chemiluminescence. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 406, p. 5529–5530, 2014.

MORADI, A. *et al.* Effect of charge distribution in a flexible loop on the bioluminescence color of firefly luciferases. **Biochem.**, v. 48, p. 575–582, 2009.

MORCIANO, G. *et al.* Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. **Nature Protocols**, v. 12, p. 1542–1562, 2017.

MUSGROVE, E.; SEAMAN, M.; HEDLEY, D. Relationship between cytoplasmic pH and proliferation during exponential growth and cellular quiescence. **Exp. Cell Res.**, v. 172, p. 65–75, 1987.

NACIRI, M.; AL-RUBEAI, M. Non-invasive flow cytometric monitoring of pH_i in cell culture processes using EGFP. **J. Immunol. Methods**, v. 315, p. 185–190, 2006.

NAKAJIMA, Y.; OHMIYA, Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. **Expert Opinion Drug Discovery**, v. 5, p. 835–849, 2010.

NAKAJIMA, Y. *et al.* Improved expression of novel red- and green-emitting luciferases of *Phrixothrix* railroad worms in mammalian cells. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, p. 948–951, 2004.

NAKAJIMA, Y. *et al.* Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. **BioTechniques**, v. 38, p. 891–894, 2005.

NAKAJIMA, Y. *et al.* Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. **PLoS One**, v. 5, p. 100–111, 2010.

NAKATSU, T. *et al.* Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. **Nature**, v. 440, p. 372–376, 2006.

NAYLOR, L. H. Reporter gene technology: the future looks bright. **Biochem. Pharm.**, v. 58, p. 749–757, 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, Sarvier, São Paulo, 3. ed, 2006.

NILSSON, C. *et al.* Cytosolic acidification and lysosomal alkalization during TNF- α induced apoptosis in U937 cells. **Apoptosis**, v. 11, p. 1149–1159, 2006.

NIWA, K. *et al.* Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v. 86, p. 1046–1049, 2010.

OHMIYA, Y. *et al.* Cloning, expression, and sequence analysis of cDNA for the luciferase from the Japanese fireflies, *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula*. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 309–313, 1995.

OHMIYA, Y. Cell based assays and imaging. 2014. **Applications of Bioluminescence**. Disponível em: <<http://photobiology.info/Ohmiya.html>>. Acesso em: 05 de Abril de 2016.

PATACAS, R. C. **Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. 2007. 139 f. Dissertação. (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2007.

PELLINEN, T.; HUOVINEN, T.; KARP, M. A cell-free biosensor for the detection of transcriptional inducers using firefly luciferase as a reporter. **Anal. Biochem.**, v. 330, p. 52–57, 2004.

PENG, X. *et al.* A selective fluorescent sensor for imaging Cd²⁺ in living cells. **JACS**, v. 129, p. 1500–1501, 2007.

PIRES, A. M. M.; MATTIAZZO, M. E.; BERTON, R. S. Ácidos orgânicos como extratores de metais pesados fitodisponíveis em solos tratados com lodo de esgoto. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 39, p. 671–676, 2004.

PÖEA-GUYON, S. *et al.* The enhanced cyan fluorescent protein: a sensitive pH sensor for fluorescence lifetime imaging. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 405, p. 3983–3987, 2013.

PORCELLI, A. M. *et al.* Targeting of reporter molecules to mitochondria to measure calcium, ATP, and pH. **Methods in Cell Biol.**, v. 65, cap. 20, p. 353–381, 2001.

QUATRESOUS, E.; LEGRAND, C.; POUVREAU, S. Mitochondria-targeted cpYFP: pH or superoxide sensor? **J. Gen. Physiol.**, v. 140, p. 567–570, 2012.

REZENDE, E. I. P.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; ABATE, G. Estudo de sorção de herbicidas pelos argilominerais vermiculita e montmorilonita. **Quím. Nova**, v. 34, p. 21–27, 2011.

RIETHER, K. B.; DOLLARD, M.; BILLARD, P. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli zntAp::lux* and *copAp::lux*-based biosensors. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v. 57, p. 712–716, 2001.

ROZEN, Y.; NEJIDAT, A.; BELKIN, S. Luminous microbial biosensors for the specific detection of halogenated organics. In: HASTINGS, J. W.; KRICKA, L. J.; STANLEY, P. E. **Bioluminescence and Chemiluminescence: molecular reproduction with photons**. Massachusetts: John Wiley & Sons, 1996. p. 271–274.

RUBINGER, C. F. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais**. 2009. 89 f. Dissertação. (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SALA-NEWBY, G. B.; THOMSON, C. M.; CAMPBELL, A. K. Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyris noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. **Biochem. J.**, v. 313, p. 761–767, 1996.

SALA-NEWBY, G. B. *et al.* Bioluminescent and chemiluminescent indicators for molecular signalling and function in living cells. **Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis**. London: Academic Press, 1999. p. 251–271.

SCHUSTER, M.; UNTERREITMAIER, E. Fluorometric detection of heavy metals with pyrene substituted N-acylthioureas. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 346, p. 630–633, 1993.

SEKSEK, O.; BOLARD, J. Nuclear pH gradient in mammalian cells revealed by laser microspectrofluorimetry. **J. Cell Sci.**, v. 109, p. 257–262, 1996.

SELIFONOVA, O.; BURLAGE, R.; BARKAY T. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3083–3090, 1993.

SELIGER, H. H.; McELROY, W. D. The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. **PNAS**, v. 52, p. 75–81, 1964.

SMITH, J. W. *et al.* Optimizing biosensor design with computer modeling: a case study involving creatine. In: CASE, J. F. *et al.* **Bioluminescence and Chemiluminescence**. Singapore: World Scientific, 2000. p. 309–312.

SONG, E. J. *et al.* A fluorescence sensor for Zn²⁺ that also acts as a visible sensor for Co²⁺ and Cu²⁺. **Sensors and Actuators B**, v. 213, p. 268–275, 2015.

SRIVASTAVA, J.; BARBER, D. L.; JACOBSON, M. P. Intracellular pH sensors: Design principles and functional significance. **Physiology**, v. 22, p. 30–39, 2007.

TAFRESHI, N. K. *et al.* The influence of insertion of a critical residue (Arg³⁵⁶) in structure and bioluminescence spectra of firefly luciferase. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 8641–8647, 2007.

TANG, L. *et al.* A Phenylbenzothiazole derived fluorescent sensor for Zn(II) recognition in aqueous solution through “Turn-On” excited-state intramolecular proton transfer emission. **J. Fluoresc.**, v. 24, p. 1487–93, 2014.

TANTAMA, M.; HUNG, Y. P.; YELLEN, G. Imaging intracellular pH in live cells with a genetically-encoded red fluorescent protein sensor. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 133, p. 10034–10037, 2011.

TATSUMI, H. *et al.* Luciferase cDNA from Japanese firefly *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *E. coli*. **J. Biolum. Chemilum.**, v. 3, p. 75–78, 1989.

TATSUMI, H.; KAJIYAMA, N.; NAKANO, E. Molecular cloning and expression in *E. coli* of a cDNA encoding luciferase of a firefly *Luciola lateralis*. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1131, p. 161–165, 1992.

TAURIAINEN, S. *et al.* Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. **App. Environm. Microbiol.**, v. 63, p. 4456–4461, 1997.

_____. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. **Biosens. Bioelectron.**, v. 13, p. 931–938, 1998.

TAURIAINEN, S. M.; VIRTA, M. P. J.; KARP, M. T. Detecting bioavailable toxic metals and metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria. **Wat. Res.**, v. 34, p. 2661–2666, 2000.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. **Quím. Nova**, v. 15, p. 147–154, 1992.

THOMAS, J. A. *et al.* Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. **Biochem.**, v. 18, p. 2210–2218, 1979.

TIAN, X. *et al.* A fluorescent sensor based on bicarboxamidoquinoline for highly selective relay recognition of Zn²⁺ and citrate with ratiometric response. **Sensors and Actuators B**, v. 221, p. 923–929, 2015.

UGAROVA, N. N.; BROVKO, L. Y. Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence. **Luminescence**, v. 17, p. 321–330, 2002.

UMBUZEIRO, G. A.; RODRIGUES, P. F. **O teste de toxicidade com bactérias luminescentes e o controle da poluição**. São Paulo: ASEC: CRF, 2004.

VALTONEN, S. J.; KURITTU, J. S.; KARP, M. T. A luminescent *Escherichia coli* biosensor for the high throughput detection of beta-lactams. **J. Biomol. Screen.**, v. 7, p. 127–134, 2002.

van BEILEN, J. W. A.; BRUL, S. Compartment-specific pH monitoring in *Bacillus subtilis* using fluorescent sensor proteins: a tool to analyze the antibacterial effect of weak organic acids. **Frontiers Microbiol.**, v. 4, p. 1–11, 2013.

VERMA, N.; SINGH, M. Biosensors for heavy metals. **BioMetals**, v. 18, p. 121–129, 2005.

VIRGA, R. H. P.; GERALDO, L. P.; SANTOS, F. H. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, p. 779–785, 2007.

VIVIANI, V. R.; BECHARA, E. J. H. Biophysical and biochemical aspects of phengodid (railroad-worm) bioluminescence. **Photochem. Photobiol.**, v. 58, p. 615–622, 1993.

VIVIANI, V. R.; BECHARA, E. J. H. Bioluminescence of Brazilian fireflies (Coleoptera: Lampyridae): spectral distribution and pH-effect on luciferase-elicited colors. Comparison with elaterid and phengodid luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 490–495, 1995.

VIVIANI, V. R. *et al.* Cloning and molecular characterization of the cDNA for the Brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* luciferase. **Photochem. Photobiol.**, v. 70, p. 254–260, 1999a.

VIVIANI, V. R., BECHARA E. J. H., OHMIYA, Y. Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. **Biochem.**, v. 38, p. 8271–8279, 1999b.

VIVIANI, V. R. *et al.* Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. **BBRC**, v. 280, p. 1286–1291, 2001.

VIVIANI, V. R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. **CMLS**, v. 59, p. 1833–1850, 2002.

VIVIANI, V. R. *et al.* Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with European *Lampyris noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia* luciferases. **Comp. Biochem. Physiology, Part B Biochem. Mol. Biol.**, v. 139, p. 151–156, 2004.

VIVIANI, V. R. *et al.* A new firefly luciferase with bimodal spectrum: identification of structural determinants in spectral pH-sensitivity firefly luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v. 81, p. 843–848, 2005.

VIVIANI, V. R., Placa com luciferases imobilizadas em gel para análise de ATP e contaminação microbiológica, **Patente Brasileira** PI0604475-1 A2, 2006.

VIVIANI, V. R. *et al.* Active-site properties of *Phrixotrix* railroad worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases. **J. Biochem.**, v. 140, p. 467–474, 2006.

VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. Beetle luciferases: colorful lights on biological processes and diseases. **Photoprot. Bioanal.**, Darmstadt: Wiley-VCH, 2006. p. 49–63.

VIVIANI, V. R. *et al.* Few substitutions affect the bioluminescence spectra of *Phirixotrix* (Coleoptera: Phengodidae) luciferases: a site-directed mutagenesis survey. **Luminescence**, v. 22, p. 362–369, 2007.

VIVIANI, V. R. *et al.* The influence of the loop between residues 223-235 in beetle luciferase bioluminescence spectra: a solvent gate for the active site of pH-sensitive luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v. 84, p. 138–144, 2008a.

VIVIANI, V. R. *et al.* The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly luciferases. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 7, p. 159–169, 2008b.

VIVIANI, V. R. *et al.* A new blue-shifted luciferase from the brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties. **Photochem. Photobiol.**, v. 10, p. 1879–1886, 2011.

VIVIANI, V. R. *et al.* The luciferin binding site residues C/T311 (S314) influence the bioluminescence color of beetle luciferases through main-chain interaction with oxyluciferin phenolate. **Biochem.**, v. 52, p. 19–27, 2013.

VIVIANI, V. R. *et al.* Bioluminescence of beetle luciferases with 6'-amino-D-luciferin analogues reveals excited keto-oxyluciferin as the emitter and phenolate/luciferin binding site interactions modulate bioluminescence colors. **Biochem.**, v. 19, p. 5208–5220, 2014.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Quím. Nova**, v. 21, p. 551–556, 1998.

YAGI, K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v. 73, p. 1251–1258, 2007.

YANG, Z. *et al.* Macro-/micro-environment-sensitive chemosensing and biological imaging. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, p. 4563–4601, 2014.

XU, X. *et al.* Microbial availability of mercury: effective detection and organic ligand effect using a whole-cell bioluminescent bioreporter. **Ecotoxicol.**, v. 24, p. 2200–2206, 2015.

WHITE, E. H. *et al.* Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. **J. American Chem. Soc.**, v. 91, p. 2178–2180, 1968.

WILSON, T.; HASTINGS, J. W. Bioluminescence. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 14, p. 197–230, 1998.

WOOD, K. V. *et al.* Bioluminescent click beetles revisited. **J. Biolum. Chemilum.**, v. 4, p. 31–39, 1989.

WOOD, K. V. The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 662–673, 1995.

WOOD, K. V.; GRUBER, M. G. Transduction in microbial biosensors using multiplexed bioluminescence. **Bios. Bioelectron.**, v. 3, p. 207–214, 1996.

WOUTERSEN, M. *et al.* Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 400, p. 915–929, 2011.

ZHANG, J. *et al.* A BODIPY-based “turn-on” fluorescent and colorimetric sensor for selective detection of Cu^{2+} in aqueous media and its application in cell imaging. **Sensors and Actuators B**, v. 196, p. 117–122, 2014.

ZHOU, X. *et al.* An FRET-based ratiometric chemosensor for in vitro cellular fluorescence analyses of pH. **Biomaterials**, v. 33, p. 171–180, 2012.

ZHU, W.; LOH, T. Effects of Na^+/H^+ antiport and intracellular pH in the regulation of HL-60 cell apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1269, p. 122–128, 1995.

8 ARTIGOS PUBLICADOS

GABRIEL, G. V. M.; VIVIANI, V. R. Novel application of pH-sensitive firefly luciferases as dual reporter genes for simultaneous ratiometric analysis of intracellular pH and gene expression/location. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, p. 1661–1670, 2014.

GABRIEL, G. V. M.; VIVIANI, V. R. Engineering the metal sensitive sites in *Macrolampis* sp2 firefly luciferase and use as a novel bioluminescent ratiometric biosensor for heavy metals. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 8881–8893, 2016.