

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Daniel Rangel de Souza

**ESTRUTURA, FUNÇÃO E EVOLUÇÃO DAS LUCIFERASES DE
MASTINOCERINI (COLEOPTERA: PHENGODIDAE) E ORIGEM
BIOSINTÉTICA DA LUCIFERINA EM COLEÓPTEROS**

Sorocaba, 2023.

Daniel Rangel de Souza

**ESTRUTURA, FUNÇÃO E EVOLUÇÃO DAS LUCIFERASES DE
MASTINOCERINI (COLEOPTERA: PHENGODIDAE) E ORIGEM
BIOSSINTÉTICA DA LUCIFERINA EM COLEÓPTEROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental PPGBMA da Universidade Federal de São Carlos – *campus* Sorocaba para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, sob orientação do Prof. Dr. Vadim Viviani.

Sorocaba, 2023.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Daniel Rangel de Souza, realizada em 09/03/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Vadim Viviani (UFSCar)



Documento assinado digitalmente

VADIM VIVIANI

Data: 21/03/2023 16:14:14-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva (UFSCar)



Documento assinado digitalmente

MARYSTELA FERREIRA

Data: 21/03/2023 06:37:02-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Marystela Ferreira (UFSCar)

Profa. Dra. Simone Policena Rosa (UNIFEI)

Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani (USP)



Documento assinado digitalmente

SIMONE POLICENA ROSA

Data: 20/03/2023 16:01:17-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente

CASSIUS VINICIUS STEVANI

Data: 20/03/2023 17:09:52-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente

FLAVIO HENRIQUE DA SILVA

Data: 20/03/2023 19:32:40-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos n° 2018/17855-2 e n° 2010/05426-8; da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-401.867/2016-1).

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração dos genes ao cosmos.

Às minhas raízes humanas, meus genitores, Líria e Paulo, meus avós, Jura e Preta, que muito me ensinaram e todos aqueles que fazem parte da família terrestre.

Agradeço aos amigos que nos trazem alegrias quando tudo parece não fazer sentido.

À minha companheira e amiga Carol.

A todos aqueles que em algum momento dividiram comigo suas ideias, pensamentos e visões de mundo. Aos professores que passaram por minha vida, todos eles me ensinaram algo.

Agradeço a todo o pessoal da UFSCar Sorocaba (manutenção, limpeza, discentes, docentes, técnicos e administrativos), principalmente aos queridóculos da BioLic014, por proporcionarem grandes momentos de reflexão e aprendizado na minha formação.

A todos os colegas de laboratório que dividiram a bancada e seus conhecimentos durante essa pesquisa, aos amigos de coletas pela parceria nas viagens e nas trilhas.

Ao Prof. Dr. Vadim Viviani pela orientação.

Ao Prof. Dr. Danilo Amaral pelo apoio.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa (processos nº 2018/17855-2 e nº 2010/05426-8), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-401.867/2016-1).

“(…)

Quieta, a serpente

Se enrola nos seus pés

É Lucifer da floresta

Que tenta me abraçar

(…)

Tragam luvas negras

Tragam festas e *flores*

Tragam copos e dores

Tragam incensos e odores

Mas tragam Lúçifer pra mim

Em uma bandeja pra mim”

Ave, Lúçifer – Os Mutantes

RESUMO

A compreensão da origem e evolução da bioluminescência em coleópteros da superfamília Elateroidea, depende de um melhor entendimento da origem metabólica do substrato luciferina e da evolução das enzimas luciferases. Diversas luciferases de espécies das 4 famílias de coleópteros bioluminescentes (Lampyridae, Elateridae, Phengodidae e Rhagophthalmidae) já foram clonadas e investigadas por nosso e outros grupos de pesquisa nas últimas décadas. No entanto, apenas três luciferases funcionais da família Phengodidae foram clonadas e investigadas até agora, a luciferase emissora de luz vermelha da cabeça de *Phrixotrix hirtus* e a luciferase emissora de luz verde de *Phrixotrix vivianii*. Assim, a origem e evolução das luciferases das lanternas da cabeça e do corpo, bem como a relação entre estrutura e espectros de bioluminescência nestas enzimas, ainda estão incompletas, havendo a necessidade do estudo de outras luciferases oriundas das diferentes lanternas e estágios de vida de outras espécies que emitem cores intermediárias de luz. Dentro dessa temática, esta tese teve dois objetivos principais: (1) Aumentar o conhecimento da evolução da biologia e bioluminescência da família Phengodidae através da clonagem, expressão e caracterização dos cDNAs de novas luciferases ativas oriundas de diferentes lanternas e (2) entender a origem biossintética da luciferina de besouros. Pela primeira vez, conseguimos associar larva e adulto de uma espécie de fengodídeo, o *Stenophrixotrix pallens* encontrado no campus da UFSCar Sorocaba, através de análises moleculares dos genes 16S e 18S rRNA e dos espectros de bioluminescência. Clonamos os cDNAs de duas novas luciferases, uma oriunda da cabeça de *Brasilocerus* sp. e outra das lanternas laterais de *P. hirtus*, expressamos os mesmos em bactérias e caracterizamos estas luciferases. A luciferase da lanterna cefálica de *Brasilocerus* sp. apresentou um pico de emissão bioluminescente em 566 nm em pH=8, enquanto que a luciferase das lanternas laterais de *P. hirtus* apresenta um pico de emissão em 563 nm. A presença de uma única luciferase nos transcriptomas das lanternas laterais e da cabeça em *Brasilocerus*, as características espectrais das luciferases de larvas de *Stenophrixotrix pallens*, sugerem pela primeira vez que algumas espécies de Mastinocerini apresentam apenas uma isoforma de luciferase em diferentes lanternas e estágios de vida, diferentemente de *Phrixotrix spp.* As mutações R215T e a deleção da asparagina 351 na luciferase das lanternas laterais de *P. hirtus*, tiveram um efeito batocrômico de ~30 nm, confirmando a importância da arginina 215 e do loop 351-360 na determinação dos espectros de bioluminescência. Finalmente, para melhor entendermos a origem biossintética da luciferina em coleópteros, desenvolvemos bactérias bioluminescentes transformadas com a luciferase de *Amydetes vivianii* para avaliar a síntese *in vivo* de luciferina na presença dos precursores cisteína e quinonas. Estes estudos mostraram que a cisteína tem efeito detoxificante de *p*-benzoquinona concomitantemente com a formação de luciferina, sugerindo que a luciferina de coleópteros possa ter surgido como subproduto da detoxificação de quinonas.

Palavras-chaves: Bioluminescência; Fengodídeos; Luciferases; Luciferina.

ABSTRACT

The origin and evolution of bioluminescence in Coleoptera from the Elateroidea superfamily depend on a better understanding of the metabolic origin of the luciferin substrate and the luciferase enzymes evolution. Several luciferases from the 4 bioluminescent beetle families (Lampyridae, Elateridae, Phengodidae and Rhagophthalmidae) have already been cloned and investigated by our and other research groups in recent decades. However, only three functional luciferases from the Phengodidae family have been cloned and investigated so far, the red light-emitting luciferase from *Phrixotrix hirtus* head and the green light-emitting luciferase from *Phrixotrix vivianii*. Thus, the origin and evolution of head and lateral lanterns luciferases, as well as the relationship between structure and bioluminescence spectra in these enzymes, are still incomplete, needing to study other luciferases from different lanterns and life stages of other species that emit intermediate colors of light. Within this theme, this thesis had two main goals: (1) Increase knowledge of the bioluminescence evolution in the Phengodidae family through cloning, expression and characterization new active luciferases cDNA from different lanterns and (2) understand the biosynthetic origin of beetle luciferin. For the first time, we associate larva and adult of a phengodid specie, the *Stenophrixotrix pallens* found on the UFSCar Sorocaba campus, through molecular analyzes of the 16S and 18S rRNA genes and the bioluminescence spectra. We cloned two new luciferases cDNA, one from the *Brasilocerus* sp. head and another from *P. hirtus* lateral lanterns, we expressed them in bacteria and characterized these luciferases. Luciferase from *Brasilocerus* sp. head lantern presented a peak of bioluminescent emission at 566 nm in pH=8, while the luciferase from the *P. hirtus* lateral lanterns shows an emission peak at 563 nm. The presence of a single luciferase in the head and lateral lanterns transcriptomes of *Brasilocerus* sp., the kinetic and spectral characteristics of luciferase from *Stenophrixotrix pallens* larvae, suggest for the first time that some species of Mastinocerini present only one luciferase isoform in different lanterns and life stages, unlike *Phrixotrix* spp. The R215T mutation and the asparagine 351 deletion in the *P. hirtus* lateral lanterns luciferase had a bathochromic effect of ~30 nm, confirming the importance of arginine 215 and loop 351-360 in bioluminescence spectra determination. Finally, to better understand the biosynthetic origin of luciferin in coleopterans, we developed bioluminescent bacteria transformed with *Amydetes vivianii* luciferase to evaluate the in vivo synthesis of luciferin in the presence of cysteine and quinone precursors. These studies showed that cysteine has a detoxifying impact on *p*-benzoquinone concomitantly with luciferin formation, suggesting that coleopteran luciferin may have arisen as a by-product of quinone detoxification.

Keywords: Bioluminescence; Phengodidae; Luciferases; Luciferin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amy: luciferase do vagalume *Amydetes vivianii*

AMP: Adenosina monofosfato

ATP: Trifosfato de Adenosina

BQ: *p*-benzoquinona

BR(H): Luciferase ativa da cabeça de *Brasilocerus* sp.

CCD: Dispositivo de carga acoplada (*Charge-Coupled Device*)

cDNA: DNA complementar

CoA: Coenzima A

cps: Counts por segundo

D-cys: D-cisteína

DOPA: Dihydroxyphenylalanina

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilondiamina tetracético

IC₅₀: Concentração de determinado composto capaz de inibir 50% da atividade

IPTG: Isopropil 2-D-tiogalactopiranosídeo

K_M: Constante de Michaelis-Menten

LB: Lúria Bertani (Meio de cultura bacteriano)

L-cys: L-cisteína

LH₂: D-luciferina

NADA: N-acetildopamina

NBAD: N-β-alanildopamina

NCBI: Banco de dados (*National Center for Biotechnology Information*)

OD: Densidade óptica

ROS: Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

TAE: Tris-acetato-EDTA

TLC: Cromatografia de camada fina (*Thin Layer Chromatography*)

TRIS: Tris-hidroximetilaminometano

pC-PhLat: Luciferase das lanternas laterais de *P. hirtus* em vetor pColdII

PxGR: Luciferase emissora de luz verde das lanternas laterais de *P. vivianii*

PxRE: Luciferase emissora de luz vermelha da cabeça de *P. hirtus*

Ph(H)Transcript: Sequencia transcriptômica da luciferase da cabeça de *P. hirtus*

PhLant_1: Sequencia transcriptômica da luciferase da lanterna lateral de *P. hirtus*

Ph_lateral: Luciferase das lanternas laterais de *P. hirtus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de fengodídeos, popularmente conhecidos como “Larvas trenzinhos”: A) *Mastinocerus*; B) *Mastinomorphus* sp2; C) *Brasilocerus impressicollis*. Fonte: (VIVIANI; BECHARA, 1997); D) *Brasilocerus* sp. Fonte: acervo pessoal do Prof. Dr. Vadim Viviani; E) *Phrixotrix hirtus*. Fonte (ARNOLDI *et al.*, 2010).

Figura 2. Coleta de coleópteros bioluminescentes. Técnica da armadilha de luz com pano utilizada para fengodídeos do sexo masculino na fase adulta

Figura 3. Fengodídeo nas fases adulta e larval identificado como *Stenophrixotrix pallens*, coletados no Campus da UFSCAR Sorocaba. **A)** Adulto, vista dorsal; **B)** Adulto, vista lateral; **C)** Adulto exibindo sua bioluminescência; **D)** Larva, vista lateral; **E)** Larva, detalhe da cabeça. Fonte das imagens A, B, D e E: Dr. André Roza; Fonte da imagem C: Acervo pessoal do autor.

Figura 4. Espectros de bioluminescência *in vivo* da cabeça de larvas de *Stenophrixotrix pallens*.

Figura 5. Espectros de bioluminescência *in vitro* obtidos com extratos brutos de lanternas do adulto e da larva de *Stenophrixotrix pallens*.

Figura 6. Alinhamento das sequências de DNA do marcador molecular 16S amplificadas do indivíduo adulto e da larva de fengodídeo coletados no campus da UFSCAR Sorocaba.

Figura 7. Alinhamento das sequências de DNA do marcador molecular 18S amplificadas do indivíduo adulto e da larva de fengodídeos coletados no campus da UFSCAR Sorocaba.

Figura 8. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene marcador 16S de *Stenophrixotrix pallens* (destacado em vermelho) e outras sequências de espécies próximas depositadas no NCBI.

Figura 9. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene marcador 18S de *Stenophrixotrix pallens* (destacado em vermelho) e outras sequências de espécies próximas depositadas no NCBI.

Figura 10. Espectros de bioluminescência da luciferase da lanterna da cabeça de *Brasilocerus* sp. em diferentes faixas de pH.

Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos das luciferases das lanternas laterais de *Phrixotrix hirtus*: **Ph_lateral (inativa)**: Publicada por Arnoldi *et al*, 2010. **PhLant1_Luc**: obtida em análise transcripcional de Amaral *et al*, 2017. **pC-PhLat**: Subclonada para vetor pColdII nesse projeto; **PxGR**: luciferase das lanternas laterais de *Phrixotrix vivianii*.

Figura 12. Gel de agarose com o padrão de peso molecular de DNA e o resultado da digestão plasmidial do vetor pColdII com o inserto da luciferase da lanterna lateral de *P. hirtus* (pC- PhLat) utilizando a enzima de restrição *Sac* I. Ao lado, uma representação

da construção plasmidial pC-PhLat com a posição aproximada dos sítios de restrição da enzima *Sac* I.

Figura 13. Gel SDS-Page das etapas do processo de expressão e purificação da luciferase de lanternas laterais de *P.hirtus* pC-PhLat. **P)** Padrão de peso molecular BioRad; **1)** Cultura antes da indução com IPTG; **2)** Cultura após 16 h de indução com IPTG; **3)** Pellet; **4)** Extrato bruto; **5)** Primeira passagem pela resina de níquel; **6)** Lavagem; **7)** Eluato 1; **8)** Eluato 2; **9)** Eluato 3; **10)** Eluato 4; **11)** Eluato 1 após diálise. O destaque vermelho indica a posição da luciferase pC-PhLat no gel.

Figura 14. Espectros de bioluminescência da luciferase das lanternas laterais de *P. hirtus* em diferentes faixas de pH.

Figura 15. Gráfico da cinética da reação bioluminescente *in vitro* das luciferases das lanternas laterais de *Phrixotrix hirtus* (Linha azul), e lanternas da cabeça de *Brasilocerus* sp. (Linha verde) e de *Phrixotrix hirtus* (Linha vermelha).

Figura 16. Espectros de bioluminescência da luciferase selvagem das lanternas laterais de *P. hirtus* (pC-PhLat) e do mutante R215T: (azul) pC-PhLat com luciferina (560 nm); (vermelho) pC-PhLat com adenilato de luciferina (563 nm); (verde) mutante R215T com luciferina e ATP (590 nm) e (roxo) mutante R215T com adenilato de luciferina (589 nm).

Figura 17. Multi-alinhamento das sequências primárias das luciferases de fengodídeos exibindo o gap na posição 351 (linha vermelha) onde nas luciferases das lanternas da cabeça de *Phrixotrix* está presente um resíduo de asparagina. Os pontos vermelhos indicam as posições analisadas nesta tese; Os pontos amarelos indicam posições que podem ser investigadas futuramente e os pontos verdes indicam posições com alguma diferença entre as sequências, porém com menor chance de causar efeitos na determinação espectral.

Figura 18. Filogenia molecular das luciferases pelo método da Máxima Verossimilhança usando a ferramenta IQ-Tree 2.1.1. O clado dos fengodídeos está destacado em vermelho.

Figura 19. Imagens da bioluminescência da luciferase de *Amydetes* indicando a formação de luciferina nos poços contendo D-cisteína e *p*-benzoquinona (poços 3). No último quadro (FLUORESCÊNCIA) é apresentada uma imagem de fluorescência demonstrando a presença de luciferina nos poços contendo D-cisteína e *p*-benzoquinona (poços 3) e também nos poços contendo L-cisteína e *p*-benzoquinona (poços 5). Esse experimento demonstra a formação de ambos os enantiômeros de luciferina (D e L) e a enantioselctividade da luciferase pelo enantiômero D-luciferina.

Figura 20. Síntese de luciferina em bactérias expressando a luciferase de *Amydetes* imobilizadas em placa ELISA mediante administração de cisteína e *p*-benzoquinona, e análise da viabilidade das células por bioluminescência após o ensaio. Tratamentos: 1) D-cisteína + *p*-benzoquinona; 2) D-cisteína + H₂O; 3) L-cisteína + *p*-benzoquinona; 4) L-cisteína + H₂O; 5) *p*-benzoquinona + H₂O. Após o experimento foram adicionados 10 µL de D-luciferina 1 mM pH 5.0 em cada poço da placa para analisar a viabilidade celular.

Figura 21. Teste de toxicidade de *p*-benzoquinona em bactérias expressando luciferase de *Amydetes* expostas à diferentes concentrações de *p*-benzoquinona (concentrações finais anotadas na parte de cima da imagem). A primeira coluna representa o controle sem a presença de *p*-benzoquinona. A viabilidade celular foi registrada pela bioluminescência após adição de luciferina 1 mM pH 5.0 nos poços analisados.

Figura 22. Proposição da biossíntese de luciferina como uma rota alternativa de desintoxicação de quinonas dependente de cisteína, a partir das rotas de esclerotização e melanização de coleópteros. Os “X” em vermelho indicam vias deficientes em enzimas que podem levar a toxicidade por quinonas. Tyr: tirosinase; Lac: lacases; DDC: dopa descarboxilase; aaNAT: dopamina N-acetil transferase; DCE dopacromo isomerase. Fonte: (SOUZA *et al.*, 2022).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Luciferases que tiveram os cDNAs clonados e expressos das famílias Phengodidae e Rhagophthalmidae.

Tabela 2. Nomes e sequências dos *primers* usados para amplificar os genes marcadores 16S e 18S rRNA.

Tabela 3. Sequências dos *primers* utilizados na subclonagem do cDNA da luciferase da lanterna lateral de *P. hirtus* para o vetor pColdII.

Tabela 4. *Primers* utilizados nas mutageneses sítio dirigidas das luciferases das lanternas laterais e cefálicas de *Phrixothrix*.

Tabela 5. Propriedades cinéticas e espectrais das luciferases das lanternas da cabeça de *Brasilocerus* sp. e *P. hirtus* e das luciferases das lanternas laterais de *P. hirtus* e *P. vivianii*.

Tabela 6. Picos dos espectros de bioluminescência dos mutantes de luciferases das lanternas laterais (pC-PhLat) e cefálicas (PxRE) de *P. hirtus*.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1. Bioluminescência | 16 |
| 1.2. Sistema bioluminescente de coleópteros | 18 |
| 1.3. Luciferases de besouros | 21 |
| 1.4. Mecanismos e determinantes estruturais dos espectros de bioluminescência | 24 |
| 1.5. Biossíntese da luciferina em coleópteros | 27 |
| 1.6. Aplicações biotecnológicas das luciferases | 32 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 36 |
| 3. OBJETIVOS | 37 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 4.1. Insetos | 38 |
| 4.2. Associação molecular entre Larva e Adulto de <i>Stenophrinxotrix pallens</i> .. | 39 |
| 4.2.1. Extração de luciferase | 39 |
| 4.2.2. Espectros de bioluminescência de <i>Stenophrinxotrix pallens</i> | 39 |
| 4.2.3. Extração de DNA para análises filogenéticas | 39 |
| 4.2.4. Amplificação dos genes marcadores 16S e 18S rRNA | 40 |
| 4.2.5. Filogenia molecular | 40 |
| 4.3. Técnicas de Biologia molecular | 41 |
| 4.3.1. Transformação bacteriana | 41 |
| 4.3.2. Extração de DNA plasmidial | 41 |
| 4.3.3. Eletroforese em gel de agarose | 42 |
| 4.3.4. Sequenciamento de DNA | 42 |
| 4.4. Construção da biblioteca de cDNA de lanternas da cabeça de <i>Brasilocerus</i> sp. | 42 |
| 4.4.1. <i>Screening</i> funcional para clones de luciferase na biblioteca de cDNA | 43 |
| 4.5. Subclonagem do cDNA da luciferase das lanternas laterais de <i>Phrixotrix hirtus</i> | 43 |
| 4.5.1. Análise da subclonagem por digestão plasmidial de pC-PhLat | 45 |
| 4.6. Mutagênese sítio-dirigida | 45 |
| 4.7. Expressão heteróloga e purificação de luciferases recombinantes | 47 |
| 4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page | 48 |
| 4.9. Ensaio luminométrico da Atividade luciferásica | 48 |
| 4.10. Espectros de bioluminescência | 49 |
| 4.11. Determinação dos K_M para ATP e luciferina | 49 |
| 4.12. Estudos sobre a biossíntese de luciferina | 50 |
| 4.12.1. Síntese não enzimática de luciferina | 50 |
| 4.12.2. Cromatografia de camada fina (TLC) para luciferina | 50 |

| | |
|---|-----|
| 4.12.3. Síntese de luciferina em culturas de bactérias | 51 |
| 4.12.4. Ensaio de toxicidade por <i>p</i> -benzoquinona em bactérias <i>E. coli</i> imobilizadas | 51 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 52 |
| 5.1. ASPECTOS GERAIS DA BIOLUMINESCÊNCIA DE FENGODÍDEOS | 53 |
| 5.1.1. Associação larva/adulto <i>Stenophrinxotrix pallens</i> | 53 |
| 5.1.2. Espectros de bioluminescência de diferentes lanternas e fases de vida | 55 |
| 5.1.3. Associação de larvas e adultos utilizando marcadores moleculares .. | 57 |
| 5.1.4. Análises de luciferases em Transcriptomas de <i>Brasilocerus</i> sp., <i>Phrixotrix</i> sp. e <i>Mastinomorphus</i> sp. | 61 |
| 5.1.5. Clonagem, caracterização e comparação de novas luciferases de fengodídeos | 63 |
| 5.1.6. <i>Screening</i> da biblioteca de cDNA da cabeça de <i>Brasilocerus</i> sp. para clones de luciferases | 63 |
| 5.1.7. Expressão e caracterização da luciferase de <i>Brasilocerus</i> sp. | 64 |
| 5.1.8. Luciferase recombinante das lanternas laterais de <i>P. hirtus</i> (pC- PhLat) | 65 |
| 5.1.9. Propriedades cinéticas | 73 |
| 5.1.10. Efeito de mutações nos espectros e propriedades cinéticas na luciferase lateral de <i>P. hirtus</i> | 75 |
| 5.1.11. Mutações no <i>loop</i> 351-360 na luciferase emissora luz vermelha ... | 77 |
| 5.1.12. Aspectos evolutivos das luciferases de fengodídeos | 80 |
| 5.2. ESTUDOS SOBRE A BIOSSÍNTESE DE LUCIFERINA | 84 |
| 5.2.1. Síntese de luciferina a partir de <i>p</i> -benzoquinona e cisteína | 84 |
| 5.2.2. Detecção da síntese de luciferina <i>in vivo</i> em bactérias <i>E. coli</i> transformadas com o gene da luciferase de <i>Amydetes vivianii</i> | 86 |
| 5.2.3. Viabilidade celular na presença de benzoquinona e cisteína | 87 |
| 5.2.4. Participação da hidroquinona, dopamina e lacase na síntese da luciferina | 90 |
| 5.2.5. Possível relação entre a esclerotização/melanização e a síntese de luciferina | 92 |
| 6. CONCLUSÕES | 97 |
| 7. REFERÊNCIAS | 99 |
| 8. ANEXOS. Produção científica | 108 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bioluminescência

A impressionante habilidade de alguns seres vivos de emitir luz tem despertado a curiosidade dos seres humanos no decorrer do tempo. Provavelmente, os primeiros registros mencionando animais luminosos datam de aproximadamente 1500-1000 aC, essas menções estão nos livros chineses de poesia *Shih Ching*. Os vagalumes são lembrados em textos sagrados da Índia e da China, mas não aparecem em livros como a bíblia e o alcorão, talvez pelo clima desértico onde esses últimos foram escritos e a rara presença de espécies luminosas em regiões secas. Mais adiante, por volta de 384-322 aC, Aristóteles foi o primeiro a registrar observações detalhadas a respeito de organismos capazes de emitir luz. Já na era cristã, Caio Plínio Segundo (23-79 dC) escreveu suas observações sobre vermes, águas-vivas, peixes e fungos brilhantes em seu livro *Naturalis Historia* (HARVEY, 1957).

Muitos pensadores cooperaram para o conhecimento na área. Benjamim Franklin (1706-1790) acreditou inicialmente que a luz emitida no oceano fosse um fenômeno elétrico, mas mudou de opinião após perceber que podia filtrar a luz observada com um pano. Paolo Panceri (1833-1877) estudou a anatomia e a histologia de variados tipos de organismos luminosos. Rafael Dubois (1849-1877) criou os termos luciferina e luciferase. Eilhardt Wiedemann (1852-1929) foi o primeiro a nomear a emissão de luz fria como “luminescência”. Harvey (1887-1957) usou pela primeira vez o termo “bioluminescência” (SHIMOMURA, 2006).

Bioluminescência é definida como a emissão de luz fria visível por organismos vivos, trata-se de um tipo específico de quimiluminescência biologicamente funcional catalisada por enzimas. Diferentes grupos de seres vivos como bactérias, anelídeos, celenterados, crustáceos, dinoflagelados, insetos, peixes e outros grupos possuem a

capacidade de emitir luz (HASTING, 1983). Por volta de 800 gêneros bioluminescentes já foram relatados e provavelmente existam mais de 10.000 espécies emissoras de luz na região visível do espectro, essas espécies estão distribuídas em cerca de 13 filos diferentes, com características distintas de bioluminescência, indicando que esses grupos evoluíram seus mecanismos de emissão de luz de maneira independente no decorrer do tempo. A investigação de organismos bioluminescentes ainda desconhecidos é de grande importância, uma vez que a destruição crescente do meio ambiente pode levar ao desaparecimento desses organismos (OBA *et al.*, 2017). O maior número de espécies bioluminescentes ocorre em ambientes marinhos, com organismos distribuídos desde a superfície até as profundezas do oceano (HADDOCK *et al.*, 2010). A bioluminescência pode servir para finalidades de comunicação intraespecífica como a atração sexual ou territorialidade, ou interespecífica, para a defesa de predadores ou atração de presas (HASTINGS; MORION, 1991).

A bioluminescência é gerada por reações de oxidação de substratos orgânicos, genericamente chamados de luciferinas, catalisadas por enzimas genericamente nomeadas como luciferases. Durante essa oxidação por oxigênio molecular, é gerado um intermediário peroxídico altamente instável, que espontaneamente se cliva gerando um produto carbonílico eletronicamente excitado que ao decair ao seu estado fundamental emite um fóton de luz visível (WILSON; HASTINGS, 1998).

Estudos bioquímicos com diversos grupos de organismos bioluminescentes demonstraram que as luciferases e as luciferinas possuem diferentes estruturas químicas e moleculares em cada grupo. Baseado nessa variedade de luciferases e luciferinas, estima-se que devam existir por volta de 30-40 sistemas bioluminescentes bioquimicamente distintos que evoluíram independentemente (HASTINGS, 1983; HADDOCK *et al.*, 2010)

1.2. Sistema bioluminescente de coleópteros

Entre os organismos terrestres, o grupo com mais representantes bioluminescentes são os insetos, sendo a ordem Coleoptera a mais rica, principalmente as famílias Lampyridae, Elateridae, Phengodidae e Rhagophthalmidae. As ordens Diptera e Collembola também possuem espécies bioluminescentes (VIVIANI *et al.*, 2002; 2007; 2020). Estima-se que existam mais de 1.800 espécies bioluminescentes na família Lampyridae divididas em aproximadamente 80 gêneros, sendo que todas exibem a capacidade de emitir luz durante o estágio larval, mas nem todas mantêm essa habilidade após a metamorfose para a fase adulta (VIVIANI, 2001; STANGER-HALL *et al.*, 2007; KUNDRATA *et al.*, 2014). A família Elateridae possui aproximadamente 150 espécies bioluminescente na fase adulta e larvas dentro das subfamílias Agrypininae e Campyloxeninae, mas nessa família ocorrem principalmente espécies não luminescentes (COSTA; VANIN, 2010). Recentemente, uma nova subfamília, *Sinopyrophorinae*, com espécies bioluminescentes apenas em um gênero na região Asiática, foi descrita (KUSY *et al.*, 2021).

A família Phengodidae, encontrada principalmente na região neotropical, possui cerca de 170 espécies descritas sendo 49 delas encontradas no Brasil, provavelmente haja uma grande variedade de espécies dessa família ainda não descobertas (VIVIANI; BECHARA, 1997). Dentro da família Phengodidae as espécies eram divididas em duas subfamílias: 1) Phengodinae, com ocorrência na América e 2) Rhagophthalminae, com ocorrência na Ásia. No entanto, estudos mais recentes sugerem que Rhagophthalmidae seja considerada como uma família independente e grupo irmão mais próximo de Phengodidae, e não mais como uma subfamília dentro de Phengodidae (AMARAL *et al.*, 2016b; WANG *et al.*, 2017). Na família Phengodidae encontram-se as tribos Phengodini e Mastinocerini, a última de ocorrência predominantemente na região

Neotropical (ARNOLDI *et al.*, 2010). Na tribo Mastinocerini estão as espécies conhecidas popularmente como “larvas trenzinhos”, as larvas e fêmeas neotênicas dessa tribo possuem 11 pares de lanternas laterais e também lanternas cefálicas e eventualmente pós-cefálicas. Ainda não se sabe muito sobre a função da bioluminescência dos fengodídeos. Foi sugerido que as lanternas laterais sirvam na defesa para repelir predadores, e as lanternas cefálicas, de brilho mais contínuo, para iluminação durante a caça de presas enquanto o animal se desloca (VIVIANI; BECHARA, 1997).

As “larvas trenzinho” da família Phengodidae apresentam a mais ampla variedade de cores de bioluminescência, desde o verde ao vermelho, tendo como exemplar mais impressionante as espécies do gênero *Phrixothrix*. Estas espécies possuem bioluminescência na cor verde-amarela nas lanternas laterais e na cor vermelha nas lanternas cefálica e pós-cefálica (VIVIANI; BECHARA, 1997; ARNOLDI *et al.*, 2010). Na figura 1 estão apresentados alguns exemplares de fengodídeos brilhando em diferentes cores de bioluminescência.

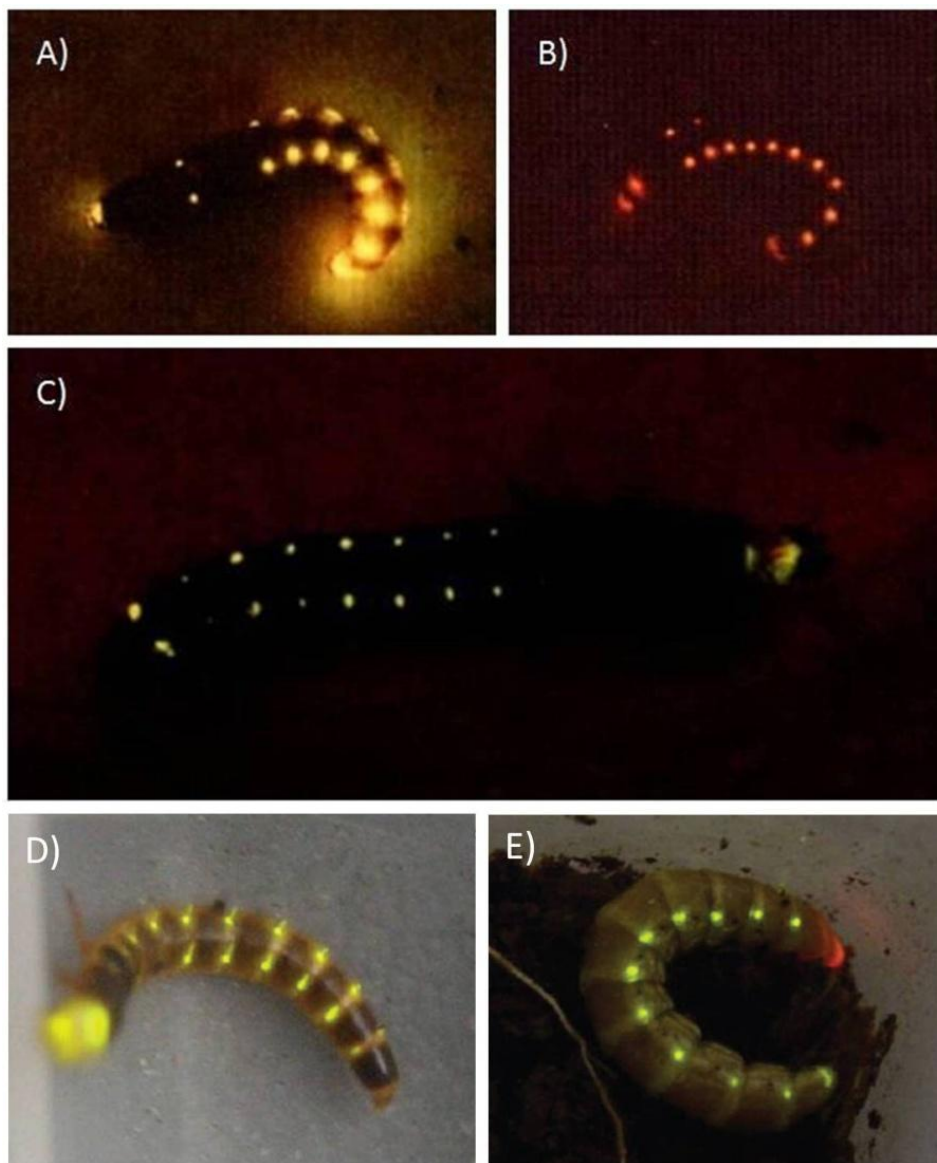


Figura 1. Exemplos de fengodídeos, popularmente conhecidos como “Larvas trenzinhos”: A) *Mastinocerus*; B) *Mastinomorphus* sp2; C) *Brasilocerus impressicollis*. Fonte: (VIVIANI; BECHARA, 1997); D) *Brasilocerus* sp. Fonte: acervo pessoal do Prof. Dr. Vadim Viviani; E) *Phrixotrix hirtus*. Fonte (ARNOLDI *et al.*, 2010).

O mecanismo bioquímico de emissão de luz na ordem dos coleópteros é bem conhecido, sabe-se que a reação de bioluminescência nesse grupo envolve Mg^{2+} e ATP como cofatores. A luciferase atua primeiramente como ligase, adenilando a luciferina à custa de ATP, e em seguida como oxigenase, catalisando a oxidação do adenilato de luciferina por oxigênio molecular, formando assim um intermediário dioxetanônico que

ao se clivar gera dióxido de carbono e oxiluciferina eletronicamente excitada singlete que emite luz visível ao retornar ao seu estado fundamental (VIVIANI, 2002).

Apesar da luciferina de diferentes famílias de coleópteros ser a mesma molécula, o comprimento de onda do espectro de bioluminescência varia do verde (530 nm) ao vermelho (636 nm). Considerando que os substratos envolvidos na reação são os mesmos em todas as famílias de coleópteros, o que modula a cor da luz emitida é o microambiente do sítio ativo da luciferase (VIVIANI; BECHARA, 1995).

1.3 Luciferases de besouros

Na década de 1950, a espécie norte americana *Photinus pyralis*, da família Lampyridae, foi a primeira espécie a ter sua luciferina e luciferase isoladas, isso auxiliou o avanço na elucidação do sistema bioquímico da bioluminescência desses insetos (GREEN; MCELROY, 1956; BITLER; MCELROY, 1957; DE WET *et al.*, 1985). Para realizar esse trabalho pioneiro sobre a bioquímica dos vagalumes, Green e McElroy, juntamente com seu grupo de pesquisa utilizaram por volta de 6.000 indivíduos secos da espécie *P. pyralis* para isolar aproximadamente 30 gramas de lanternas de onde foram extraídos poucos miligramas de luciferases, dando início aos estudos sobre os aspectos funcionais dessa enzima (GREEN; MCELROY, 1956).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular no final da década de 1980, foi possível realizar a clonagem dos cDNAs que codificam as enzimas luciferases, permitindo sua produção heteróloga em bactérias em laboratório e possibilitando assim avançar os estudos sobre essa enzima sem a necessidade de retirar da natureza grandes quantidades de vagalumes. O primeiro relato de síntese *in vitro* de uma luciferase de vagalume ativa, foi feito por De Wet *et al.* (1984), nesse caso os pesquisadores utilizaram os RNAs mensageiros extraídos da espécie *P. pyralis* e realizaram sua

tradução em sistema de células de reticulócitos de coelho, obtendo assim uma proteína com as mesmas características daquelas encontradas nos vagalumes (DE WET *et al.*, 1984). A primeira clonagem do gene da luciferase foi relatada pelo mesmo grupo de pesquisa no ano seguinte a essa síntese *in vitro*. De Wet *et al.* (1985) utilizaram os RNAs mensageiros da mesma espécie anterior para construir uma biblioteca de cDNA em vetores de expressão para *Escherichia coli*, permitindo transformar e induzir essas bactérias a expressar a enzima luciferase (DE WET *et al.*, 1985).

Atualmente, variadas luciferases das quatro principais famílias de vagalumes já foram clonadas e sequenciadas. (De WET *et al.*, 1985; TATSUMI *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; BRANCHINI *et al.*, 2006; AMARAL *et al.*, 2012; 2016; OBA *et al.*, 2008; 2010) . Com essas sequências é possível expressar em laboratório uma grande gama de luciferases com características distintas, além de possibilitar estudos funcionais, evolutivos e estruturais comparativos entre essas enzimas.

As luciferases das diferentes espécies de coleópteros apresentam similaridade em sua estrutura primária, sendo constituídas por cerca de 540-550 resíduos de aminoácidos e apresentando entre 45-99% de identidade (WOOD, 1995; UGAROVA; BROVKO, 2002; VIVIANI, 2002).

As luciferases de coleópteros possuem função oxigenásica, no entanto, não apresentam homologia com enzimas oxigenases clássicas, o que indica que essas enzimas não evoluíram a partir de enzimas oxigenases (REES *et al.*, 1998). Atualmente sabe-se que as luciferases de coleópteros evoluíram a partir dos genes de enzimas AMP-CoA-Ligases que tenham passado por eventos de duplicação gênica durante a história evolutiva (WOOD, 1995; VIVIANI, 2002). Enzimas tipo-luciferases com a capacidade

de emitir fraca luminescência na presença de luciferina e ATP foram descobertas em larvas de besouros não luminescentes e posteriormente clonadas (VIVIANI; BECHARA, 1996; VIVIANI *et al.*, 2009). Estudos sugerem que as luciferases de coleópteros tenham evoluído mais especificamente a partir da subfamília das acil-CoA-sintetases, enzimas responsáveis pela ativação de ácidos graxos, também por um processo de duplicação gênica (OBA *et al.*, 2003; 2005).

As Luciferases de fengodídeos. A família Phengodidae é a que possui menos luciferases já clonadas e investigadas em sua forma ativa (Tabela 1), apenas os gêneros *Phengodes* e *Phrixotrix* tiveram suas enzimas clonadas com sucesso (GRUBER *et al.*, 1996; VIVIANI *et al.*, 1999b; ARNOLDI *et al.*, 2010).

A primeira luciferase clonada dessa família foi a da espécie norte-americana *Phengodes* sp., da tribo Phengodini, que emite luz verde (549 nm) (GRUBER *et al.*, 1996). Pouco tempo depois, Viviani *et al.* (1999b) clonaram as primeiras luciferases da tribo Mastinocerini, uma das lanternas laterais emissora de luz verde (549 nm) de *Phrixotrix vivianii*, e outra emissora de luz vermelha (622 nm) das lanternas cefálicas de *Phrixotrix hirtus*, essas luciferases de lanternas distintas do mesmo gênero compartilham uma identidade de 71% (VIVIANI *et al.*, 1999b). Por volta de uma década após a clonagem das primeiras luciferases de fengodídeos, mais 3 luciferases das lanternas laterais de espécies da tribo Mastinocerini também foram clonadas, mas não conseguiram ser expressas na forma ativa em bactérias *E. coli* (ARNOLDI *et al.*, 2010).

Entretanto ainda existem espécies que emitem diferentes cores de luz, como *Brasilocerus* sp que emite luz verde-amarela pelas lanternas laterais e lanternas da cabeça, *Stenophrixotrix* spp e *Taximastinocerus* spp que emitem luz amarela pelas laterais e laranja pela cabeça, e *Mastinomorphus* que emite luz laranja em ambas as lanternas.

Tabela 1. Luciferases que tiveram os cDNAs clonados e expressos das famílias Phengodidae e Rhagophthalmidae.

| Espécie | Luciferase | λ_{\max} | Referência |
|--|------------------------|------------------|-------------------------------|
| <u>Família Phengodidae</u> | | | |
| Tribo Phengodini | | | |
| <i>Phengodes</i> sp. | Phengodes | 549 nm | GRUBER <i>et al.</i> , 1996. |
| Tribo Mastinocerini | | | |
| <i>Phrixotrix hirtus</i> | PxRE (cabeça) | 622 nm | VIVIANI <i>et al.</i> , 1999. |
| <i>Phrixotrix vivianii</i> | PxGR (lateral) | 549 nm | VIVIANI <i>et al.</i> , 1999. |
| <i>Phrixotrix hirtus</i> | Ph_lateral (inativa) | - | ARNOLDI <i>et al.</i> , 2010. |
| <i>Brasilocerus</i> sp. | Br_lateral (inativa) | - | ARNOLDI <i>et al.</i> , 2010. |
| <i>Taximastinocerus</i> sp. | Taxi_lateral (inativa) | - | ARNOLDI <i>et al.</i> , 2010. |
| <u>Família Rhagophthalmidae</u> | | | |
| <i>Rhagophthalmus ohbai</i> | Rol | 554 nm | OHMIYA <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Menghuoius giganteus</i> | Mgi | 560 nm | LIU <i>et al.</i> 2020. |

Arnoldi *et al.* (2010), baseados em estudos com as luciferases de lanternas laterais da tribo Mastinocerini isoladas por PCR, e sua comparação com a luciferase vermelha das lanternas cefálicas de *Phrixotrix hirtus*, postularam que a luciferase ancestral em Phengodidae emitiria luz verde e que luciferases emissoras de luz vermelha das lanternas da cabeça seriam mais derivadas. Também sugeriram que um processo de duplicação gênica tenha ocorrido com o gene da luciferase ancestral dessa família durante a separação das tribos Mastinocerini e Phengodini, levando a evolução de isozimas das lanternas laterais e da cabeça (ARNOLDI *et al.*, 2010). Entretanto ainda faltam estudos com as lanternas da cabeça de mais espécies para poder confirmar esta hipótese.

1.4. Mecanismos e determinantes estruturais dos espectros de bioluminescência

As pesquisas indicam que a forma química do emissor de luz, a oxiluciferina em estado excitado, pode afetar a cor da bioluminescência. Estudos sugerem que a oxiluciferina excitada possui potencialmente 6 formas, incluindo tautômeros e espécies

aniônicas. Entre os mecanismos citados para a determinação da cor da luz emitida estão o efeito da polarização e de solvente (DELUCA, 1969), interações eletrostáticas e interações ácido base de resíduos do sítio ativo com a oxiluciferina excitada (WHITE *et al.*, 1971; WHITE; BRANCHINI, 1975), e a conformação do sítio ativo afetando a rigidez do microambiente e a rotação do anel tiazínico da oxiluciferina excitada (McCAPRA *et al.*, 1994).

Mutações sítio-dirigidas em luciferases de lampirídeos (pH-sensitivas) afetam fortemente os espectros de bioluminescência, deslocando-os em geral para a região do vermelho (KAJIYAMA e NAKANO, 1991; DEVINE *et al.*, 1993; TAFRESHI *et al.*, 2007, 2008; VIVIANI *et al.*, 2005). Em geral, nas luciferases de besouros emissoras de luz verde-amarela, muitas mutações causam mudanças espectrais para o vermelho, mas apenas algumas são efetivas em deslocar para a região do azul (VIVIANI *et al.*, 2008; CARRASCO-LÓPEZ *et al.*, 2021). Porém, nas luciferases de elaterídeos e fengodídeos (pH-insensitivas) são poucas as mutações capazes de alterar significativamente os espectros de bioluminescência (VIVIANI *et al.*, 2001, 2007, 2008).

Trabalhos que investigaram o papel das posições E311 e R337, nos determinantes espectrais de luciferases de vagalumes, demonstraram a importância desses resíduos para manter uma ponte salina que estabiliza a conformação mais fechada e hidrofóbica do sítio ativo, favorável a emissão de luz verde, em luciferases de vagalumes. Mutações nessas posições produziram mutantes com espectros no vermelho (VIVIANI *et al.*, 2016; 2018).

Estudos com luciferases pH-sensitivas de vagalumes identificaram que os resíduos E311, R337, H310 e E354 constituem o sensor de pH e sítio de ligações de metais pesados. De acordo com esses trabalhos, duas pontes salinas foram identificadas, uma mais externa formada pelos resíduos H310 e E354 e outra mais interna formada

pelos resíduos E311 e R337. Em pH ácido ou na presença de metais, os prótons e metais pesados presentes se ligam nessa região, alterando a conformação do sítio ativo e modulando a emissão de luz para o vermelho (VIVIANI *et al.*, 2016; 2018).

As luciferases emissoras de luz verde e vermelha de *Phrixotrix* spp. O alinhamento das luciferases de *Phrixotrix* com outras luciferases de coleópteros revelou a presença de um resíduo adicional de arginina na posição 353 da luciferase emissora de luz vermelha. A deleção desse resíduo não teve efeito nos espectros de bioluminescência da luciferase PxRE (VIVIANI *et al.*, 2007). No entanto, a inserção de uma arginina na posição 353 da luciferase emissora de luz verde do lampirídeo *Lampyrus turkestanicus* mudou o espectro de bioluminescência para o vermelho (TAFRESHI *et al.*, 2007).

Mutações realizadas nas luciferases de *Phrixotrix* (PxGR e PxRE) em trabalhos anteriores trouxeram informações importantes a respeito da determinação espectral das luciferases de besouros. A substituição R215S na luciferase emissora de luz verde de PxGR causou um deslocamento para o vermelho (~30 nm) e perda considerável de atividade bioluminescente, no entanto, a mesma mutação na luciferase emissora de luz vermelha (PxRE) teve pouco efeito no espectro (~8 nm), indicando que o resíduo pode ser importante para emissão de luz verde, mas não para a emissão de luz vermelha (VIVIANI *et al.*, 2000). A mutação T226N na luciferase PxGR causou um deslocamento de 28 nm para a região do vermelho (VIVIANI *et al.*, 2001). A dupla mutação R215S e T226N em PxGR resultou em um desvio para o vermelho, porém sem o efeito aditivo esperado (VIVIANI *et al.*, 2001, 2007).

Das mutações realizadas na luciferase emissora de luz vermelha (PxRE), poucas tiveram efeitos consideráveis na bioluminescência: A mutação T226N causou um deslocamento hipsocrômico de ~10 nm (VIVIANI *et al.*, 2001); A mutação C311T

deslocou o espectro em ~17 nm (VIVIANI *et al.*, 2013). Entre estas, destaca-se a substituição Leu334 por arginina, que ocorre na maioria das luciferases verde-amarelas, e que resultou em um deslocamento de ~11 nm para a região do azul e aboliu o efeito do agente resgatante guanidina, indicando que a presença desta arginina é importante para emissão de um espectro mais deslocado para o azul (VIVIANI *et al.*, 2016).

A estrutura tridimensional da luciferase emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus* foi resolvida por cristalografia, esse estudo revelou que essa luciferase é a única, até o momento, que possui uma estrutura quaternária octamérica. Os resultados também indicaram que a luciferase emissora de luz vermelha tem uma abertura maior entre os domínios N-terminal e C-terminal quando comparada com outras luciferases (CARRASCO-LÓPES *et al.*, 2018). Os autores sugerem que a emissão de luz vermelha é intrinsecamente relacionada com a dobra estrutural, o empacotamento específico e o microambiente do sítio ativo da enzima (CARRASCO-LÓPES *et al.*, 2018; VIVIANI *et al.*, 2007, 2016)

Estudos mais recentes com amino-análogos volumosos de luciferina e modelagem mostraram que a luciferase vermelha de *Phrixotrix* tem uma cavidade maior no subsítio de ligação do grupo fenol da luciferina em relação a outras luciferases emissoras de luz verde-amarela, o que explicaria a emissão de luz de menor energia considerando a maior polarização do microambiente em torno do grupo fenolato da oxiluciferina no estado excitado (BEVILAQUA *et al.*, 2020).

1.5. Biossíntese da luciferina em coleópteros

Mesmo com um amplo conhecimento construído sobre a bioquímica e fisiologia da bioluminescência em vagalumes, ainda permanecem muitas questões sobre como a

bioluminescência é regulada a nível molecular nas lanternas e como a luciferina é biossintetizada.

A composição química e as propriedades da luciferina de vagalumes tem sido objeto de pesquisa desde meados de 1950 (GREEN; McELROY, 1956; BITLER; McELROY, 1957), a estrutura química e a síntese em laboratório foi relatada por WHITE *et al.* em 1961, sendo a reação de 2-ciano-6-hidroxibenzotiazol com D-cisteína a etapa final dessa síntese (WHITE, *et al.*, 1961, 1963). Pesquisas sugerem, desde a década de 1970, que cisteína e benzoquinonas são os precursores metabólicos prováveis da luciferina nos vagalumes (McCAPRA; RAVAZI, 1975; COLEPICOLO *et al.*, 1988). Mais recentemente, Kanie *et al.* (2016) mostraram que a luciferina pode ser espontaneamente formada a partir de cisteína e *p*-benzoquinonas em meio tamponado neutro sem a presença de enzimas ou cofatores, essa simplicidade do processo de síntese pode trazer pistas interessantes sobre a origem natural e evolutiva desse substrato nos vagalumes.

Embora os possíveis precursores da luciferina sejam conhecidos, ainda não foi elucidada a via biossintética completa dessa molécula e as enzimas envolvidas nesse processo.

Niwa *et al.* (2006) propôs que L-luciferina pode ser enzimaticamente convertida em D-luciferina na presença de ATP, Mg^{2+} e CoA e que a luciferase pode ser responsável por essa estereoconversão juntamente com uma enzima esterase, desse modo a D-luciferina seria biossintetizada a partir da L-cisteína, considerando que este substrato é mais abundante nas larvas, e essa via metabólica tem como intermediário final uma L-luciferina (NIWA *et al.*, 2006). Pesquisadores da Universidade de Nagoya demonstraram que a biossíntese da luciferina nas lanternas do adulto da espécie *Luciola*

lateralis, ocorre a partir de L-cisteína com *p*-benzoquinona, ou 1,4-hidroquinona, acompanhada da descarboxilação da L-cisteína (OBA *et al.*, 2013).

Baseados em modelos teóricos para a biossíntese de D-luciferina em vagalumes, pesquisadores do Japão desenvolveram um sistema bioquímico, utilizando a combinação de enzimas, para a produção do enantiômero específico para a reação química da bioluminescência (MAEDA *et al.*, 2017). Os autores do trabalho utilizaram a combinação das enzimas luciferase de vagalume e tioesterase de bactéria e relataram um aumento na eficiência de emissão de luz. O substrato luciferina se racemiza facilmente em condições fisiológicas, ou seja, há uma tendência em se formar ambos os enantiômeros da luciferina, tanto D- como L-, além disso, nos organismos a forma não luminescente (L-luciferina) seria um precursor para a forma luminescente (D-luciferina), já que seus precursores prováveis da via biossintética da luciferina são quinonas e o aminoácido L-cisteína, que predomina nos organismos. Desse modo, é de interesse para as aplicações biotecnológicas baseadas no sistema luciferase-luciferina de coleópteros uma forma de produzir apenas D-luciferina para a reação bioluminescente (MAEDA *et al.*, 2017).

Uma enzima envolvida na regeneração da luciferina a partir da oxiluciferina, chamada LRE (*Luciferin-Regenerating Enzyme*), foi clonada a partir da lanterna de *P. pyralis* pelos pesquisadores Keiko Gomi e Naoki Kajiyama do Japão (2001). O cDNA obtido foi expressado com sucesso em bactérias *E. coli*. Segundo esses pesquisadores a LRE atua na conversão do produto oxiluciferina em 2-cyano-6-hidroxibenzothiazol, que na presença de D-cisteína é capaz de produzir D-luciferina de modo não enzimático (GOMI; KAJIYAMA, 2001). Entretanto, acredita-se que esta enzima possa ter outras funções biológicas em insetos ou tenha evoluído recentemente de modo a desenvolver um papel específico na bioluminescência (DAY *et al.*, 2004).

Fallon *et al.* (2016) identificaram na lanterna do vagalume *P. pyralis* um composto similar a luciferina contendo um grupo sulfona, denominada sulfoluciferina que é 4 vezes mais abundante do que a luciferina nas lanternas desse organismo. Nesse trabalho, os pesquisadores identificaram e clonaram o gene responsável por codificar a enzima *Luciferin Sulfotransferase*, estudos funcionais com essa enzima demonstraram que ela atua na transferência do grupo sulfona para a molécula de luciferina na presença de um doador. A forma sulfoluciferina pode servir como modo de estocagem de luciferina nos vagalumes, uma vez que essa forma não fica disponível para a reação bioluminescente (FALLON *et al.*, 2016).

Strause e colaboradores (1979), estudando as mudanças bioquímicas e morfológicas do desenvolvimento dos órgãos luminosos em diferentes estágios do ciclo de vida da espécie *Photuris pennsylvanica*, observaram que a taxa de síntese de luciferina não é a mesma em todos os estágios da metamorfose do vagalume (STRAUSE; DELUCA; CASE, 1979). Estudos mais recentes sobre a biossíntese de luciferina utilizando 2-(S)-cistenilhidroquinona (Cys-HQ) marcado com deutério, indicam que a luciferina de vagalumes é biossintetizada no organismo vivo com a incorporação dessa molécula, a comparação da taxa de incorporação de Cys-HQ em diferentes estágios do ciclo de vida, sugere que a biossíntese de luciferina ocorre predominantemente no estágio de pupa do desenvolvimento desses insetos (KANIE *et al.*, 2018). Essas informações podem ser importantes para orientar trabalhos que comparem os padrões de transcrição em diferentes estágios da mesma espécie na busca dos possíveis produtos gênicos envolvidos na biossíntese de luciferina.

Análises de transcriptomas vêm sendo realizadas para ampliar o conhecimento a respeito da fisiologia das lanternas e na tentativa de elucidar a via metabólica de biossíntese de luciferina. Esses estudos têm apontado potenciais produtos gênicos a

serem investigados (VIVIANI *et al.*, 2013; VONGSANGNAK *et al.*, 2016; AMARAL *et al.*, 2017a; 2017b). Análises realizadas pelo grupo de Viviani (2013) com lanternas do vagalume *Macrolampis* sp identificaram a abundância de alguns produtos gênicos possivelmente envolvidos com a biossíntese de luciferina, entre estes estavam a Cistationina- β -liase que catalisa a condensação de homocisteína e serina para formar cistationina, a ferritina que tem homologia com enzimas envolvidas com a biossíntese da porção tiazólica da tiamina pirofosfato, a panteteinase envolvida com metabolismo de CoA, a S-adenosilmetioninasintetase, AMP-ligasas, e citocromo P450 envolvido com hidroxilação de compostos aromáticos, entre outros. (VIVIANI *et al.*, 2013). Vongsangnak *et al.* (2016) sugeriram alguns genes possivelmente envolvidos com o metabolismo da luciferina, sendo eles: β -glucosidase, fenoloxidase, luciferase, thioesterase e a enzima LRE. Nesse artigo eles teorizam uma via metabólica para a biossíntese da luciferina baseada nos resultados da análise, porém, os autores não expressaram nem realizaram testes funcionais com os genes propostos (VONGSANGNAK *et al.*, 2016).

Um estudo publicado na revista *Scientific Reports* em 2020 utilizou o conhecimento construído até o momento e dados de diferentes níveis, como genômica comparativa de besouros luminosos e não luminosos, dados transcriptômicos e de proteômica de órgãos luminosos de vagalumes adultos, verificação funcional de genes e edição por CRISPR-Cas9, a compilação das informações e dos dados oferecem *insights* a respeito da visão geral do metabolismo da luciferina nos vagalumes. Nesse trabalho os autores sugerem mais um novo possível precursor para a síntese de luciferina, o ácido homogentísico que possui semelhança estrutural com 1-4hidroquinona/*p*-benzoquinona, essa molécula é um intermediário do metabolismo de tirosina, aminoácido encontrado em abundância nos órgãos luminosos (ZHANG *et al.*, 2020).

Muito provavelmente as etapas do processo de biossíntese da luciferina sejam realizadas por várias enzimas. Outras enzimas e proteínas também podem desempenhar papéis auxiliares na bioluminescência. Foi sugerido que o controle do *flash* dos vagalumes possa ser mediado pelo óxido nítrico, produzido pela nitróxido sintetase, enzima abundante nos fotócitos de vagalumes lampirídeos adultos (AMARAL *et al.*, 2017a). Também foi proposto que o nitróxido regula a emissão de luz através da inibição da cadeia respiratória a nível de citocromo oxidase, disponibilizando assim o oxigênio para a reação bioluminescente. (TRIMMER *et al.*, 2001). As lanternas de vagalumes também são ricas em enzimas antioxidantes, estas devem desempenhar um papel importante no controle da disponibilidade de oxigênio e suas espécies ativas (BECHARA, 1988; AMARAL *et al.*, 2017a).

1.6. Aplicações biotecnológicas das luciferases

O sistema luciferina-luciferase de vagalumes pode ser utilizado em variadas aplicações tecnológicas como, por exemplo, reagentes bioanalíticos para detecção e quantificação de ATP. O ATP é molécula universal que conserva energia em sistemas biológicos, sendo utilizada em variados processos como contração muscular, transporte ativo através das membranas e fosforilação de substratos, também está associada aos mecanismos extracelulares de sinalização purinérgica. Desde que essa molécula está presente no metabolismo de todos os organismos vivos conhecidos, é possível através do uso do sistema luciferina-luciferase quantificar a contaminação microbiológica em alimentos, em fluídos corporais e na água, também é possível a utilização desse sistema em ensaios de atividades enzimáticas que envolvam o consumo ou formação de ATP, além da avaliação da viabilidade celular. Kits para estas finalidades estão disponíveis comercialmente (VIVIANI, 2007).

As luciferases de vagalumes em sua forma selvagem permanecem nos peroxissomos devido ao tripeptídeo sinal SKL, porém com alterações em sua sequência é possível o endereçamento para o núcleo, para a matriz mitocondrial ou para a membrana plasmática, possibilitando assim a otimização do monitoramento das concentrações de ATP em variados compartimentos celulares (MORCIANO *et al.*, 2017).

Graças à clonagem das luciferases de besouros foi possível sua utilização como gene repórter luminescente para estudos da expressão gênica em células e tecidos vivos, sendo considerado um dos mais sensíveis (NAYLOR, 1999). Pode-se acompanhar e analisar a atividade transcricional de promotores em diferentes linhagens celulares, também é possível acompanhar o desenvolvimento de câncer em animais e o curso de infecções (NAYLOR, 1999; VIVIANI; OHMIYA, 2006; MEZZANOTTE, L. *et al.*, 2017). O uso de genes de luciferases para esses tipos de análises tem a vantagem de não ser um método invasivo, além disso, a luciferina utilizada como substrato penetra com facilidade nas células e tecidos. Quando comparado aos métodos que utilizam proteínas fluorescentes, o sistema bioluminescente se mostra melhor pelo fato de não necessitar da irradiação de luz UV que pode causar a autofluorescência endógena das células e também um efeito fototóxico no material analisado, de modo que o sistema bioluminescente permite análises por um período mais longo de tempo com menor ruído de *background* (NAKAJIMA *et al.*, 2010; OHMIYA, 2014; LI *et al.* 2021).

Foram desenvolvidos também sistemas repórter bioluminescentes duais que empregam duas luciferases que emitem duas cores de luz (YASUNAGA; NAKAJIMA; OHMIYA, 2014). Nakajima *et al.* (2005) desenvolveram um sistema de ensaio repórter com três luciferases, emissoras de luz verde, laranja e vermelha, que utilizam a mesma luciferina, com esse sistema é possível mensurar e quantificar a atividade luminosa das

diferentes luciferases utilizando filtros ópticos, permitindo assim monitorar de forma rápida múltiplas expressões de genes.

Biossensores bioluminescentes são divididos em dois tipos: enzimáticos e celulares. Nos enzimáticos, as luciferases são geralmente imobilizadas numa matriz e os analitos são detectados de modo direto ou indireto. Nos biossensores bioluminescentes celulares, células vivas são transformadas ou transfectadas com vetores de expressão contendo o gene da luciferase. O gene da luciferase pode ou não estar sob o controle de um promotor induzível por sinais específicos, nesse caso o biossensor bioluminescente é denominado como *light on*, pois o sinal luminoso ocorre quando há indução. No caso dos biossensores celulares *light off*, ao contrário, a luz das células bioluminescentes é inibida quando na presença de agentes que alterem o metabolismo celular (GABRIEL *et al.* 2014).

Algumas luciferases como a do vagalume *Macrolampis* sp2, por exemplo, apresentam sensibilidade ao pH, que lhe confere mudança de espectro em diferentes faixas de pH, temperatura e na presença de metais, assim esta enzima possui potencial para ser utilizada em biossensores ratiométricos destes fatores, além da possibilidade de sua aplicação no monitoramento de alterações no pH. (VIVIANI, 2008; GABRIEL *et al.* 2014; PELENTIR *et al.*, 2019). Gabriel *et al.* (2019), através de engenharia genética, modificaram a luciferase obtida da espécie *Macrolampis* sp2 inserindo endereçamentos para o citosol e para o núcleo com o objetivo de monitorar alterações de pH nesses compartimentos celulares. Esse estudo concluiu que essas luciferases podem servir como ferramenta para mensurar alterações de pH intracelular em tempo real durante processos de apoptose e divisão celular através da modulação da cor (GABRIEL *et al.*, 2019). A luciferase do vagalume *Amydetes vivianii* apresenta potencial para ser utilizada em sensores onde apenas um gene pode servir para indicar concentrações intracelulares

de ATP e concentrações de metais simultaneamente, por exemplo (PELENTIR *et al.*, 2019; VIVIANI *et al.*, 2022).

Além da clonagem de luciferases selvagens de vagalumes, é possível o melhoramento dessas enzimas através de engenharia genética, desenvolvendo formas mais estáveis, com maior atividade luminosa ou com diferentes espectros de bioluminescência (VIVIANI, 2007). A luciferase da espécie *P. hirtus*, que naturalmente catalisa a reação de emissão de luz vermelha, apresenta um grande potencial para aplicações de bioimageamento e ensaios multicoloridos, no entanto sua forma nativa apresenta baixa atividade e pouca estabilidade nos testes funcionais. Li *et al.* através de mutagêneses sítio dirigidas construíram plasmídeos contendo o gene mutado de luciferase capaz de emitir luz vermelha e com maior atividade e estabilidade quando comparadas a luciferase selvagem. Com esses plasmídeos os pesquisadores puderam transfectar culturas de células de mamíferos e induzi-las a expressar a enzima luciferase. A luz na faixa do vermelho é mais vantajosa nas aplicações de bioimageamento pelo fato de penetrar os tecidos ricos em hemoglobina e mioglobina com maior efetividade (LI *et al.*, 2010). Mutações na luciferase de *Phrixotrix* combinadas com a utilização de 6' amino-análogos de luciferina demonstraram um deslocamento do espectro de bioluminescência para o vermelho distante (>640 nm), além de um aumento na atividade da enzima, indicando um grande potencial desse sistema para uso em bioimageamento de tecidos ricos em hemoglobina e melanina (BEVILAQUA *et al.*, 2019; VIVIANI *et al.*, 2021).

2. JUSTIFICATIVA

As luciferases dos insetos da família Phengodidae apresentam ampla variedade espectral, porém poucas dessas luciferases têm suas sequências primárias conhecidas. Antes deste trabalho, apenas 3 luciferases funcionais tinham sido clonadas e caracterizadas, uma do gênero norte-americano *Phengodes* (GRUBER *et al.*, 1996) e duas de larvas brasileiras, as das lanternas laterais emissoras de luz verde de *Phrixotrix vivianii* e das lanternas cefálicas de *Phixotrix hirtus* emissoras de luz vermelha (VIVIANI; BECHARA; OHMIYA, 1999). As luciferases das lanternas laterais de outras 2 espécies da tribo Mastinocerini também foram clonadas pela técnica do PCR, porém essas luciferases eram inativas quando expressas em bactérias (ARNOLDI *et al.*, 2010). O conhecimento de novas luciferases dessa família é relevante para os estudos sobre estrutura e função, para tentar entender a história evolutiva dessas enzimas e para a prospecção de novas aplicações biotecnológicas. Neste trabalho, apresentamos 2 novas luciferases funcionais da família Phengodidae, além das informações sobre as sequências primárias de novas luciferases encontradas em análises transcricionais.

Outro mistério explorado neste trabalho foi a origem e a biossíntese do substrato luciferina nos vagalumes. Entender a origem do substrato luciferina também pode contribuir para o entendimento da história evolutiva da bioluminescência dos vagalumes. Além disto, desvendar a via metabólica da biossíntese de luciferina, teria um grande impacto no avanço das pesquisas e nas aplicações tecnológicas que utilizam o sistema luciferase-luciferina, uma vez que isso tornaria possível manter a bioluminescência de células com a enzima luciferase sem a necessidade de repor periodicamente o substrato.

3. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de estudos com mais luciferases da família Phengodidae, para melhor compreender a sua evolução e relação entre estrutura e função, esse trabalho teve como objetivos clonar e caracterizar o cDNA para as luciferases de novas espécies dos gêneros da família Phengodidae que emitem diferentes cores de bioluminescência, compará-las com as luciferases clonadas de *Phrixotrix* sp., e realizar estudos de mutagênese sítio-dirigida. Também efetuamos estudos sobre a biossíntese de luciferina para melhor compreendermos a evolução da bioluminescência em coleópteros. Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Estabelecer uma associação molecular e espectral entre larvas e adultos de fengodídeos coletados no campus da UFSCar – Sorocaba.
- Buscar nas análises transcriptômicas das cabeças de *Brasilocerus* sp. e de *Phrixotrix hirtus* novas sequências referentes às luciferases dessas espécies.
- Construir bibliotecas de cDNA para lanternas da cabeça e de lanternas laterais de fengodídeos para isolamento de clones funcionais de novas luciferases emissoras de luz verde-amarela;
- Comparar as estruturas primárias e propriedades das luciferases clonadas com outras luciferases de besouros emissoras de outras cores de luz.
- Construir e caracterizar mutantes das luciferases das lanternas laterais e da cabeça de *P. hirtus* para melhor entender a relação entre estrutura e espectros de bioluminescência
- Realizar estudos da síntese de luciferina a partir de *p*-benzoquinona e cisteína em reações *in vitro* e em bactérias *E. coli* transformadas com o gene da luciferase de *Amydetes vivianii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Insetos

Os insetos coletados durante a pesquisa (fengodídeos na fase larval e adultos) foram fixados, etiquetados com sua localização e data de coleta e inseridos na coleção do Prof. Dr. Vadim Viviani, ou então congelados a -80C ou fixados em etanol 70%. Para a coleta de adultos machos de fengodídeos, utilizamos as técnicas de armadilha de luz e pano (Figura 2) e também coleta ativa com o uso de puçá/manualmente. A armadilha de luz e pano consiste em iluminar o pano com uma fonte de luz (Lampião ou luz UV) para atrair os fengodídeos adultos e então capturá-los com as mãos. As larvas e fêmeas foram coletadas manualmente no folhíço do solo. As coletas ocorreram, em sua maioria, em noites quentes e úmidas entre os meses de setembro a março. Os insetos foram identificados pelo Prof. Dr. Vadim Viviani e a espécie *Stenophrixotrix pallens*, coletada no campus da UFSCar Sorocaba foi identificada pelo taxonomista Dr. André Roza da UFRJ.



Figura 2. Coleta de coleópteros bioluminescentes. Técnica da armadilha de luz com pano utilizada para fengodídeos do sexo masculino na fase adulta.

4.2. Associação molecular entre Larva e Adulto de *Stenophrinxotrix pallens*

4.2.1. Extração de luciferase

Para a extração da luciferase das lanternas de cabeça e laterais, para fins de ensaios de atividade e obtenção dos espectros de bioluminescência *in vitro*, os tecidos foram macerados com tampão de extração (50 mM Tris-HCl, pH=8,0, 10% glicerol, 1% Triton e 1 mM EDTA) e 5 µL de coquetel inibidor de protease (Roche). Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e utilizado nas reações *in vitro*.

4.2.2. Espectros de bioluminescência de *Stenophrinxotrix pallens*

Os espectros de bioluminescência foram obtidos *in vivo* e *in vitro*. Para os espectros *in vivo*, os espécimes vivos foram imobilizados em uma lâmina de microscópio de modo que a lanterna estivesse voltada na direção do sensor do equipamento. Para os espectros de bioluminescência *in vitro*, os ensaios foram realizados com 5 µL de extrato bruto contendo a luciferase, 5 µL de luciferina 10 mM, 5 µL de MgATP e 85 µL de tampão Tris 0.1 M pH=8.0. Os picos de bioluminescência foram obtidos usando um espectroluminômetro ATTO modelo AB-18505 (Tóquio, Japão).

4.2.3. Extração de DNA para análises filogenéticas

Para a extração do material genético (DNA) para análises filogenéticas, uma porção do corpo dos espécimes foi isolada e transferida para um microtubo de 1,5 mL, contendo 50 µL de tampão de extração TENS autoclavado e gelado, onde foi macerado com pilão, mantendo o tubo no gelo. Após a maceração, foram adicionados 700 µL de tampão de extração e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL). Em seguida, a reação foi

mantida por três horas a 55° C para remoção das nucleases e demais enzimas presentes. Após o período de incubação, a precipitação de proteínas e outros compostos indesejados foi realizada pela adição de 280 µL de NaCl 5M autoclavado e centrifugação por 5 minutos a 15.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril onde foram adicionados 600 µL de isopropanol e realizada nova centrifugação por 5 minutos a 15.000 g. O material precipitado foi lavado duas vezes com 600 µL de etanol 70% gelado e centrifugado por 3 minutos a 15.000 g e o DNA foi eluído em tampão TE pH 8,0.

4.2.4. Amplificação dos genes marcadores 16S e 18S rRNA

Para associar larva e adulto, foram utilizados dois genes marcadores: o mitocondrial 16S rRNA e o nuclear 18S rRNA. A reação de amplificação foi realizada misturando-se os seguintes reagentes: 12,5 µL PCR Master Mix (Promega, EUA); 1 µL de cada *primer* (Tabela 2); 2 µL de MgCl₂; 1 µL de DNA e 7,5 µL de H₂O sem nuclease. A termociclagem foi realizada nas seguintes temperaturas: 5 minutos a 95 °C (Desnaturação); 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto (pareamento do *primer*) e 72°C por 2 minutos (extensão); e um estágio final de extensão por 10 minutos a 72°C. O produto da reação foi confirmado em gel de agarose, purificado e enviado para sequenciamento.

Tabela 2. Nomes e seqüências dos *primers* usados para amplificar os genes marcadores 16S e 18S rRNA.

| <i>Primer</i> | <i>Seqüência</i> |
|------------------|---------------------------------------|
| Hm_16S-1F | ATA ATT TAA RRT YTR AYC TGC TCA ATG A |
| Hm_16S-2R | ARA AAT WAC GCT GTT ATC CCY AAG GTA A |
| Ela_18S_F | GGG AGG TAG TGA CGA AAA ATA A |
| Ela_18S_R | CAC CGA ATC AAG AAA GAG CTC T |

4.2.5. Filogenia molecular

As sequências obtidas da larva e do adulto foram alinhadas usando a ferramenta Clustaw para comparação. A filogenia molecular baseada nos genes marcadores foi realizada no software IQTree 2.1.1 pelo método da Máxima Verossimilhança. A sequência parcial foi alinhada com sequências de espécies relacionadas depositadas no banco de dados do NCBI. A árvore filogenética resultante foi visualizada e editada usando a ferramenta FigTree v1.4.3.

4.3. Técnicas de Biologia molecular

4.3.1. Transformação bacteriana

Para a transformação de bactérias com plasmídeos contendo genes de luciferases, amostras de 50 μL de células XL Blue1 de *E. coli* competentes foram misturadas com 1-3 μL do DNA plasmidial contendo o gene de interesse em um microtubo no gelo. Essa mistura foi então incubada por 30 minutos no gelo e submetida a um choque térmico de 45 segundos a 42° C em banho-maria, seguido de mais 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 posteriormente plaqueada em placa Petri com meio LB/Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.3.2. Extração de DNA plasmidial

Para a extração de DNA plasmidial das bactérias transformadas foi utilizado 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 em 30 μL de *elution buffer*, sendo conservado a -20°C até sua utilização em transformações bacterianas.

4.3.3. Eletroforese em gel de agarose

A análise de DNA plasmidial e ampliações de DNA foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 1% (peso/volume) em tampão TAE 1X (Tris-acetato 20 mM, EDTA 0,5 mM). Para isso foi feita uma mistura contendo 2 μl da reação de PCR e 1 μL do corante azul de bromofenol, as amostras foram aplicadas no gel contendo Nancy-520 (1:100.000), e o gel submetido à voltagem de 100 volts por 40 minutos. Finalmente a fluorescência do Nancy-520, complexado aos fragmentos de DNA no gel, foi revelada em transluminador UV usando o equipamento Gel Logic 100 Imaging System (Kodak, EUA). Como padrão do peso molecular, foi utilizado o marcador KASVI 1 kb DNA Ladder.

4.3.4. Sequenciamento de DNA

As amostras de DNA plasmidial e de PCR purificadas foram sequenciadas no departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus Jaboticabal de acordo com o método de terminação dideoxi de Sanger. Os resultados foram analisados com a ferramenta de bioinformática BioEdit (HALL, 1999).

4.4. Construção da biblioteca de cDNA de lanternas da cabeça de *Brasilocerus*

A biblioteca de cDNA da cabeça de *Brasilocerus* sp. foi construída a partir dos RNAs mensageiros isolados. Para isso, o RNA total das cabeças de larvas de *Brasilocerus* sp. foi extraído utilizando Trizol (Invitrogen, EUA). Desse RNA total, os RNAs mensageiros foram isolados usando uma resina Oligo-dT (Takara, Japão). A biblioteca de cDNA foi então construída utilizando o kit “SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (Invitrogen, EUA), seguindo o protocolo do fornecedor. A síntese das primeiras e das segundas fitas de cDNA foi feita usando o mesmo kit Superscript Gateway, adaptadores SalI foram ligados ao cDNA e esse *pool* de cDNA foi então ligado ao vetor pSPORT-1. A ligação foi utilizada para transformar células de *E. coli* XL-Blue ultra competentes para a realização de *screenings* funcionais afim de rastrear clones positivos para luciferases.

4.4.1. Screening funcional para clones de luciferase nas bibliotecas de cDNA

Para identificar a presença de colônias positivas para luciferases em placas contendo meio LB-Ágar transformadas com as bibliotecas de cDNA, as colônias de foram transferidas, utilizando uma membrana de nitrocelulose, para outra placa contendo ampicilina e IPTG 1 mM. A indução foi realizada por um período de 24 horas a 22°C e após esse período as placas foram borrifadas com luciferina 2.5 mM pH 5.0 e colocadas em câmera CCD pelo tempo de 10 minutos para identificar colônias bioluminescentes.

4.5. Subclonagem do cDNA da luciferase das lanternas laterais de *Phrixotrix hirtus*

O cDNA para a luciferase das lanternas laterais de *P. hirtus* foi subclonado do vetor pProExHTa (Invitrogen) para o vetor de expressão pColdII (Takara, Japão). A

subclonagem foi realizada por meio da amplificação do cDNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para este procedimento foram utilizados dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares que contém os sítios de ligação para as enzimas de restrição KpnI e HindIII (Tabela 3). Para este fim foram utilizados 25 µL de PCR Master Mix (Promega, EUA), 1 µL do DNA plasmidial, 1 µL de cada *primer* na concentração 10 mM, 2 µL de Mg²⁺ e 21 µL de água ultrapura autoclavada (volume total de 50 µL). Essa reação foi submetida a um passo de 95° C por 5 minutos; 30 ciclos de 95° C por 30 segundos, 55° C por 1 minuto, 72° C por 2 minutos e um período de extensão final a 72° C por 10 minutos. Após o término da reação de PCR, realizamos uma eletroforese em gel de agarose 1% com a amostra para confirmação da amplificação.

Tabela 3. Sequências dos *primers* utilizados na subclonagem do cDNA da luciferase da lanterna lateral de *P. hirtus* para o vetor pColdII.

| Primer | Sequência |
|-----------------------|---|
| SCLucPhengos-F | GTC GCA CTA GGT ACC ATG GAA GAAGAA AAC |
| SCLucPHLat-R | CCG CCG CGC AAG CTT TTA TAA TTT TGA TTT |

Confirmada a amplificação, o DNA amplificado foi purificado utilizando o kit “illustra™GFX™ PCR DNA and Gel Band purification kit” (GE Healthcare, UK), seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado e o vetor pColdII foram digeridos com as enzimas de restrição Hind III e KpnI em banho-maria por 1 hora a 37° C (30 µL do DNA amplificado, 1 µL da enzima Hind III, 1 µL da enzima KpnI, 4 µL do tampão da enzima e 5 µL de água ultrapura autoclavada para o DNA; e para o vetor pCold II, 2 µL do vetor, 1 µL da enzima HindIII, 1 µL da enzima KpnI, 1 µL do tampão da enzima e 6 µL de água ultrapura autoclavada).

Após as digestões o DNA e o vetor foram purificados e ligados usando o kit de ligação “Ligation Mix” (Takara, Japão) com a mistura de 5 µL do DNA, 5 µL do vetor e 10 µL do kit de ligação, a mistura foi mantida *overnight* a 4° C. Após a ligação foi feita

uma transformação utilizando as células de *E. coli* XL1-Blue. Depois da transformação, as colônias foram transferidas em placa Petri e induzidas a expressão de proteína com IPTG. Após ~20 horas da indução, as colônias foram borrifadas com luciferina 1 mM pH 5,0 e colocadas em câmera de fotodeteção CCD para identificar as colônias bioluminescentes.

4.5.1. Análise da subclonagem por digestão plasmidial de pC-PhLat

Para analisar a construção plasmidial pC-PhLat, foi feito um mapa de restrição da sequência do gene e do vetor pColdII, usando o programa BioEdit, para selecionar uma enzima de restrição capaz de clivar a sequência em regiões específicas. A digestão plasmidial foi realizada com a enzima de restrição SacI da seguinte forma: Em um tubo de 1,5 mL foi adicionado 2 µL do DNA plasmidial pC-PhLat, 1 µL de tampão 1, 6 µL de água ultrapura autoclavada e 1 µL da enzima SacI. A mistura foi incubada por 1 hora a 37° C e o resultado da digestão foi observado em transluminador após a eletroforese em gel de agarose.

4.6. Mutagênese sítio-dirigida

A mutagênese sítio-dirigida se baseia na amplificação completa do vetor, contendo o gene a ser mutado, utilizando *primers* que possuem a substituição desejada. Para isso, plasmídeos contendo o cDNA das luciferase pC-PhLat e PxRE foram amplificados utilizando 1 µL de plasmídeo (pC-PhLat ou PxRE), 0,25 µL de *Phusion* polimerase, 1 µL do *primer* contendo a mutação desejada, 1 µL do *primer* complementar reverso, 1 µL de dNTP's, 5 µL de tampão e 15,75 µL de H₂O livre de nucleases. Na luciferase das lanternas laterais de *P. hirtus* (pC-PhLat) foram realizadas as seguintes mutações: R215T, inserção de N351, P280A, L269F, I189T e a mutação no loop HNA351-354NDRE; Na luciferase das lanternas da cabeça (PxRE) foram feitas as

mutações inversas: deleção de N351, A280P, F269L, T189I e a mutação no loop NDRE351-354delHNA. Na tabela 4 são apresentados os nomes dos *primers* utilizados nas mutagêneses e suas respectivas sequências.

Tabela 4. *Primers* utilizados nas mutageneses sítio-dirigidas das luciferases das lanternas laterais e cefálicas de *Phrixothrix hirtus*.

| <i>Primer</i> | Sequência |
|--------------------|---|
| pC-PhLat.R215T-F | GT CTA ACC ATA ACA TTC GTT CAT AGC |
| pC-PhLat.R215T-R | GCT ATG AAC GAA TGT TAT GGT TAG AC |
| pC-PhLat.ins351N-F | GTA ATG ATT ACC CCT AAC CAT AAT GCT GTG |
| pC-PhLat.ins351N-R | CAC AGC ATT ATG GTT AGG GGT AAT CAT TAC |
| pC-PhLat_P280A-F | TAC AAA ATC GCC ACT ATT GTA G |
| pC-PhLat_P280A-R | CTA CAA TAG TGG CGA TTT TGT A |
| pC-PhLat_L269F-F | GAG GGC GCA TTT TTC TTA AAA ACC |
| pC-PhLat_L269F-R | GGT TTT TAA GAA AAA TGC GCC CTC |
| pC-PhLat_I189T-F | CCC TTG AAA AAA CCG CAT TAA TTA TG |
| pC-PhLat_I189T-R | CAT AAT TAA TGC GGT TTT TTC AAG GG |
| pC-PhLat.K7-F: | G ATT ACC CCT AAT GAT AGA GAA GTG AAA ACA GGT |
| pC-PhLat.K7-R: | ACC TGT TTT CAC TTC TCT ATC ATT AGG GGT AAT C |
| PxRE.N351del-F | CTG AGC CCC GAT AGA GAG CTG |
| PxRE.N351del-R | CAG CTC TCT ATC GGG GCT CAG |
| PxRE_A280P-F | C TAC AAG ATC CCT TCT ATC GTG GTG |
| PxRE_A280P-R | CAC CAC GAT AGA AGG GAT CTT GTA G |
| PxRE_F269L-F | GAG GGC GAG TTG TTC CTG AAG A |
| PxRE_F269L-R | TCT TCA GGA ACA ACT CGC CCT C |
| PxRE_T189I-F | CTG GAG AGA ATC GCG CTG ATC AT |
| PxRE_T189I-R | ATG ATC AGC GCG ATT CTC TCC AG |
| PxRE.cassete-F: | TGA TCC TGA GCC CCC ATA ATG CGC TGA AGA AGG G |
| PxRE.cassete-R: | CCC TTC TTC AGC GCA TTA TGG GGG CTC AGG ATC A |

As etapas do PCR envolveram os seguintes ciclos: 1 ciclo térmico de 98°C por 2 minutos; 25 ciclos de 98°C por 30 segundos, 55-65°C por 1 minuto e 72°C por 6 minutos e 1 ciclo final de 72°C por 10 minutos. Após a confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose, foi adicionado 1 µL de enzima de restrição DpnI no produto da reação para digerir os plasmídeos parentais não mutados por 1 hora a 37°C e, após a digestão, bactérias *E.coli* XLBlue foram transformadas com 5 µL da mistura de reação com plasmídeos mutagenizados. Após isso, as colônias foram isoladas e induzidas com IPTG a expressar as luciferases, os mutantes positivos foram selecionados por fotodeteção em câmera CCD e no espectroluminômetro AB-1850

Lumi FI Spectra Capture (ATTO, Japão), as mutações foram então confirmadas por sequenciamento.

4.7. Expressão heteróloga e purificação de luciferases recombinantes

Expressão heteróloga. Bactérias *E. coli* BL21 competentes foram transformadas com o DNA plasmidial contendo o gene de luciferase de interesse. Uma pré-cultura foi feita, a partir de uma colônia isolada, em 5 mL de meio líquido LB/Ampicilina (100 mg/mL) e incubada a 37° C *overnight* em incubadora sob agitação de 225 rpm. Em seguida, essa pré-cultura foi transferida para 100 mL de meio líquido LB e a cultura ficou incubada sob agitação a 225 rpm a 37° C até atingir a absorbância (600nm) = 0,4, e então induzida para expressão de proteínas *overnight* a 16° C após a adição de 40 µL de IPTG 1 M.

Extração de luciferases. Volumes de 100 mL de culturas induzidas foram transferidos para tubos tipo *Falcon* e centrifugados a 2.500 g por 15 minutos a 4° C para coleta do precipitado. As células coletadas foram ressuspensas em 2 mL de tampão de extração gelado (Tampão Fosfato de sódio 50 mM, pH 7, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) e 100 µL de coquetel inibidor de protease. A lise celular foi realizada por ultrasonicação (Misonix, Nova York, EUA) com 10 pulsos de 10 segundos e a amostra lisada centrifugada a 15.000 g a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e usado em ensaios funcionais *in vitro* ou para purificação das proteínas recombinantes.

Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade. As luciferases foram purificadas por cromatografia de afinidade com resina de níquel, este método se baseia na afinidade da cauda de histidina fundida a enzima recombinante por íons de níquel (Ni-NTA) imobilizados em uma resina de agarose. A resina de Ni-NTA-Agarose (Qiagen) foi equilibrada com tampão de extração (Tampão Fosfato de sódio 50 mM, pH

7, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol), misturada com o extrato bruto por 45 minutos e submetida a agitação moderada por 45 minutos a 4°C para permitir a ligação da cauda de histidina da proteína recombinante ao níquel da resina. A mistura foi então aplicada em uma mini coluna e lavada com 20 mL de tampão de lavagem (Tampão Fosfato de sódio 50 mM, pH 7, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol). A proteína recombinante foi eluída da resina com tampão de eluição (Tampão Fosfato de sódio 50 mM, pH 7, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) em alíquotas de 1 mL/cada. Cada alíquota foi analisada em ensaio *in vitro* para atividade luciferásica, e as frações com maior atividade foram separadas e dialisadas em tampão de diálise (Tampão Tris 25 mM, pH 8, NaCl 10mM, EDTA 1mM, DTT 2 mM, glicerol 10%) por 12h e estocadas a 4° C até sua utilização nos experimentos.

4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page

A análise da expressão e da purificação das luciferases foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à corrida de 100 volts por 1 hora em tampão de corrida (0,125 M de Tris-glicina pH 8,3% e SDS 0,5%). O gel foi corado com Comassie Blue por 30 min sob leve agitação. Após a coloração, o gel foi imerso em água sob agitação para lavagem e após a secagem o gel foi fotografado.

4.9. Ensaio luminométrico da Atividade luciferásica

As atividades luminescentes das luciferases foram medidas em counts por segundo (cps) em luminômetro 2200R (ATTO, Japão), misturando em um tubo de luminômetro 85 µL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, 5 µL de extrato bruto ou luciferase purificada, 5 µL de luciferina 10 mM e 5 µL de solução contendo MgSO₄ 80mM e ATP

40 mM. Para medidas *in vivo* foram utilizados 90 μL de cultura e 10 μL de luciferina 10 mM pH 5.0. Os ensaios foram realizados em triplicada e as médias e desvios reportados nos resultados.

4.10. Espectros de bioluminescência

Os espectros de bioluminescência das luciferases foram medidos na presença de ATP e luciferina, em espectroluminômetro AB-1850 Lumi FI Spectra Capture (ATTO, Japão). No ensaio foram misturados 85 μL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0; 5 μL de luciferase purificada ou extrato bruto, 5 μL de luciferina 10 mM e 5 μL de solução contendo MgSO_4 80mM e ATP 40 mM.

4.11. Determinação dos K_M para ATP e luciferina

Para determinação do K_M para luciferina e ATP, foram realizadas medições da atividade luminescente *in vitro* em diferentes concentrações de substratos a ser analisado, mantendo concentração saturante do outro substrato: (luciferina) 0,5 μM , 1,5 μM , 3.5 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM , 30 μM , 50 μM , 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 1 mM, ou de (ATP) 0,625 μM , 1,25 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 30 μM , 50 μM , 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM, mantendo a concentração saturante do outro substrato (luciferina 1 mM e ATP 2 mM). Os valores obtidos foram plotados para construir a curva de saturação e o inverso desses valores foram utilizados na construção do gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk). A partir do duplo recíproco foi possível estimar pelos inversos dos interceptos no eixo x os valores de K_M para luciferina e ATP.

4.12. Estudos sobre a biossíntese de luciferina

4.12.1. Síntese não-enzimática de luciferina

A síntese não-enzimática de luciferina a partir de cisteína e *p*-benzoquinona, relatada por Kanie *et al.* (2016) foi reproduzida nas condições descritas no trabalho dos autores, e na presença de luciferase de *A. vivianii*, expressa e purificada utilizando os métodos descritos acima, como sensor da presença de luciferina. Para isso, foram utilizados tubos de 200 μ L contendo uma mistura de 90 μ L de tampão Tris-HCl 90 mM, pH 7.5, 5 μ L de *p*-benzoquinona 80 mM e 5 μ L de cisteína 80 mM,. Para testar a enantioseletividade da reação bioluminescente da luciferase, foram utilizadas misturas contendo L-cisteína de D-cisteína. A formação de luciferina foi acompanhada através da fluorescência da reação e também pela atividade luminescente na presença de luciferase nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos. A fluorescência foi observada irradiando luz UV sobre os tubos. A medição da atividade luminescente foi realizada em luminômetro 2200R (ATTO, Japão), misturando 85 μ L de tampão Tris HCl 0.1 M, pH 8.0, 5 μ L de luciferase de *A. vivianii*, 5 μ L de MgATP 80/40 mM e 5 μ L da mistura. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.12.2. Cromatografia de camada fina (TLC) para luciferina

Para analisar se a molécula formada na reação se tratava de luciferina, foi feita uma cromatografia de camada delgada (TLC). Como controle, foi utilizada luciferina comercial (Promega) para comparação com a luciferina obtida na reação de *p*-benzoquinona e cisteína. Numa placa de sílica gel (Merck, EUA) foi pipetado 1 μ L de luciferina 0,1 mM, 1 μ L da mistura contendo L-cisteína + *p*-benzoquinona e 1 μ L da mistura contendo D-cisteína e *p*-benzoquinona à 1,5 cm da borda inferior da folha. Como fase móvel foi utilizada uma solução de acetato de etila grau HPLC, etanol e H₂O

(5:2:3) em uma cuba de cromatografia onde 1 cm da parte inferior da folha foi mergulhada. Ao término da cromatografia, a altura da migração do solvente foi marcada. Após a secagem da placa, as bandas então foram visualizadas pela fluorescência verde-amarela mediante irradiação com luz UV e o coeficiente de migração das amostras foi calculado de acordo com a razão da migração do ponto fluorescente em relação a migração do solvente.

4.12.3. Síntese de luciferina em culturas de bactérias

Para testar a formação de luciferina *in vivo* em culturas de bactérias transformadas e induzidas para expressar a luciferase de *A. vivianii* (métodos descritos acima), foram utilizadas placas do tipo ELISA. Em poços contendo 100 µL de cultura, foram testados os seguintes reagentes: 1) 5 µL de *p*-benzoquinona 80 mM + 5µL de H₂O ultrapura; 2) 5µL de D-cisteína 80 mM + 5µL de H₂O ultrapura; 3) 5µL de L-cisteína + 5µL de H₂O ultrapura 4) 5µL de *p*-benzoquinona 80 mM + 5 µL D-cisteína 80 mM; 5) 5 µL de *p*-benzoquinona 80 mM + 5 µL de L-cisteína 80 mM. Como controle negativo Os mesmos tratamentos foram realizados utilizando bactérias transformadas com o vetor (pColdII) sem o gene da luciferase, em triplicata. Os sinais luminescentes foram detectados em câmera CCD Night Owl Berthold.

4.12.4. Ensaio de toxicidade por *p*-benzoquinona em bactérias *E. coli* imobilizadas.

Sabendo que a *p*-benzoquinona é tóxica para organismos vivos, e que a concentração de 3,6 mM tem um efeito tóxico em bactérias imobilizadas, testamos concentrações menores deste reagente para avaliar as concentrações limites que ainda permitem a viabilidade das células. As bactérias imobilizadas em placa Elisa foram expostas as concentrações de *p*-benzoquinona de 0,027 mM, 0,055 mM, 0,11 mM, 0,22

mM, 0,45 mM, 0,9 mM, 1,8 mM e 3,6 mM, durante 30 minutos a 22°C. Após esse período foi pipetado 10 µL de luciferina 1 mM pH 5.0 em cada poço e a placa foi analisada quanto a produção de bioluminescência em câmera de fotodeteção CCD como indicador de presença de ATP e portanto de viabilidade das células. As imagens obtidas foram analisadas para estimar a IC₅₀ (Concentração de determinado composto necessário para inibir a atividade luminescente em 50%) usando a ferramenta Quest GraphTM IC50 Calculator.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ASPECTOS GERAIS DA BIOLUMINESCÊNCIA DE FENGODÍDEOS

Dentro da superfamília Elateroidea, as larvas “trenzinhos” da família Phengodidae possuem uma ampla variedade espectral de bioluminescência, exibindo bioluminescência variando do verde ao vermelho, dependendo da lanterna e do estágio de vida, sendo a menos estudada entre as famílias bioluminescentes de coleópteros e a que possui menos luciferases clonadas. Esse fato está relacionado a dificuldade em encontrar e coletar esses organismos, principalmente aqueles na fase adulta. Em nossas coletas, salvo raras exceções, a ocorrência de fengodídeos é sempre muito menos abundante do que as de insetos das famílias Lampyridae e Elateridae.

5.1.1. Associação larva/adulto *Stenophrixotrix pallens*

Com exceção de *Phrixotrix hirtus* (COSTA *et al.*, 1999) a correlação entre larvas e adultos das espécies de fengodídeos nunca foi relatada na literatura, devido ao fato de serem dificilmente criados até a fase adulta em laboratório. As correlações têm sido feitas baseadas na simpatricidade e proximidade geográfica das larvas e adultos, e na semelhança dos espectros de lanternas laterais de machos adultos e larvas (VIVIANI; BECHARA, 1997), o que sabidamente pode levar a erros de identificação.

A espécie de fengodídeo *Stenophrixotrix pallens* tem sido frequentemente coletada em nosso campus por coleta de pano, bem como algumas larvas de fengodídeos na mesma localidade. A partir disto, resolvemos realizar análises de DNA, bem como um estudo dos espectros de bioluminescência, para ver se estas larvas e os adultos identificados correspondiam a mesma espécie. Utilizamos marcadores moleculares (16S e 18S rRNA) e espectros de bioluminescência. Na figura 3 são apresentados os fengodídeos coletados no campus da UFSCAR Sorocaba.



Figura 3. Fengodídeo nas fases adulta e larval identificado como *Stenophrixotrix pallens*, coletados no Campus da UFSCAR Sorocaba. **A)** Adulto, vista dorsal; **B)** Adulto, vista lateral; **C)** Adulto exibindo sua bioluminescência; **D)** Larva, vista lateral; **E)** Larva, detalhe da cabeça. Fonte das imagens A, B, D e E: Dr. André Roza; Fonte da imagem C: Acervo pessoal do autor.

Aspectos biológicos. Larvas e adultos de *Stenophrixotrix* são encontrados em matas secundárias na região de mata Atlântica. As larvas dessa espécie foram coletadas no folhço em noites escuras e são detectadas pela luz amarela, emitida pelas lanternas laterais, e pela luz amarelo-laranja da lanterna cefálica. Já os adultos foram coletados usando a armadilha de pano com luz no período logo após o por do Sol, em outubro de 2021.

As larvas possuem 11 pares de lanternas laterais puntiformes, localizadas dorsalmente e emissoras de luz amarela, e uma pequena lanterna cefálica que emite

bioluminescência luz de cor laranja. Um detalhe interessante é que quando a larva está se deslocando, dependendo do ângulo da cabeça, a luz cefálica se mostra mais alaranjada quando vista de frente, e mais amarelada quando observada dorsalmente. É provável que tal diferença na observação das cores conforme o ângulo seja causada pelo efeito da cutícula dorsal mais escura da cabeça que pode funcionar como um filtro da luz emitida.

Após a metamorfose, os adultos mantêm as lanternas laterais como as larvas e exibem bioluminescência amarela. No entanto, os adultos perdem a lanterna cefálica.

5.1.2. Espectros de bioluminescência de diferentes lanternas e fases de vida

Obtivemos os espectros de bioluminescência *in vivo* e *in vitro* das lanternas da cabeça e laterais de adulto e larvas, com a finalidade de estabelecer uma possível associação entre a larva e o adulto, uma vez que ambos foram coletados no mesmo habitat e localização geográfica.

Os espectros de bioluminescência *in vivo* da cabeça dessa espécie foram obtidos com os espécimes imobilizados em uma lâmina de microscópio em um espectroluminômetro ATTO AB-18505 (Tóquio, Japão). Notavelmente, para a lanterna da cabeça, houve uma variabilidade considerável nos picos de emissão, corroborando com a observação visual de que a lanterna da cabeça dessa espécie emite diferentes cores de luz dependendo do ângulo de observação. Na figura 4 são apresentados os espectros de bioluminescência da cabeça de uma larva viva.

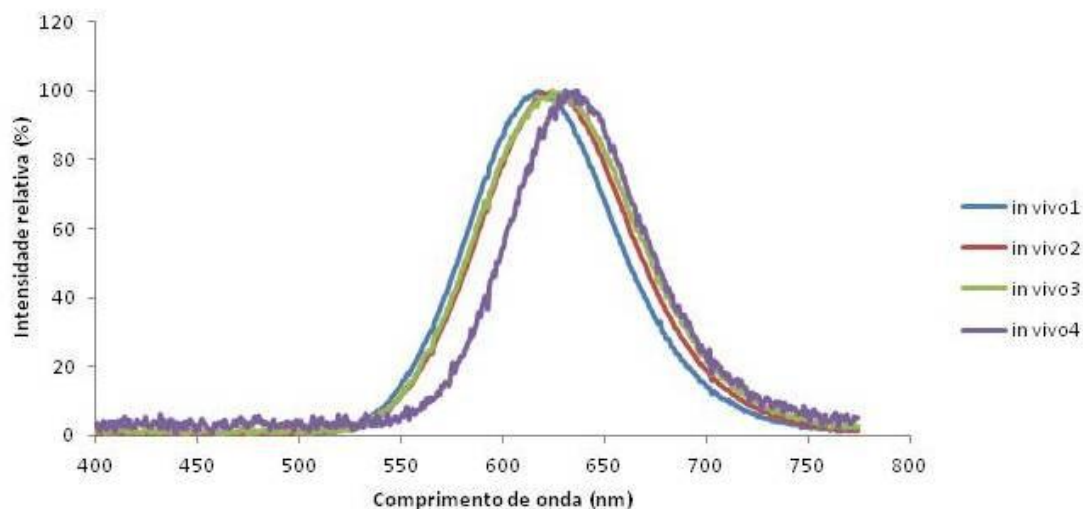


Figura 4. Espectros de bioluminescência *in vivo* da cabeça de larvas de *Stenophrixotrix pallens*.

Também obtivemos espectros *in vitro* a partir de extratos brutos preparados a partir de lanternas de larvas e adultos dessa espécie. Notavelmente, diferentemente dos espectros *in vivo* e do que se esperava, os espectros obtidos com os extratos brutos, na presença de luciferina e ATP, foram iguais tanto para as lanternas laterais do corpo de larva e do adulto quanto para a cabeça da larva (571 nm), indicando que estas lanternas podem possuir a mesma luciferase, ou isozimas muito similares. Na figura 5 são apresentados os espectros obtidos com os extratos brutos de larva e adulto.

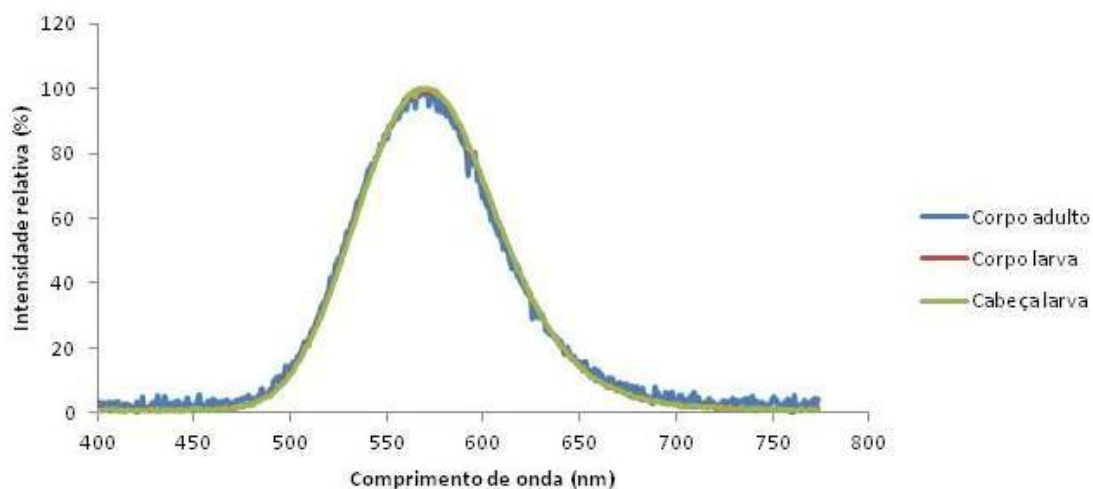


Figura 5. Espectros de bioluminescência *in vitro* obtidos com extratos brutos de lanternas do adulto e da larva de *Stenophrixotrix pallens*.

Esses resultados sugerem que, assim como em larvas de *Brasilocerus* sp. (resultados apresentados adiante), essa espécie pode possuir apenas uma isoenzima de luciferase nas lanternas cefálicas e laterais das larvas e na fase adulta. Essa hipótese pode ser testada com estudos transcriptômicos e também histológicos das lanternas laterais e principalmente da cabeça para avaliar a presença de cutículas capazes de filtrar e modular a cor da bioluminescência.

5.1.3. Associação de larvas e adultos utilizando marcadores moleculares

Apesar da ocorrência das larvas e adultos no mesmo habitat e localidade, e dos espectros de bioluminescência das lanternas laterais coincidentes, não podemos afirmar que as larvas e adultos são da mesma espécie. Assim sequenciamos o DNA de genes marcadores, mitocondrial 16S rRNA e o nuclear 18S rRNA, utilizando *primers* desenhados para essa finalidade. A identidade das sequências do gene 16S (100%) apontam que larva e adulto são da mesma espécie, *Stenophrinxotrix pallens*. As sequências obtidas são idênticas quando alinhadas com a ferramenta ClustaW, quando submetidas a ferramenta Blastn. Essas sequências parciais também apresentam 88,85% de identidade com a sequência do gene 16S de um fengodídeo (espécie não indicada) coletado no Panamá (número de acesso KF626008.1). Na figura 6 é apresentado o alinhamento das sequências do gene marcador mitocondrial 16S da larva e adulto.

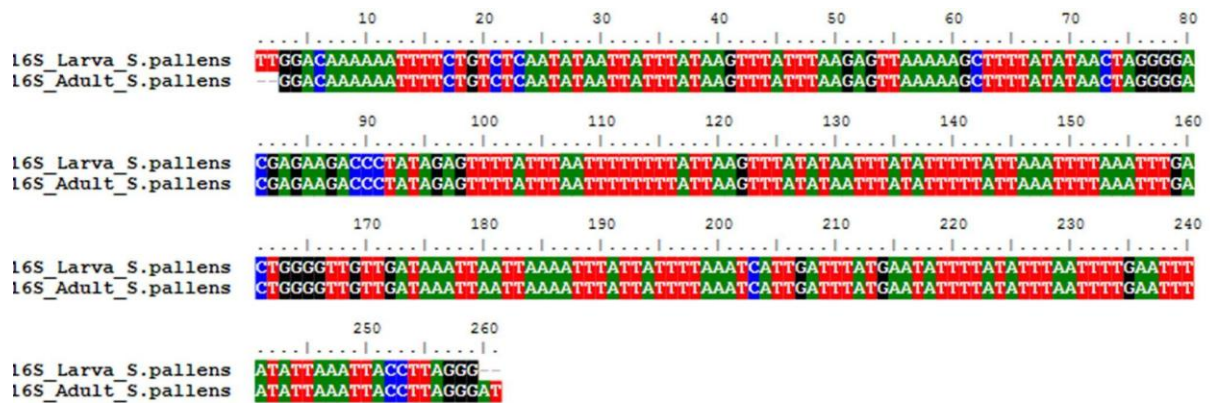


Figura 6. Alinhamento das seqüências de DNA do marcador molecular 16S rRNA amplificadas do indivíduo adulto e da larva de fengodídeo *Stenophrixotrix pallens* coletados no campus da UFSCAR Sorocaba.

As seqüências obtidas para o gene marcador nuclear 18S também foram idênticas para larva e adulto. Porém, a seqüência parcial obtida desse gene apresenta 100% de identidade com um trecho da seqüência do gene 18S da espécie *Zarhipis integripennis* dos Estados Unidos (número de acesso MK834152.1) e outras espécies de fengodídeos não identificadas no banco de dados do NCBI, indicando ser uma região altamente conservada entre as espécies da família Phengodidae. Na figura 7 é apresentado o alinhamento entre as seqüências obtidas da larva e do adulto. No conjunto, estes resultados confirmam que larva e adulto pertençam à mesma espécie.

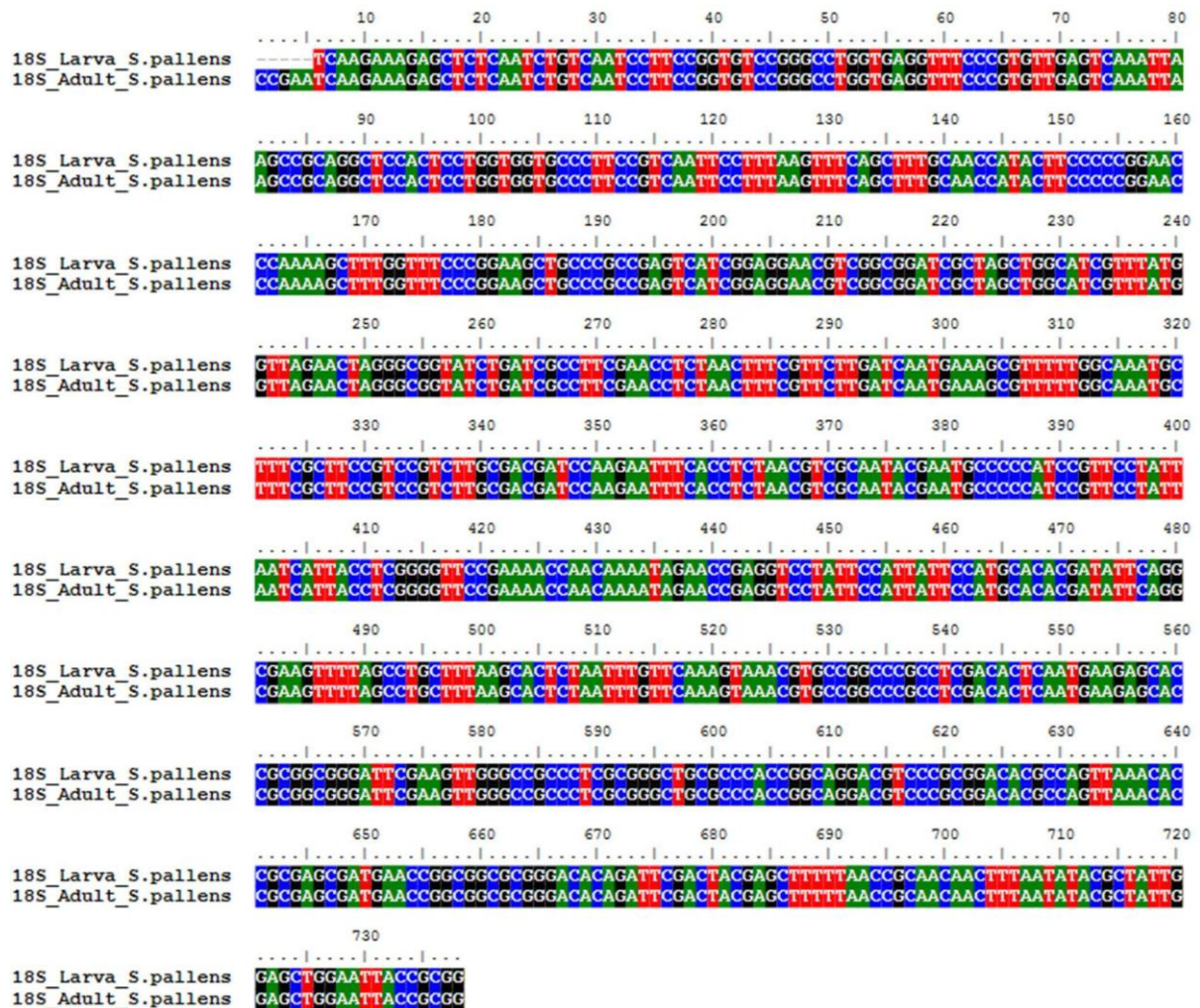


Figura 7. Alinhamento das seqüências de DNA do marcador molecular 18S rRNA amplificadas do indivíduo adulto e da larva de fengodídeos *Stenophrixotrix pallens* coletados no campus da UFSCAR Sorocaba.

Com as sequências desses genes marcadores foi possível realizar também a análise filogenética dessa espécie utilizando seqüências de espécies próximas depositadas no banco de dados NCBI. Porém, no caso do marcador 16S as espécies que possuem sequências depositadas não estão identificadas a nível de espécie, apenas a nível de família, e isso fornece pouca informação a respeito das relações filogenéticas. Na figura 8 é apresentada a árvore filogenética construída a partir das seqüências do gene marcador 16S.

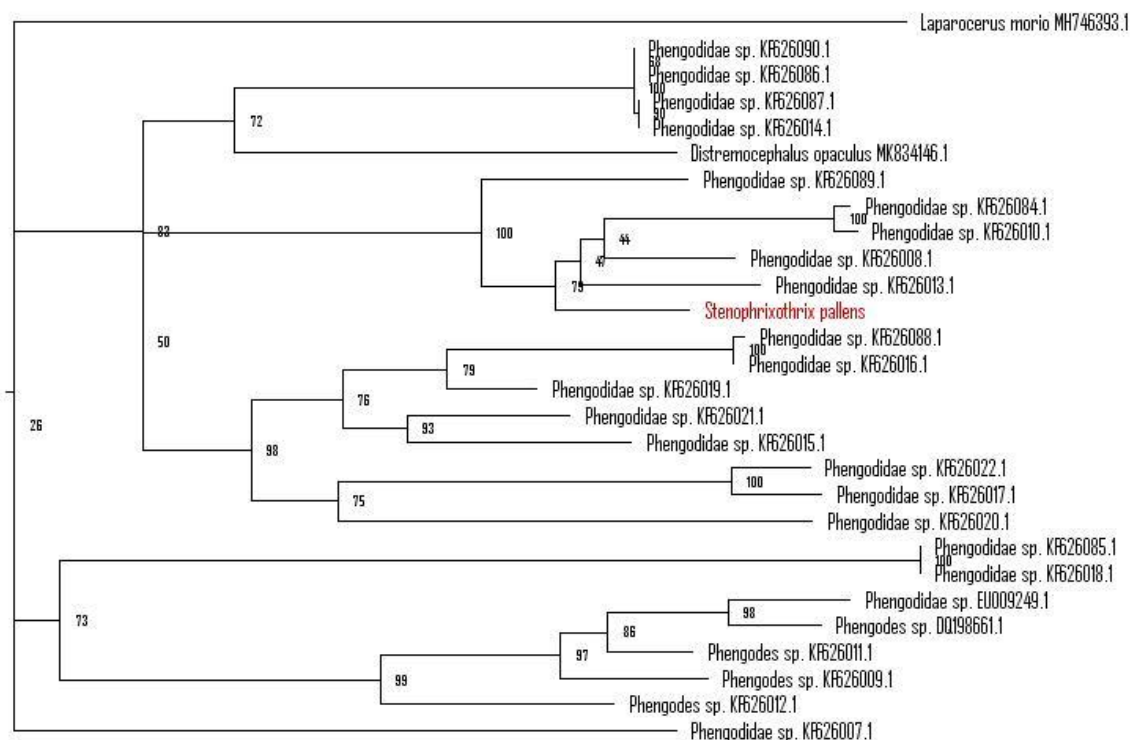


Figura 8. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene marcador 16S rRNA de *Stenophrixotrix pallens* (destacado em vermelho) e outras sequências de espécies próximas depositadas no NCBI.

No caso do marcador 18S rRNA, a análise filogenética também apresenta limitações para a compreensão das relações entre as espécies pelo fato de nem todas as espécies que apresentaram algum grau de identidade estarem identificadas a nível de espécie. Na figura 9 se pode observar a estreita relação entre os clados das famílias Phengodidae e Rhagophthalmidae, e um clado formado apenas por espécies da família Elateridae.

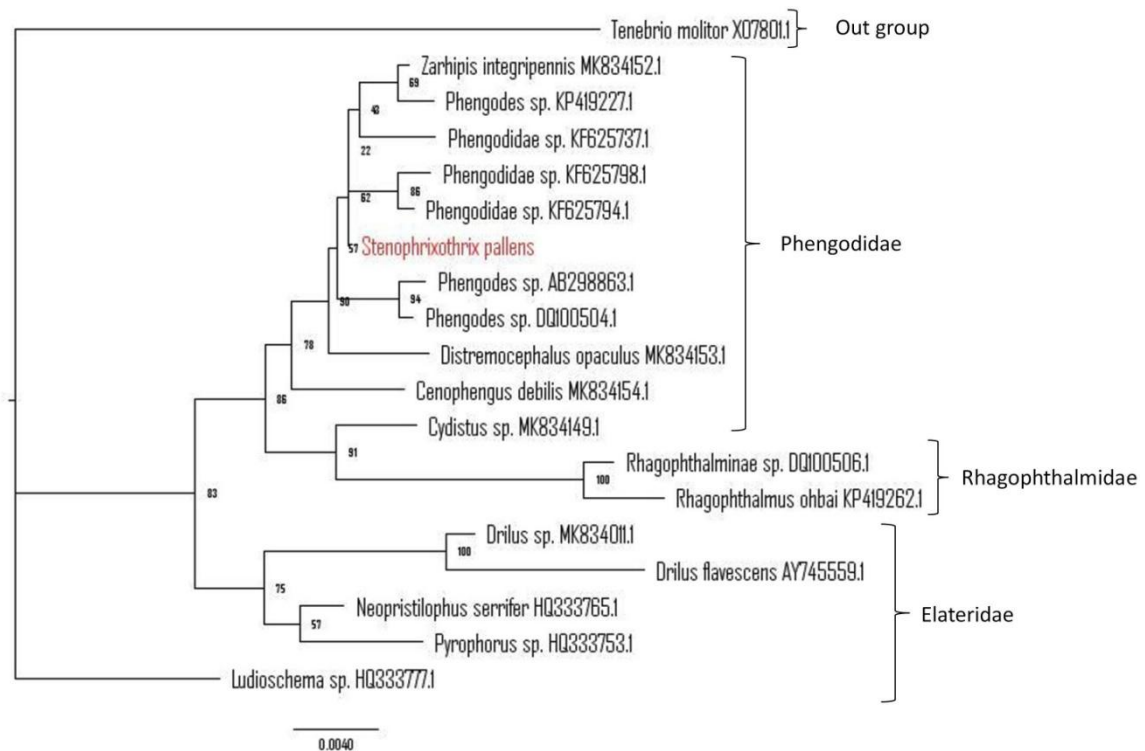


Figura 9. Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene marcador 18S rRNA de *Stenophrixotrix pallens* (destacado em vermelho) e outras sequências de espécies próximas depositadas no NCBI.

5.1.4. Análises de luciferases em Transcriptomas de *Brasilocerus* sp., *Phrixotrix* sp. e *Mastinomorphus* sp.

Análises transcriptômicas foram realizadas com região anterior do protórax contendo a cabeça de larvas dos fengodídeos *Brasilocerus* sp., coletado na Estação Biológica em Boracéia-SP, de *Phrixotrix hirtus* coletadas na Fazenda Santana em Campinas-SP, e com corpo inteiro da larva de *Mastinomorphus* sp. coletado na Amazônia. Nessas análises foi possível buscar as sequências referentes às luciferases dessas espécies para complementar as poucas informações a respeito dessas enzimas em fengodídeos.

***Brasilocerus* sp.** A busca por sequências de luciferases nas análises transcriptômicas da cabeça de *Brasilocerus* sp. resultou em apenas uma sequência completa (comp11259_c0_seq1), com tamanho de 1772 pb. A sequência encontrada apresenta 99% de identidade com aquela clonada anteriormente por Arnoldi *et al.* (2010) das lanternas laterais de *Brasilocerus* sp, indicando a possibilidade dessa espécie apresentar apenas uma isozima nas lanternas da cabeça e laterais, diferentemente do gênero *Phrixotrix* que possui isozimas distintas nas lanternas laterais e da cabeça.

***Phrixotrix hirtus*.** Os resultados das análises transcriptômicas da cabeça de *Phrixotrix hirtus* coletado na Fazenda Santana em Campinas – SP sugerem que essa seja uma espécie diferente de *Phrixotrix*. Esperávamos encontrar uma luciferase idêntica ou com alta identidade com a luciferase emissora de luz vermelha (PxRE) clonada de *P. hirtus* coletados em Costa Rica – MS (VIVIANI *et al.*, 1999b). Porém, a única sequência completa referente à luciferase (comp7053_c0_seq1) apresentou maior identidade com as luciferases das lanternas laterais de *Phrixotrix* (85%) do que com a luciferase da cabeça emissora de luz vermelha de *Phrixotrix hirtus* (76%).

Embora não seja possível, até o momento, analisar funcionalmente essa luciferase, sua sequência traz informações úteis sobre a estrutura primária e para os estudos evolutivos das luciferases de fengodídeos que serão apresentados adiante nesta tese.

***Mastinomorphus* sp.** Nas análises transcriptômicas da larva da espécie *Mastinomorphus* sp., foram encontradas 2 isoformas de luciferases distintas com 74,8% de identidade entre si. Ambas as luciferases apresentam 547 aminoácidos em sua sequência primária. A primeira luciferase encontrada nessa análise, MastiLuc1

(DN3472_c0_g1_i1), apresentou maior identidade com a luciferase de lanternas laterais de *Taximastinocerus* sp. (78,5%). A segunda luciferase encontrada, MastiLuc2 (DN12470_c0_g1_i1), apresentou maior identidade com a luciferase de *Brasilocerus* sp. (80,8%). Embora não seja possível indicar qual das isoformas é referente às lanternas da cabeça e qual é das lanternas laterais, esses resultados indicam que, assim como no gênero *Phrixotrix*, o gênero *Mastinomorphus* possui 2 luciferases bem distintas nas lanternas da cabeça e laterais, possivelmente geradas por um processo de duplicação gênica.

5.1.5. Clonagem, caracterização e comparação de novas luciferases de fengodídeos

Neste trabalho apresentamos a clonagem, expressão e caracterização de duas novas luciferases funcionais de larvas da tribo Mastinocerini, uma isolada a partir da biblioteca de cDNA das lanternas da cabeça e protórax de *Brasilocerus* sp. e outra das lanternas laterais de *Phrixotrix hirtus*, clonada anteriormente por Arnoldi et al (2010) e agora subclonada em um vetor de expressão pColdII.

Com a luciferase ativa das lanternas laterais de *Phrixotrix hirtus*, juntamente com a luciferase emissora de luz vermelha da mesma espécie, realizamos estudos comparativos e mutagêneses sítio-dirigidas para melhor entender a relação entre estrutura e função das luciferases de fengodídeos, especialmente os espectros de bioluminescência.

5.1.6. Screening da biblioteca de cDNA da cabeça de *Brasilocerus* sp. para clones de luciferases

Construímos a biblioteca de cDNA para lanternas da cabeça de *Brasilocerus* sp. e com essa biblioteca foram realizados *screenings* funcionais para identificar clones

positivos para a luciferase desta lanterna. Em cada *screening* realizado foram testadas ca de 3.000 ufc's (unidades formadoras de colônia), totalizando em torno de 40.000 ufc's rastreadas. Apenas 1 clone positivo para bioluminescência foi identificado por fotodeteccção, utilizando a câmara CCD Night Owl (Berthold).

Após purificação do plasmídeo contendo o gene da luciferase de *Brasilocerus*, uma análise por PCR utilizando *primers* universais M13-R e M13-20 indicou que o fragmento inserido no vetor possui ~2.000 pb, aproximadamente o tamanho esperado para um clone de luciferase de coleóptero. O gene isolado foi então sequenciado. Notavelmente, a luciferase clonada a partir de lanternas cefálicas de *Brasilocerus* apresenta 99% de identidade a nível de estrutura primária com aquela clonada anteriormente das lanternas laterais da mesma espécie por Arnoldi *et al* (2010). Além disto, esta foi a única cópia de luciferase encontrada na análise transcriptômica da cabeça dessa espécie, indicando que, nessa espécie, as lanternas laterais e cefálicas podem estar compartilhando a mesma isoenzima, diferentemente do gênero *Phrixotrix* que claramente apresenta duas isozimas distintas nas lanternas laterais e da cabeça.

5.1.7. Expressão e caracterização da luciferase de *Brasilocerus* sp.

Primers foram desenhados para amplificar e subclonar o gene dessa luciferase em um vetor de expressão com cauda *histag* que permita sua purificação por afinidade com níquel, porém a subclonagem dessa enzima não foi realizada com sucesso e assim a caracterização foi realizada apenas utilizando a enzima presente em extratos brutos.

Cinética. A luciferase mostrou uma cinética de luminescência mais lenta, com tempo de meia vida estimado em ~325 segundos, e altos valores de K_M tanto para o substrato luciferina (~125 μ M) quanto para o ATP (~500 μ M), características estas

muito semelhantes a luciferase de lanternas laterais de *Phrixotrix vivianii*. Esses resultados são apresentados na tabela 5.

Espectros de bioluminescência. O pico de emissão do espectro de bioluminescência foi em ~566 nm em pH 8.0 (seu pH ótimo para a atividade bioluminescente). Porém, apesar de fazer parte do grupo das luciferases pH-insensitivas (que não mudam o espectro entre pH 6 e 8), a luciferase de *Brasilocerus* apresentou deslocamento no espectro de bioluminescência em pH mais alcalino, variando de 563 nm em pH 7.0 até 572 nm em pH 9.0. Na figura 10 são apresentados os espectros de bioluminescência da luciferase de *Brasilocerus* sp. em diferentes pH's.

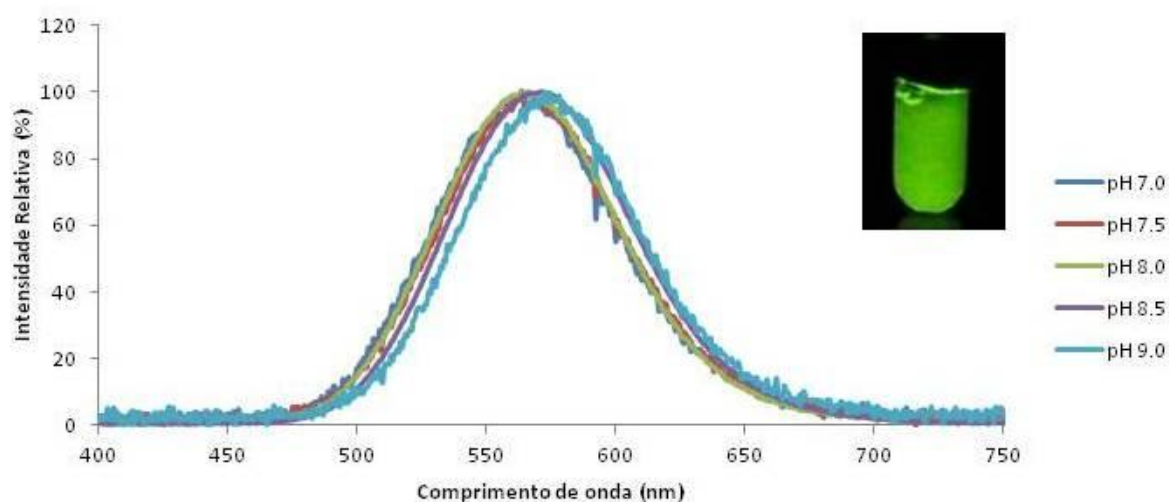


Figura 10. Espectros de bioluminescência da luciferase da lanterna da cabeça de *Brasilocerus* sp. em diferentes faixas de pH.

5.1.8. Luciferase recombinante das lanternas laterais de *P. hirtus* (pC-PhLat)

A clonagem da luciferase lateral de *P. hirtus* já havia sido realizada anteriormente por nosso grupo de pesquisa utilizando a técnica de RT-PCR, no entanto essa luciferase não foi expressa em sua forma ativa devido a sua insolubilidade (ARNOLDI et al., 2010). Neste trabalho realizamos a subclonagem dessa luciferase

para o vetor pColdII que permite expressão de proteínas insolúveis em baixas temperaturas, permitindo expressar esta enzima na forma ativa e sua purificação.

Comparação das estruturas primárias das luciferases de *Phrixotrix*. A luciferase presente nas lanternas laterais de *P. hirtus*, apresenta 545 resíduos de aminoácidos e peso molecular calculado de 59,7 kDa (sem contar a cauda de histidina conferida pelo vetor). Como esperado, a sequência de aminoácidos de pC-PhLat apresenta alta porcentagem de identidade (98,9 %) com a sequência da luciferase das lanternas laterais de *Phrixotrix vivianii*. Esperava-se, entretanto, que a sequência Ph_lateral relatada por Arnoldi e seus colaboradores fosse 100% idêntica à luciferase clonada aqui (pC-PhLat). A principal diferença entre essas duas sequências de aminoácidos está na posição 215, crucial para a atividade e espectro de bioluminescência. Essa substituição pode ter sido inserida acidentalmente no processo de PCR ou por erro no sequenciamento.

Na análise transcricional de tecidos fotogênicos e não-fotogênicos de *P. hirtus* também foi identificada outra possível sequência (PhLant_1) da luciferase das lanternas laterais dessa espécie (AMARAL *et al.*, 2017). Entretanto, a sequência obtida no transcriptoma apresenta 89.5% de identidade com a luciferase que aqui caracterizamos, pC-PhLat, e 90% com a luciferase inativa anteriormente amplificada por Arnoldi *et al.* (2010). Assim, encontramos três sequências distintas referentes à luciferase das lanternas laterais de *P. hirtus*. Dessas, uma é inativa (Ph_lateral), outra foi caracterizada funcionalmente nessa tese (pC-PhLat) e a terceira (PhLant_1), apesar de possuímos a sequência, ainda não foi clonada em um vetor de expressão. Na figura 11 é apresentado o alinhamento dessas sequências.

Esta variação nas sequências de luciferases (89.5 % – 99.4 %) encontradas nas mesmas lanternas de uma mesma espécie de *Phrixotrix* era inesperada, e poderia ser explicada por diferentes motivos: 1) Os indivíduos usados para clonagem, sendo originários de regiões bem distantes (Campinas-SP e Costa Rica-MS), podem ser de espécies diferentes, considerando-se que as larvas de *Phrixotrix hirtus* coletadas em Campinas nunca foram criadas até adulto de modo que a associação destas com a espécie *P.hirtus* pode estar incorreta; 2) Os indivíduos são da mesma espécie, mas apresentam polimorfismos (polimorfismo intraespecífico) consideráveis dada à distância geográfica.; 3) O processo de PCR usado para amplificar estes genes, pode ter causado substituições na sequência; 4) Artefatos de sequenciamentos, principalmente aquele de transcriptoma. Possivelmente a primeira explicação é a mais válida, considerando-se que as diferenças são bem maiores do que esperado por artefatos de PCR e sequenciamentos.

```

      10      20      30      40      50      60
Ph Lateral_(inativa)  MEEENIRHGERPRDIVHPGSAGQQLYQSLYKFASFPEAII DAHTNEVISYAQIFETSCRL
PhLant1_Luc_(transcrip) MEEENIRHGDRPRDIVHPGSAGQQLYQSLYKFASFPEAIVDAHTTEVISYQIFETSCRL
pC-PhLat             MEEENIRHGERPRDIVHPGSAGQQLYQSLYKFASFPEAII DAHTNEVISYAQIFETSCRL
PxGR                 MEEENIRHGERPRDIVHPGSAGQQLYQSLYKFASFPEAII DAHTNEVISYAQIFETSCRL

      70      80      90      100     110     120
Ph Lateral_(inativa)  AVSIEQYGLNENNVVGVCSENNINFFNPVLAALYLGIPVATSNDMYTDGELTGHNLISKP
PhLant1_Luc_(transcrip) AVSLEKYGLNEKNVGVCSENNINFFNPVLAALYLGIPVATSNDMYTDGELTGHNLISKP
pC-PhLat             AVSIEQYGLNENNVVGVCSENNINFFNPVLAALYLGIPVATSNDMYTDGELTGHNLISKP
PxGR                 AVSIEQYGLNENNVVGVCSENNINFFNPVLAALYLGIPVATSNDMYTDGELTGHNLISKP

      130     140     150     160     170     180
Ph Lateral_(inativa)  TIMFSSKKALPLILRVQQNLSFIKKVVVIDSMYDINGVECVSTFVARYTDHFTDPLSFTP
PhLant1_Luc_(transcrip) NIMFCSKKALPLILRVQKNLSFIKKVVVIDSMYDINGIECVSTFVSRYTDHFTDPLNFTP
pC-PhLat             TIMFSSKKALPLILRVQQNLSFIKKVVVIDSMYDINGVECVSTFVARYTDHFTDPLSFTP
PxGR                 TIMFSSKKALPLILRVQQNLSFIKKVVVIDSMYDINGVECVSTFVARYTDHFTDPLSFTP

      190     200     210     220     230     240
Ph Lateral_(inativa)  KDFDPLEKIALIMSSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTVPQTSILSLVPF
PhLant1_Luc_(transcrip) KDFDPIEKIALIMSSSGTTGLPKGVILSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTIPQTSILSLVPF
pC-PhLat             KDFDPLEKIALIMSSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRNPYIGTRTVPQTSILSLVPF
PxGR                 KDFDPLEKIALIMSSSGTTGLPKGVVLSHRSLTIRFVHSRDPYIGTRTVPQTSILSLVPF

      250     260     270     280     290     300
Ph Lateral_(inativa)  HHAFGMFTTLSYFVVGLKVMLKKFEGALFLKTIQNYKIPTIVVAPPVMVFLAKSPLVDQ
PhLant1_Luc_(transcrip) HHAFGMFTTLSYFVVGLKIVMLKKFEGELFLKTIQNYKIPTIVVAPPIMVFLAKSPLVDK
pC-PhLat             HHAFGMFTTLSYFVVGLKVMLKKFEGALFLKTIQNYKIPTIVVAPPVMVFLAKSPLVGQ
PxGR                 HHAFGMFTTLSYFVVGLKVMLKKFEGALFLKTIQNYKIPTIVVAPPVMVFLAKSPLVDQ

      310     320     330     340     350     360
Ph Lateral_(inativa)  YDLSSLTEVATGGAPLKGDVAAEAVAKRRLKPGIIQGYGLTETCCAVMITPHNAVKTGSTG
PhLant1_Luc_(transcrip) YDLSSLREVATGGAPLKGDVGEAVAKRRLNLTGIIQGYGLTETCCAVIITPHNAKLTGSAG
pC-PhLat             YDLSSLTEVATGGAPLKGDVAAEAVAKRRLKPGIIQGYGLTETCCAVMITPHNAVKTGSTG
PxGR                 YDLSSLTEVATGGAPLKGDVAAEAVAKRRLKPGIIQGYGLTETCCAVMITPHNAVKTGSTG

      370     380     390     400     410     420
Ph Lateral_(inativa)  RPLPYIKAKVLDNATGKALGPGERGEICFKSEMIMKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDI
PhLant1_Luc_(transcrip) RVVPYVKAKILDKATGKALGPRERGEVCFKSEMIMKGYNNPQATLESIDEDGWLHSGDI
pC-PhLat             RPLPYIKAKVLDNATGKALGPGERGEICFKSEMIMKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDI
PxGR                 RPLPYIKAKVLDNATGKALGPGERGEICFQSEMIMKGYNNPEATIDTIDKDGWLHSGDI

      430     440     450     460     470     480
Ph Lateral_(inativa)  GYYDEDGNFFIVDRKELIKYKGYQVAPAELENLLQHPSIADAGVTGVPDEFAGQLPAA
PhLant1_Luc_(transcrip) GYYEENGDFYIVDRKELIKYKGYQVAPAELENLLQHDPIDAGVTGIPDEFAGQLPAA
pC-PhLat             GYYDEDGNFFIVDRKELIKYKGYQVAPAELENLLQHPSIADAGVTGVPDEFAGQLPAA
PxGR                 GYYDEDGNFFIVDRKELIKYKGYQVAPAELENLLQHPSIADAGVTGVPDEFAGQLPAA

      490     500     510     520     530     540
Ph Lateral_(inativa)  CVVLESKTLTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKGPTGKLIKRELREIFAQRA
PhLant1_Luc_(transcrip) CVVLEPGKTMTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKGPTGKLIKRELRAIFAQRD
pC-PhLat             CVVLESKTLTEKEVQDFIAAQVTPTKRLRGGVVFVDSIPKGPTGKLIKRELREIFAQRA
PxGR                 CVVLESKTLTEKEVQDFIAAQVTPTKHLRGGVVFVDSIPKGPTGKLIKRELREIFAQRA

      550
Ph Lateral_(inativa)  PKSKLX----
PhLant1_Luc_(transcrip) AKSKL----
pC-PhLat             PKSKL----
PxGR                 PKSKL----

```

Figura 11. Alinhamento das sequencias de aminoácidos das luciferases das lanternas laterais de *Phrixotrix hirtus*: **Ph_lateral (inativa)**: Publicada por Arnoldi *et al*, 2010. **PhLant1_Luc**: obtida em análise transcricional de Amaral *et al*, 2017. **pC-PhLat**: Subclonada para vetor pColdII nesse projeto; **PxGR**: luciferase das lanternas laterais de *Phrixotrix vivianii*.

Subclonagem do cDNA da luciferase de lanternas laterais de *Phrixotrix* em vetor pCold. Para obter uma melhor expressão dessa enzima em sua forma solúvel e ativa, e possibilitar purificar a enzima, realizamos a subclonagem em vetor pColdII que permite a expressão de proteína em baixas temperaturas (16-18°C). O sequenciamento confirmou a subclonagem e o inserto no sentido de leitura correto do vetor. A análise por digestão plasmidial utilizando a enzima de restrição SacI também mostrou o padrão de clivagem esperado para a sequência do gene referente a essa enzima inserido no vetor pColdII (Figura 12).

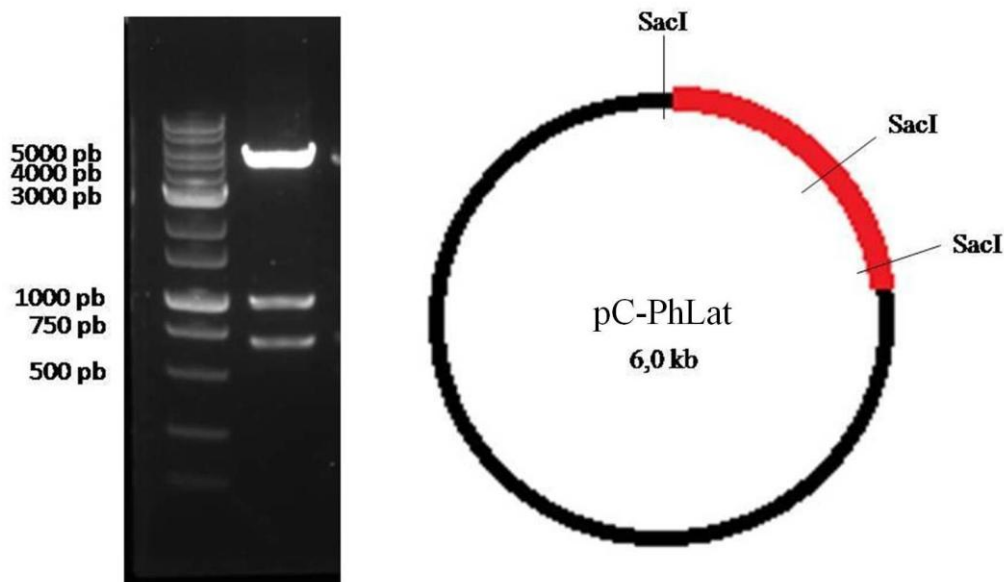


Figura 12. Gel de agarose com o padrão de peso molecular de DNA e o resultado da digestão plasmidial do vetor pColdII com o inserto da luciferase da lanterna lateral de *P. hirtus* (pC-PhLat) utilizando a enzima de restrição *Sac* I. Ao lado, uma representação da construção plasmidial pC-PhLat com a posição aproximada dos sítios de restrição da enzima *Sac* I.

De acordo com a sequência obtida, o gene que codifica a luciferase da lanterna lateral de *P. hirtus* apresenta 2 sítios de restrição para a enzima *Sac*I (GAGCTC) sendo um na posição 943 e outro na posição 1596. Já o vetor pColdII possui um sítio de clivagem para essa enzima em seu sítio de clonagem posicionado antes do ATG inicial

do inserto. A eletroforese da digestão plasmidial utilizando a enzima *SacI* mostrou os 3 fragmentos esperados de DNA, sendo o maior referente ao vetor pColdII com aproximadamente 4.3kbp, outro com aproximadamente 950 pb, e outro com aproximadamente 650 pb, confirmando a subclonagem.

Expressão e Purificação. A expressão desta enzima foi realizada com sucesso em bactérias *E.coli* BL21. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade com resina de níquel, esse método foi possível pela afinidade da cauda de histidina fundida a enzima recombinante. Na figura 13 é apresentado um gel SDS-Page com as amostras das etapas de purificação da luciferase. Análises de SDS-Page indicam que a purificação dessa enzima ocorreu de maneira satisfatória. Amostras da cultura antes e após a indução com IPTG (colunas 1 e 2 da figura 13) mostraram claramente a expressão de uma proteína com peso molecular de ~60 kDa, como esperado para a luciferase. A análise do gel, porém também indica que boa parte da proteína recombinante ficou retida no *pellet* (coluna 3 da figura 13), sugerindo uma baixa solubilidade para esta luciferase. Amostras da primeira passagem do extrato bruto pela coluna de níquel e também da lavagem (Figura 13: colunas 5 e 6) mostraram a retenção da proteína recombinante na resina de níquel. Por fim, as amostras dos eluatos e da amostra após a diálise (colunas 7, 8, 9, 10 e 11 da figura 13), indicam que os eluatos E1 e E2 contém uma concentração maior e mais limpa da luciferase recombinante.

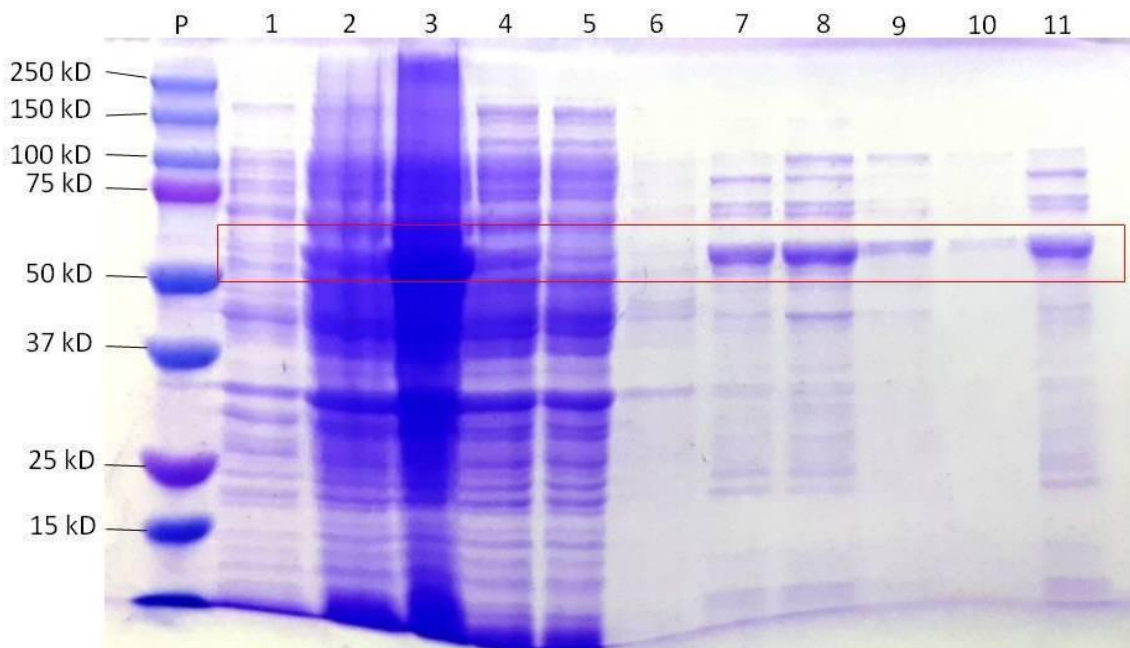


Figura 13. SDS-Page das etapas do processo de expressão e purificação da luciferase de lanternas laterais de *P.hirtus* pC-PhLat. **P)** Padrão de peso molecular BioRad; **1)** Cultura antes da indução com IPTG; **2)** Cultura após 16 h de indução com IPTG; **3)** Pellet; **4)** Extrato bruto; **5)** Primeira passagem pela resina de níquel; **6)** Lavagem; **7)** Eluato 1; **8)** Eluato 2; **9)** Eluato 3; **10)** Eluato 4; **11)** Eluato 1 após diálise. O destaque vermelho indica a posição da luciferase pC-PhLat no gel.

Espectros de bioluminescência. Os espectros de bioluminescência *in vitro* da luciferase das lanternas laterais de *P. hirtus* foram obtidos com ATP e luciferina e também com adenilato de luciferina. Na figura 14 são apresentados os espectros de bioluminescência dessa luciferase em diferentes faixas de pH e uma fotografia da reação bioluminescente captada em longa exposição.

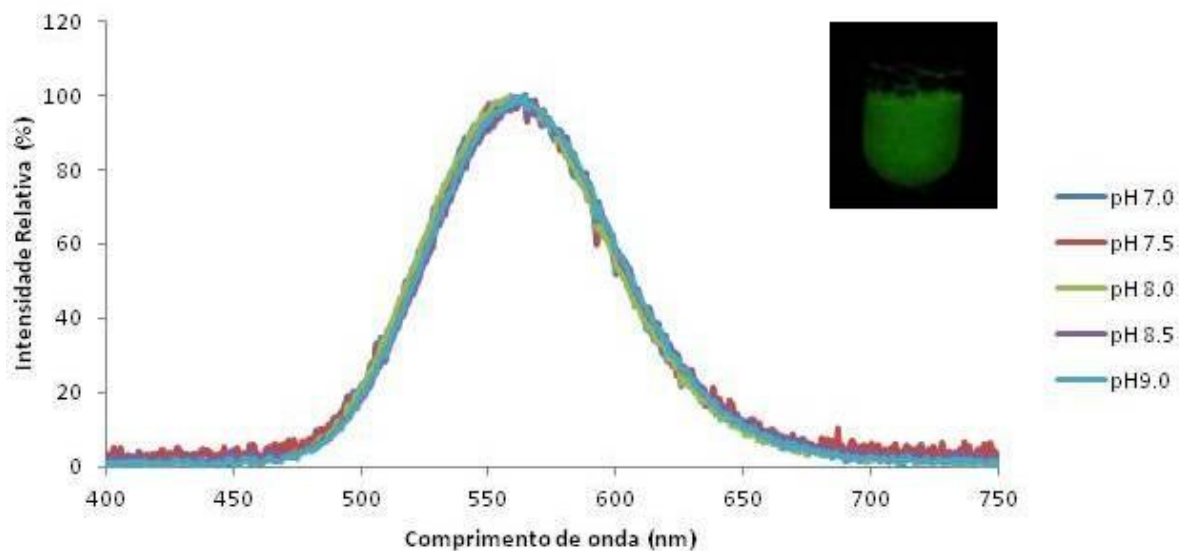


Figura 14. Espectros de bioluminescência da luciferase da lanterna lateral de *P. hirtus* em diferentes faixas de pH.

O espectro de bioluminescência desta luciferase apresenta um pico em 560 nm na reação com ATP e luciferina, e um pico em 563 nm na reação com adenilato de luciferina. Diferentemente da luciferase de *Brasilocerus* apresentada anteriormente, o pH da solução não afeta o pico e largura de banda do espectro de bioluminescência desta luciferase.

Em trabalhos anteriores Viviani e Bechara (1997), já haviam medido o espectro de bioluminescência das lanternas laterais dessa espécie *in vivo* e *in vitro* usando extratos brutos das lanternas. O espectro de bioluminescência da luciferase da lanterna lateral de *P. hirtus* obtido diverge dos resultados apresentados por Viviani e Bechara em apenas 3 nm nos ensaios *in vivo* e por 9 nm nos ensaios *in vitro*. Comparado com a luciferase da lanterna lateral de *P. vivianii* (549 nm), a luciferase da lanterna lateral de *P. hirtus* apresenta um espectro deslocado 11 nm para a região do vermelho, concordando com a cor mais amarelada da bioluminescência encontrada nesta espécie.

5.1.9. Propriedades cinéticas

Atividade bioluminescente. Ensaios *in vivo* com bactérias expressando essa luciferase apresentaram uma atividade extremamente baixa próxima do limite de detecção do luminômetro. Entretanto, as atividades bioluminescentes *in vitro* dos extratos brutos e das amostras purificadas, apesar de serem baixas ($\sim 5 \cdot 10^5$ cps), foram consideravelmente maiores após a diálise. Esse aumento de atividade é semelhante ao observado para a luciferase das lanternas laterais de *P. vivianii* (PxGR; VIVIANI *et al.*, 2006). Essa diferença na atividade antes e após a diálise pode ser explicada pelo efeito inibidor do imidazol presente no tampão de eluição, ou pelo efeito do DTT que rompe pontes dissulfeto no tampão de diálise, possivelmente ativando a enzima. Comparada com outras luciferases expressas em nosso laboratório, a atividade bioluminescente específica de $\sim 5,5 \cdot 10^9$ cps/mg é consideravelmente mais baixa quando comparada as luciferases de vagalumes lampirídeos *Macrolampis* sp2 e *Amydetes vivianii*, que apresentam $\sim 1,19 \times 10^{12}$ cps/mg e $\sim 8,90 \times 10^{11}$ cps/mg, respectivamente.

Ensaios com o produto da primeira reação da luciferase e substrato da segunda reação de oxidação, o adenilato de luciferina, revelaram uma atividade bioluminescente mais intensa quando comparada a atividade no ensaio usando luciferina e ATP, indicando que o primeiro passo da reação bioluminescente (a adenilação da luciferina com gasto de ATP) para esta luciferase tem uma constante catalítica menor do que a etapa de oxidação. Essa característica difere da luciferase selvagem emissora de luz vermelha de *P. vivianii*, que têm a atividade oxidativa menor do que a atividade específica com ATP e luciferina (BEVILAQUA *et al.* 2019).

Perfil cinético da reação bioluminescente. Os perfis da cinética da reação bioluminescente *in vitro* da luciferase da lanterna lateral de *P. hirtus* e de *Brasilocerus*

sp. com luciferina e ATP foram parecidos (Figura 15). Os resultados mostram uma cinética lenta para a reação bioluminescente de ambas as luciferases, tendo o seu pico de intensidade aproximadamente 45 segundos após o início da reação com um tempo de meia vida estimado em ~300 segundos para a reação iniciada com luciferina e ATP. Essas cinéticas são essencialmente semelhantes àquelas relatadas para a luciferase recombinante das lanternas laterais de *P. vivianii*. Por outro lado, a luciferase emissora de luz vermelha da cabeça de *P. hirtus* exibe uma cinética rápida alcançando o pico de intensidade logo no início da reação, e um rápido decaimento da atividade bioluminescente e tempo de meia vida de aproximadamente 10 segundos.

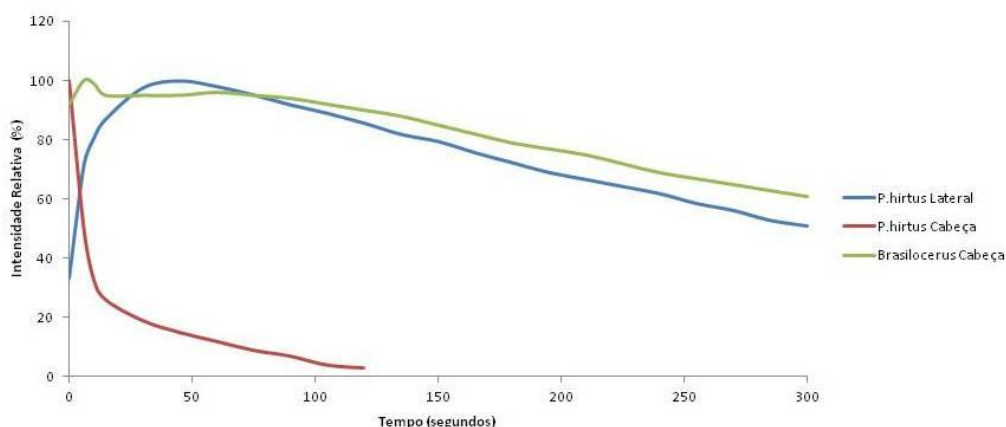


Figura 15. Gráfico da cinética da reação bioluminescente *in vitro* das luciferases das lanternas laterais de *Phrixotrix hirtus* (Linha azul), e lanternas da cabeça de *Brasilocerus* sp. (Linha verde) e de *Phrixotrix hirtus* (Linha vermelha).

K_M s para os substratos. Comparando com as luciferases das lanternas laterais de *P. vivianii* (PxGR) e da lanterna emissora de luz vermelha da cabeça de *P. hirtus* (PhRE), é possível notar que o K_M para o substrato luciferina das novas luciferases de lanternas laterais aqui apresentadas, é bem maior do que para a luciferase da lanterna cefálica de *P. hirtus* emissora de luz vermelha, indicando uma menor afinidade do que na luciferase vermelha. Entretanto, apesar da afinidade por ATP ser parecida a das

luciferases do gênero *Phrixotrix*, é consideravelmente menor do que o valor obtido para a luciferase das lanternas laterais de *Brasilocerus* sp.

A Tabela 5 sumariza as características cinéticas e de bioluminescência obtidas com as luciferases das lanternas laterais de *Brasilocerus* sp. e *P. hirtus* comparativamente com outras luciferases de fengodídeos.

Tabela 5. Propriedades cinéticas e espectrais das luciferases das lanternas da cabeça de *Brasilocerus* sp. e *P. hirtus* e das luciferases das lanternas laterais de *P. hirtus* e *P. vivianii*.

| Luciferase | K_M LH2 (μ M) | K_M ATP (μ M) | Tempo meia vida (s) | λ_{max} (nm) |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|
| <i>Brasilocerus</i> sp (cabeça) | ~125 | ~500 | ~325 | 566 [87] |
| <i>P. hirtus</i> (cabeça) | 7 | 230 | ~10 | 626 [82] |
| <i>P. hirtus</i> (lateral) | ~45 | ~260 | ~300 | 563 [88] |
| <i>P. vivianii</i> (lateral) | 64 | 330 | ~500 | 558 [89] |

5.1.10. Efeito de mutações nos espectros e propriedades cinéticas na luciferase lateral de *P. hirtus*

Para melhor entendermos a tão discutida relação entre estrutura das luciferases e espectros de bioluminescência, realizamos também algumas mutações sítio-dirigidas nas luciferases clonadas.

R215T. A mutação sítio-dirigida R215T foi realizada para avaliar qual o efeito da treonina nesta posição, uma vez que nesta posição existe uma arginina invariável nas luciferases de besouros (BRANCHINI *et al.*, 2001; VIVIANI; OHMIYA, 2000), entretanto a sequência da luciferase publicada por Arnoldi *et al.* (2010) possui uma treonina nessa posição, sendo que a enzima não apresentava atividade luminescente.

Além disto, é sabido que a Arg215 em luciferases de besouros é importante para determinar o espectro de emissão, sendo que a mutação R215S na luciferase emissora de luz verde das lanternas laterais de *P. vivianii* (PxGR) deslocou o espectro ~30 nm em direção ao vermelho e diminuiu consideravelmente a atividade bioluminescente, enquanto na luciferase vermelha da cabeça de *P. vivianii* (PxRE) essa mesma mutação teve pouco efeito (VIVIANI; OHMIYA, 2000).

Ensaio com os extratos brutos desta luciferase mutante mostraram uma atividade muito baixa com luciferina e ATP. Quando o extrato foi testado com o produto da primeira reação de adenilação, adenilato de luciferina, essa atividade luminescente foi consideravelmente maior. Estes resultados confirmam que esta posição 215 é crucial para a atividade luminescente, principalmente para a etapa de adenilação da luciferina.

Apesar da baixa atividade do mutante R215T com luciferina e ATP, foi possível obter seu espectro de bioluminescência tanto com ATP e luciferina como com adenilato de luciferina. O efeito da mutação R215T no espectro de bioluminescência acarretou um deslocamento de ~30 nm para a região do vermelho, semelhantemente ao efeito da mesma mutação na luciferase das lanternas laterais do parente próximo *P. vivianii*. Os espectros de bioluminescência desse mutante e da luciferase selvagem são apresentados na figura 16.

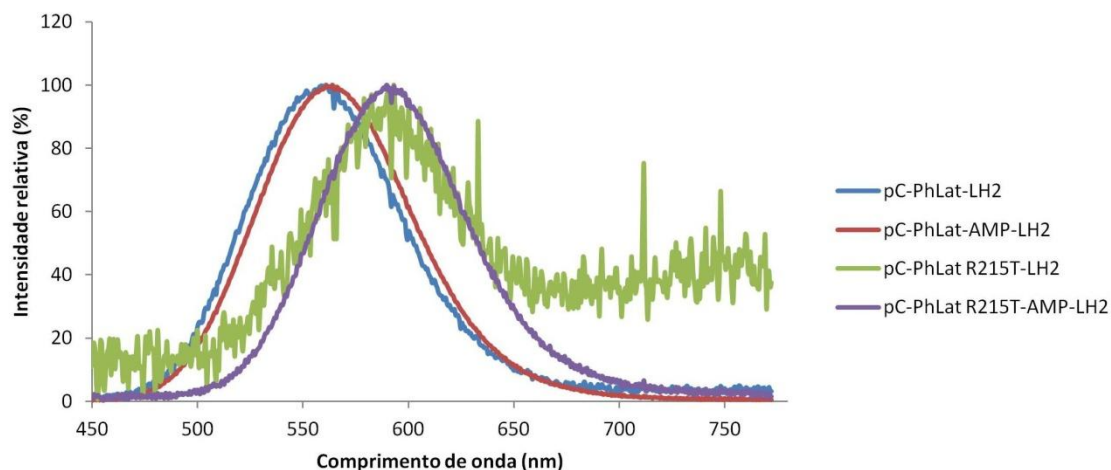


Figura 16. Espectros de bioluminescência da luciferase selvagem das lanternas laterais de *P. hirtus* (pC-PhLat) e do mutante R215T: (azul) pC-PhLat com luciferina (560 nm); (vermelho) pC-PhLat com adenilato de luciferina (563 nm); (verde) mutante R215T com luciferina e ATP (590 nm) e (roxo) mutante R215T com adenilato de luciferina (589 nm).

5.1.11. Mutações no loop 351-360 na luciferase emissora de luz vermelha

O multi-alinhamento de sequências de luciferases com o algoritmo ClustalW exibe um gap na posição 351 das luciferases de lanternas laterais de *Phrixotrix*, onde nas luciferase emissora de luz vermelha está um resíduo de asparagina (Figura 17). Desde a clonagem das luciferases emissoras de luz verde e vermelha de *Phrixotrix* (VIVIANI; BECHARA; OHMIYA, 1999), já se conhecia essa diferença. No entanto, no alinhamento sem a sequência da luciferase cefálica de *P. hirtus*, obtida por transcriptoma neste trabalho, o gap apareceu na posição 353 onde nas luciferases emissoras de luz vermelha está um resíduo de arginina. Trabalhos anteriores já investigaram essa região da enzima, Viviani *et al.* (2007) realizaram a deleção da arginina 353 da luciferase PxRE e não tiveram grandes mudanças no espectro de bioluminescência. Bevilaqua *et al.* (2019), também realizaram mutações nessa região da luciferase PxRE, substituindo a asparagina 351 e a arginina 353 por outros resíduos, mas essas substituições únicas também não causaram efeitos significativos na determinação espectral da luciferase.

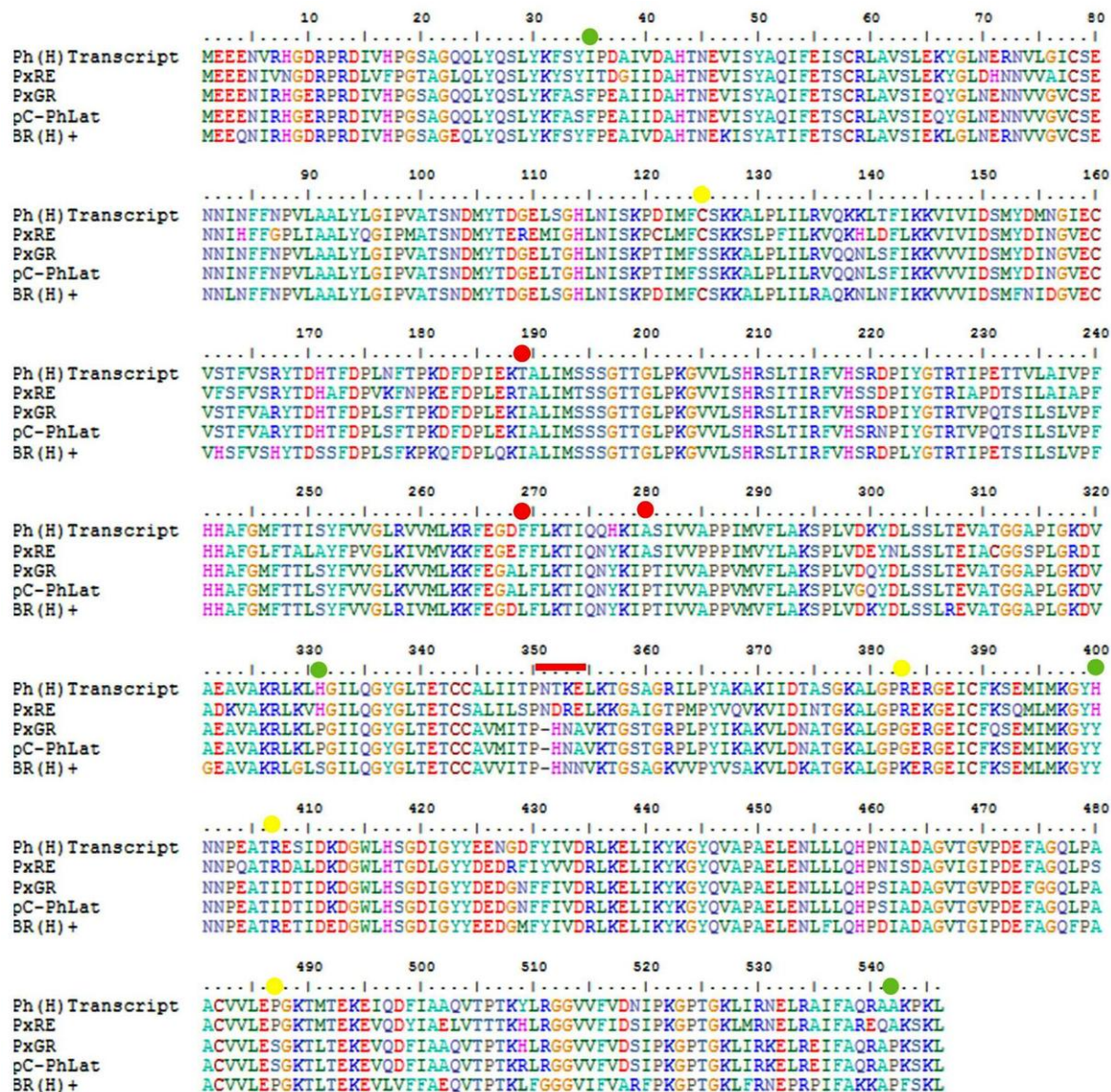


Figura 17. Multi -alinhamento das seqüências primárias das luciferases de fengodídeos exibindo o gap na posição 351 (linha vermelha) onde nas luciferases das lanternas da cabeça de *Phrixotrix* está presente um resíduo de asparagina. Os pontos vermelhos indicam as posições analisadas nesta tese; Os pontos amarelos indicam posições que podem ser investigadas futuramente e os pontos verdes indicam posições com alguma diferença entre as seqüências, porém com menor chance de causar efeitos na determinação espectral.

Considerando que apenas a deleção de R353 e as mutações N351E, N351C e R353E foram realizadas em PxRE, realizamos novas mutações pontuais e múltiplas envolvendo outras partes deste loop para testar possíveis posições chaves da determinação espectral e assim contribuir para os estudos de estrutura e função das luciferases de fengodídeos.

A deleção única do resíduo de asparagina 351 na luciferase PxRE também não alterou significativamente o espectro de bioluminescência. No entanto, a inserção desse resíduo na luciferase pC-PhLat causou um deslocamento batocrômico de ~36 nm.

Além disto, mutagêneses múltiplas no loop 351-354 (destacado em vermelho na figura 17) foram planejadas para alterar a sequência do loop 351NDRE354 na luciferase PxRE. pela sequência 351delHNA354 que está presente no mesmo loop nas luciferases de lanternas laterais de fengodídeos. Porém essa alteração não causou um deslocamento significativo no espectro de bioluminescência na luciferase PxRE, indicando que esse loop não é, por si só, um determinante espectral para essa luciferase. A mutação inversa, planejada para a luciferase pC-PhLat, não foi confirmada por sequenciamento e portanto não foi possível medir o espectro de bioluminescência.

Outras mutações. Considerando que há uma clara diferença nas sequências das luciferases das lanternas laterais e as cefálicas (destaques vermelhos na figura 17) nas posições 280, 269 e 189, de ambas as luciferases (PxRE e pC-PhLat), foram realizadas mutagêneses nestas posições.

A prolina presente na posição 280 das luciferases das lanternas laterais poderia afetar o estado de tensão da enzima em sua estrutura terciária e, conseqüentemente, seu espectro de emissão. Na posição 269 foram feitas as mutações F269L e L269F que altera o volume do resíduo, enquanto na posição 189 realizamos uma mudança de polaridade dos resíduos com as mutações I189T e T189I. Entretanto essas mutações também não deslocaram significativamente os espectros de bioluminescência. Os espectros de bioluminescência dos mutantes são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Picos dos espectros de bioluminescência dos mutantes de luciferases das lanternas laterais (pC-PhLat) e cefálicas (PxRE) de *P. hirtus*.

| Mutante | λ_{max} [meia banda] (nm) |
|-------------------|--|
| PxRE K7 | 623 [82] |
| PxRE N351del | 623 [79] |
| PxRE A280P | 630 [70] |
| PxRE F269L | 629 [78] |
| PxRE I189T | 624 [76] |
| pC-PhLat K7 | - |
| pC-PhLat 351N ins | 598 [97] |
| pC-PhLat P280A | 563 [80] |
| pC-PhLat L269F | 561 [81] |
| pC-PhLat T189I | 559 [80] |

Embora essas posições não sejam, individualmente, determinantes do espectro de bioluminescência, não se pode descartar a possibilidade de haver algum efeito sinérgico de diversas mutações combinadas entre si. A construção de mutantes com mais de uma mutação nessas regiões poderá trazer informações importantes sobre essa hipótese.

5.1.12. Aspectos evolutivos das luciferases de fengodídeos

Compreender como ocorreu a evolução das luciferases de coleópteros é um desafio que ainda permanece em aberto, principalmente na família Phengodidae que foi a menos estudada, com poucas luciferases clonadas até o momento. É particularmente importante se entender a origem das luciferases das lanternas laterais e das cefálicas, que em geral exibem cores de bioluminescência distintas. Além disto, é necessário entender se as luciferases de fengodídeos tem um ancestral em comum imediato com as

luciferases das demais famílias, Lampyridae e Elateridae, ou se se originaram independentemente a partir de ancestrais AMP/CoA-ligases.

As primeiras investigações sobre as luciferases de fengodídeos revelaram as distintas isoenzimas luciferases presentes nas lanternas laterais e cefálicas do gênero *Phrixotrix*, que apresentam diferentes espectros de bioluminescência e características cinéticas (VIVIANI; BECHARA, 1993). A clonagem e caracterização dessas luciferases confirmaram se tratar de diferentes isoenzimas presentes nas lanternas laterais e da cabeça (VIVIANI *et al.*, 1999). O estudo de Arnoldi *et al.* (2010) mostrou que as luciferases da cabeça e das lanternas laterais de alguns gêneros na tribo Mastinocerini são codificadas por genes parálogos. Mais recentemente, Amaral *et al.* (2023) também identificaram dois genes distintos de luciferases (PhLuc1 e PhLuc2) na montagem parcial do genoma de *P. hirtus* (AMARAL *et al.*, 2023). Entretanto, até o momento, somente uma luciferase de origem cefálica nesta tribo foi clonada, havendo somente representantes de lanternas laterais, o que impede delinear as possíveis rotas evolutivas destas luciferases.

Com as novas sequências apresentadas nesta tese, juntamente com outras já conhecidas, foi realizada uma análise filogenética das luciferases de fengodídeos. Na figura 18 é apresentada uma árvore filogenética construída com as sequências das luciferases de fengodídeos e outras espécies próximas.

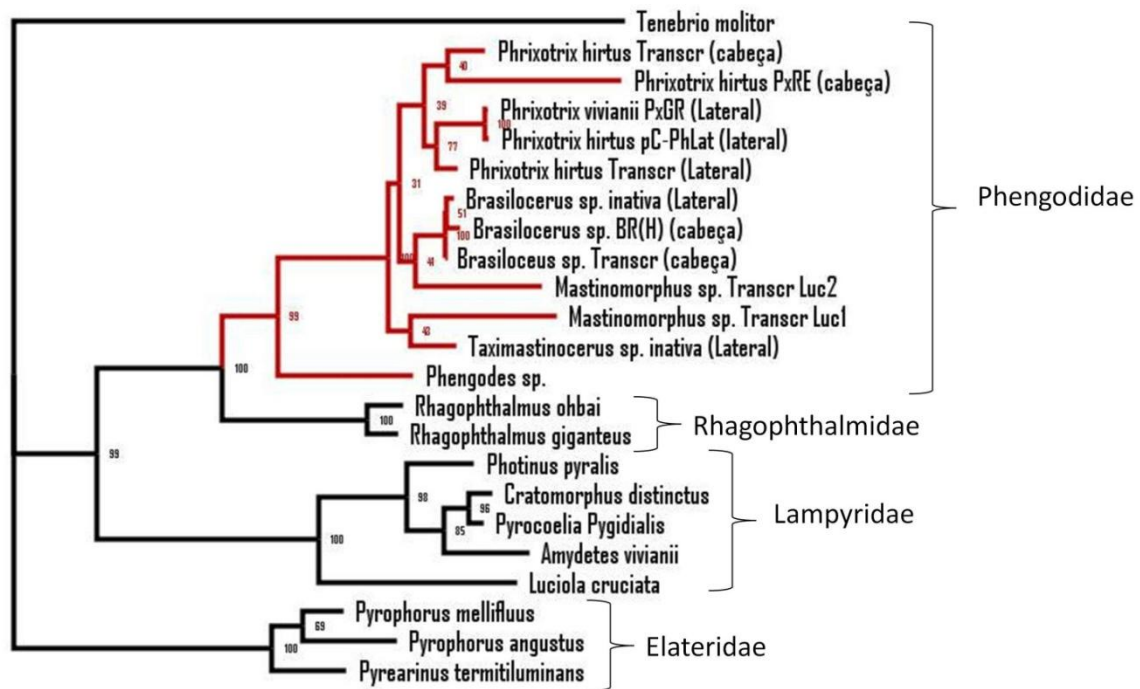


Figura 18. Filogenia molecular das luciferases pelo método da Máxima Verossimilhança usando a ferramenta IQ-Tree 2.1.1. O clado dos fengodídeos está destacado em vermelho.

Nessa árvore filogenética pode-se ver claramente a formação de clados monofiléticos entre as luciferases de espécies da mesma família de coleópteros, e também a relação próxima entre as luciferases das famílias irmãs Rhagophthalmidae e Phengodidae. Entre os fengodídeos (clado destacado em vermelho na figura 18), a luciferase de *Phengodes* sp. da tribo Phengodini (gentilmente concedida por Keith Wood e Monika Wood), aparece como mais basal na família Phengodidae. Ocorre também uma separação entre as luciferases oriundas do gênero *Phrixotrix*, onde existe a divisão entre luciferases cefálicas e das lanternas laterais, e sequências de outras espécies da tribo Mastinocerini. As luciferases de *Mastinomorphus* sp. (Luc1 e Luc2) ficaram separadas em dois clados distintos, a Luc1 mais próxima da luciferase de *Taximastinocerus* sp. e a Luc2 mais próxima das luciferases de *Brasilocerus* sp., esses resultados sugerem que mais de um evento de duplicação gênica possa ter ocorrido nos genes das luciferases da tribo Mastinocerini. Dessa maneira, eventos de duplicação

podem ter sido originados posteriormente a diversificação dos principais gêneros, tais como *Taximastinocerus* e *Phrixotrix*.

Arnoldi *et al.* (2010), baseados em estudos com as luciferases de lanternas laterais da tribo Mastinocerini isoladas por PCR, e sua comparação com a luciferase vermelha das lanternas cefálicas de *P. hirtus*, postularam que a luciferase ancestral em Phengodidae emitiria luz verde e que luciferases emissoras de luz vermelha seriam mais derivadas. Também sugeriram que um processo de duplicação gênica tenha ocorrido com o gene da luciferase ancestral dessa família durante a separação das tribos Mastinocerini e Phengodini, levando a evolução de isozimas das lanternas laterais e da cabeça (ARNOLDI *et al.*, 2010). No entanto os resultados aqui apresentados não corroboram totalmente com essa hipótese, desde que em algumas espécies apenas uma isoforma de luciferase é encontrada em ambas as lanternas laterais e cefálicas, e as novas sequências de luciferases da espécie *Mastinomorphus* sp. indicam que mais de um processo de duplicação gênica tenha ocorrido nas espécies da tribo Mastinocerini.

Os resultados dos espectros de bioluminescência de lanternas da cabeça e laterais de *Stenophrixotrix pallens*, e principalmente a ocorrência de uma única isoforma de luciferase no transcriptoma de lanternas da cabeça e nas lanternas laterais de *Brasilocerus* sp, praticamente idênticas (99%) àquela clonada a partir das lanternas cefálicas, sugerem que nestas espécies apenas uma isoforma seja encontrada nas lanternas laterais e cefálicas, e que portanto nem todas as espécies da tribo Mastinocerini possuem isoenzimas distintas nestas lanternas, diferentemente do que ocorre em larvas de *Phrixotrix* spp. Estudos transcricômicos e a clonagem da luciferase de *S. pallens* e de outras espécies podem auxiliar a resolver essa questão futuramente.

5.2. ESTUDOS SOBRE A BIOSÍNTESE DE LUCIFERINA

A origem evolutiva e a via de biossíntese da luciferina de coleópteros permanecem mistérios a serem desvendados. A elucidação desta via, além de importante para compreender a fisiologia da bioluminescência, é imprescindível para melhor compreensão da evolução do sistema bioluminescentes destes insetos. Nesta parte da tese são apresentados estudos sobre a síntese desse substrato, realizados em parceria com a pós-doutoranda Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva, onde sugerimos uma possível origem evolutiva da luciferina de coleópteros como subproduto da detoxificação de quinonas durante o processo de esclerotização.

5.2.1. Síntese de luciferina a partir de *p*-benzoquinona e cisteína

Em um artigo publicado em 2016 por Kanie *et al.* foi relatado a síntese espontânea de luciferina a partir de *p*-benzoquinona e cisteína em condições de pH neutro (KANIE *et al.* , 2016). Tanto o estereoisomero L- quanto o D- de cisteína reagem com *p*-benzoquina para a formação dos respectivos enantiômeros de luciferina. Essa formação pode ser acompanhada pela intensa fluorescência emitida pela luciferina formada quando exposta a radiação UV. Entretanto, apenas o enantiômero D-luciferina formado a partir de D-cisteína pode reagir com a luciferase para a produção de bioluminescência, demonstrando a enantioseletividade dessa enzima pelo seu substrato D-luciferina.

Nós reproduzimos estes resultados de síntese espontânea de luciferina usando a luciferase estável e brilhante de *Amydetes vivianii* como sensor de luciferina. Na figura 19 são apresentados os resultados desses experimentos. Apenas nos poços da coluna 3 é possível observar atividade bioluminescente resultante da mistura de *p*-benzoquinona com D-cisteína, na mistura com *p*-benzoquinona e L-cisteína (poços 5) não foi

detectada atividade bioluminescente. Conforme esperado para produção espontânea dos dois enantiômeros, a fluorescência (quadro “fluorescência” da figura 19) pode ser observada tanto nos poços com *p*-benzoquinona e D-cisteína, como nos poços com *p*-benzoquinona e L- cisteína (poços 3 e 5) quando irradiadas com uma fonte de luz UV. Entretanto a atividade bioluminescente ocorre só na mistura com o isômero D-cisteína já que o substrato da reação luminescente de coleópteros é sabidamente a D-luciferina.

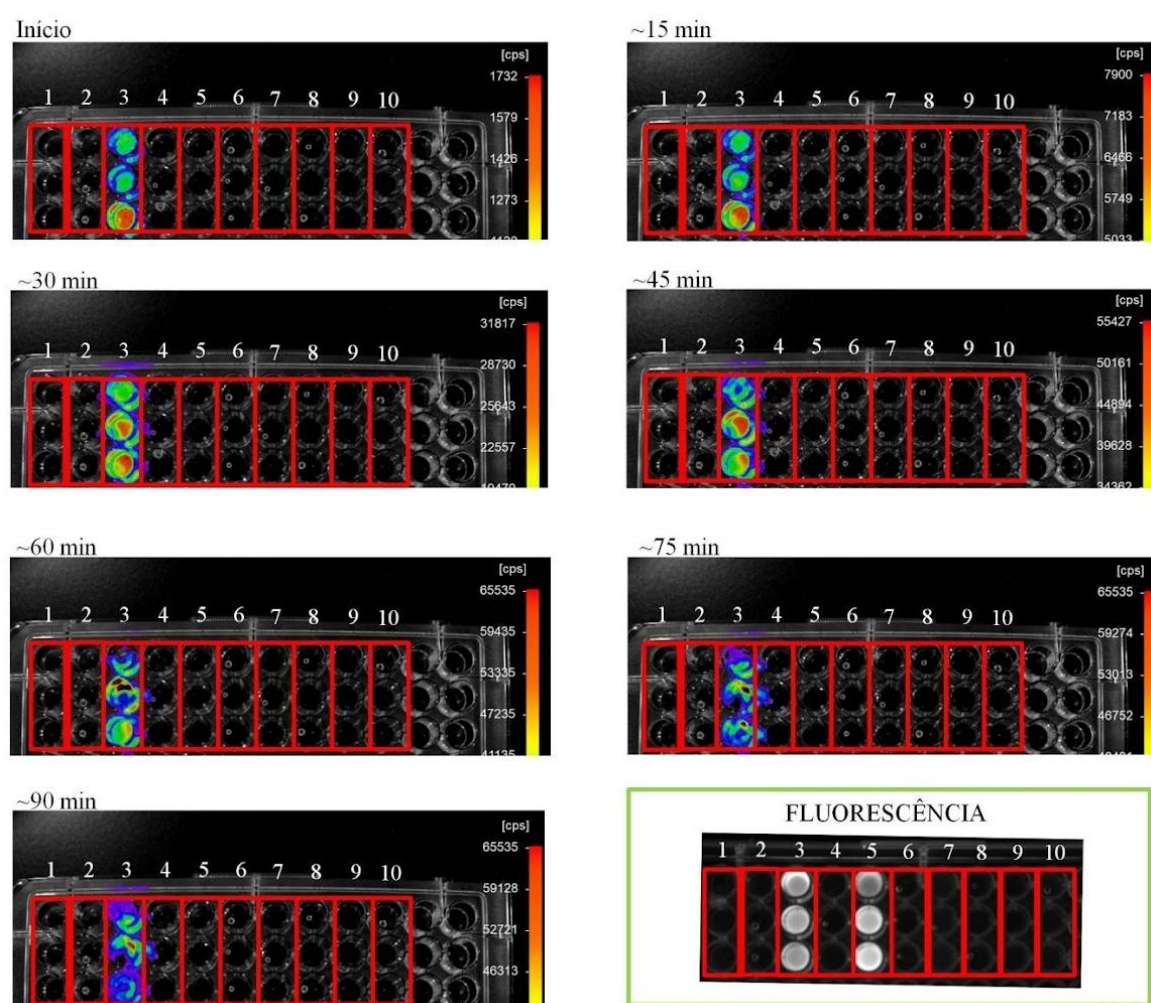


Figura 19. Imagens da bioluminescência da luciferase de *Amydetes* indicando a formação de luciferina nos poços contendo D-cisteína e *p*-benzoquinona (poços 3). No último quadro (FLUORESCÊNCIA) é apresentada uma imagem de fluorescência demonstrando a presença de luciferina nos poços contendo D-cisteína e *p*-benzoquinona (poços 3) e também nos poços contendo L-cisteína e *p*-benzoquinona (poços 5). Esse experimento demonstra a formação de ambos os enantiômeros de luciferina (D e L) e a enantioselctividade da luciferase pelo enantiômero D-luciferina.

Para reforçar a afirmação de que o produto gerado pela reação entre *p*-benzoquinona e cisteína é realmente luciferina, também realizamos uma cromatografia de camada fina (TLC) dos produtos das reações e de luciferina comercial (Promega). Os resultados dessa cromatografia indicam que o produto da reação tem o mesmo coeficiente de migração ($R_f = 0.35$) e a mesma cor de fluorescência da luciferina comercial. Esse experimento demonstra que a luciferina de vagalume pode ser gerada espontaneamente corroborando com os dados apresentados por Kanie *et al.*. Apesar disto, a via biossintética da luciferina dos vagalumes, incluindo todas as enzimas atuantes no processo, ainda permanece obscura, assim é importante simular a síntese *in vivo* ou na presença de enzimas candidatas.

5.2.2. Detecção da Síntese de luciferina *in vivo* em bactérias *E. coli* transformadas com o gene da luciferase de *Amydetes vivianii*

Cisteína e benzoquinona são compostos naturais produzidos por vários organismos, incluindo os insetos. É possível que nos estágios iniciais da evolução, a luciferina era produzida com baixo rendimento a partir de benzoquinona e cisteína, sendo que esse rendimento foi aumentado na presença de enzimas que catalisam as etapas da formação desse substrato em coleópteros (KANIE *et al.*, 2016).

A fim de investigar se a formação de luciferina ocorre em bactérias na presença destes precursores, utilizamos bactérias transformadas com o gene da luciferase de *Amydetes* immobilizadas em placa ELISA. A emissão de bioluminescência na presença de luciferase serve como indicador da biossíntese de luciferina. Assim, foi possível detectar a atividade bioluminescente em câmera CCD durante o processo de formação de luciferina a partir de *p*-benzoquinona e os dois enantiômeros D- e L-cisteína *in vivo*. Também testamos o efeito destes compostos isoladamente e em combinação na

viabilidade celular através da bioluminescência. Na figura 20 são apresentados os resultados desses experimentos.

Na imagem é possível observar a bioluminescência em ambos os poços com: D-cisteína e *p*-benzoquinona (D-cys+BQ) e com L-cisteína e *p*-benzoquinona (L-cys+BQ), entretanto a intensidade de bioluminescência foi bem menor e mais demorada para ser alcançada que no primeiro caso, indicando que, diferentemente do sistema *in vitro*, D-luciferina também é formada na presença de L-cisteína no sistema *in vivo* das bactérias. A enantioseletividade da luciferase de coleópteros pelo isômero D-luciferina para a reação bioluminescente já é bem conhecida (WHITE *et al.* 1961; VIVIANI, 2002; NIWA *et al.* 2006; KANIE *et al.* 2016). A bioluminescência, embora mais fraca, também nos poços contendo L-cisteína e *p*-benzoquinona indica que um processo de enantiomerização da forma L- para a forma D-luciferina está ocorrendo nas células de bactérias. Isso pode ser explicado com base em estudos anteriores que mostraram que a L-luciferina pode ser enantiomerizada na presença de luciferase, ATP, CoA e esterases (NIWA *et al.*, 2006). As bactérias *E. coli* possuem esterases endógenas que, juntamente com a luciferase expressa heterológamente e com coenzima-A, atuam nessa bioconversão do enantiomero inativo L-luciferina no enantiomero ativo, D-luciferina, explicando a emissão mais fraca e mais lenta do que na presença da D-cisteína.

5.2.3. Viabilidade celular na presença de benzoquinona e cisteína

Como esperado, nos poços que continham apenas cisteína (D-cys+H₂O e L-cys+H₂O), assim como nos poços contendo apenas *p*-benzoquinona (BQ+ H₂O) não foi detectado nenhum sinal luminoso no período de 2 horas de exposição das bactérias aos compostos. Após a análise de viabilidade celular é interessante notar que a *p*-

benzoquinona tem um efeito tóxico nas células, mas isso não acontece quando *p*-benzoquinona está na presença de cisteína.

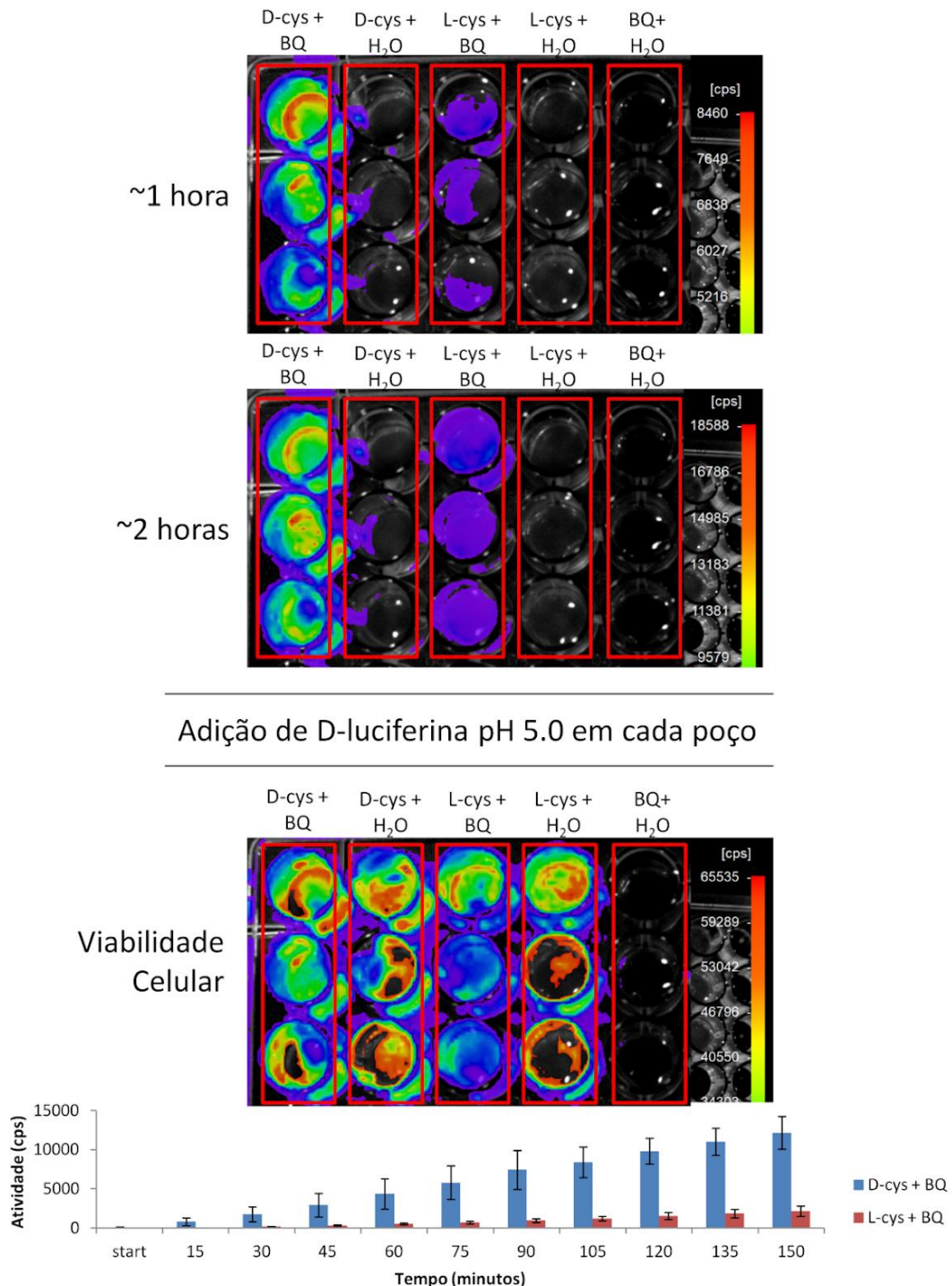


Figura 20. Síntese de luciferina em bactérias expressando a luciferase de *Amydetes* imobilizadas em placa ELISA mediante administração de cisteína e *p*-benzoquinona, e análise da viabilidade das células por bioluminescência após o ensaio. Tratamentos: 1) D-cisteína + *p*-benzoquinona; 2) D-cisteína + H₂O; 3) L-cisteína + *p*-benzoquinona; 4) L-cisteína + H₂O; 5) *p*-benzoquinona + H₂O. Após o experimento foram adicionados 10 µL de D-luciferina 1 mM pH 5.0 em cada poço da placa para analisar a viabilidade celular.

Ao final do experimento acima, quando a viabilidade celular foi analisada por bioluminescência (indicador de ATP e viabilidade celular), adicionando D-luciferina em pH 5.0, as células dos poços contendo apenas *p*-benzoquinona não apresentaram bioluminescência indicando a letalidade desse composto para as bactérias. Notavelmente, as células que foram expostas a mesma concentração de *p*-benzoquinona, mas na presença de cisteína, emitiram bioluminescência, indicando que não perderam a viabilidade celular. Estes resultados sugerem fortemente que a cisteína atua naturalmente num processo de detoxificação de benzoquinonas.

Para melhor avaliar a toxicidade de benzoquinona nas bactérias, foi realizado também um teste com diferentes concentrações de *p*-benzoquinona (0 – 3.6 mM) em bactérias imobilizadas e transformadas com o gene da luciferase de *Amydetes*, para avaliar a concentração máxima de benzoquinona tolerável pelas bactérias. Isto permitiu analisar a viabilidade celular após 2 horas de exposição a *p*-benzoquinona. Na figura 21 são apresentados os resultados desse experimento.

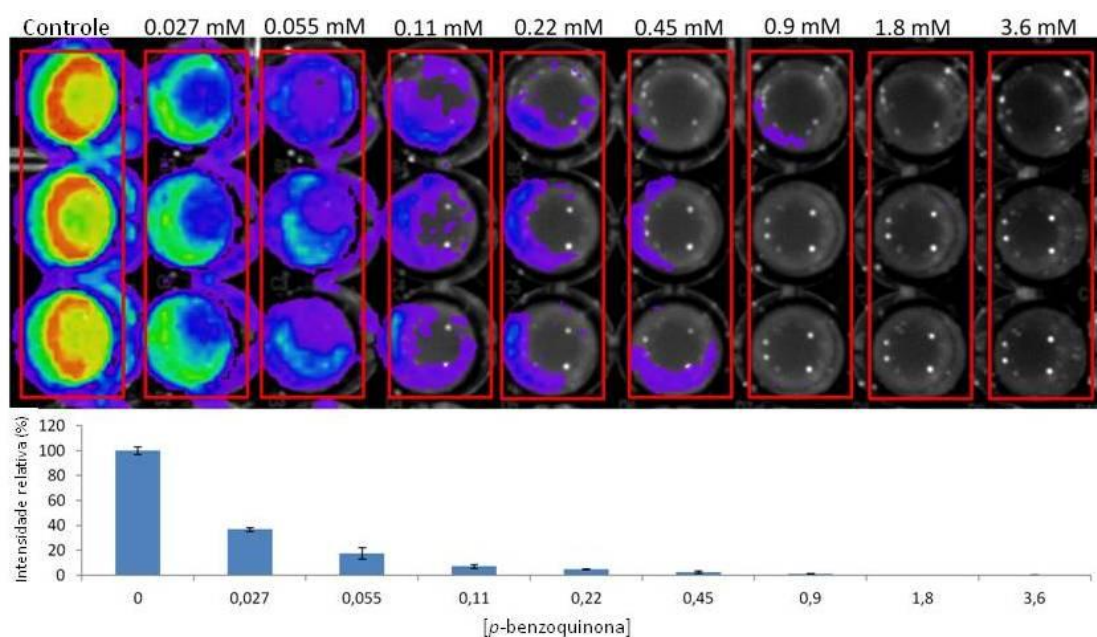


Figura 21. Teste de toxicidade de *p*-benzoquinona em bactérias expressando luciferase de *Amydetes* expostas a diferentes concentrações de *p*-benzoquinona (concentrações finais anotadas na parte de cima da imagem). A primeira coluna representa o controle sem a presença de *p*-benzoquinona. A viabilidade celular foi registrada pela bioluminescência após adição de luciferina 1 mM pH 5.0 nos poços analisados.

Os resultados indicam que a partir de 0.22 mM de *p*-benzoquinona já é possível observar uma perda considerável da viabilidade celular, em 0.45 mM quase não há atividade bioluminescente e em concentrações mais altas as células perdem totalmente a viabilidade. Mesmo na concentração mais baixa de *p*-benzoquinona (0.027 mM) já é observada uma perda de viabilidade quando comparado com o controle. Os resultados indicam uma IC₅₀ (concentração que inibe em 50% a atividade bioluminescente) de ~25 μM para *p*-benzoquinona.

Já na presença de cisteína, as células se mantiveram viáveis mesmo em alta concentração de *p*-benzoquinona (3.6 mM). A benzoquinona nos organismos é sabidamente tóxica, podendo gerar espécies reativas de oxigênio e podendo reagir com grupos nucleofílicos de proteínas como enzimas, inativando-as. Sua presença exige mecanismos de detoxificação para que não haja prejuízos às células. A síntese de luciferina dependente de cisteína e *p*-benzoquinona parece atuar como um mecanismo eficiente para neutralizar o efeito tóxico da benzoquinona.

Assim, os resultados apresentados aqui sugerem, pela primeira vez, que a formação de luciferina dependente de cisteína pode ter atuado como uma via alternativa de detoxificação de benzoquinonas em coleópteros, nos primeiros estágios evolutivos do sistema bioluminescente.

5.2.4. Participação da hidroquinona, dopamina e lacase na síntese da luciferina

Como demonstrado, a luciferina pode ser biossintetizada a partir de cisteína e benzoquinona. Em besouros, benzoquinonas e outras quinonas são encontradas abundantemente nas vias de melanização e esclerotização. Os precursores da benzoquinona são a hidroquinona e a DOPA, que podem ser oxidados às respectivas quinonas por fenoloxidasas como a lacase. A lacase 2, que é uma enzima chave para a

via de esclerotização em besouros, já foi proposta para participar das vias biossintéticas da luciferina (KANIE *et al.*, 2016; OBA *et al.*, 2013; VIVIANI *et al.*, 2013; VONGSANGNAK *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2020; DAY *et al.*, 2004). Assim, a fim de investigar o envolvimento de lacase na via biossintética de luciferina, a pós-doutoranda Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva realizou ensaios de oxidação espontânea e catalisada de hidroquinona e dopamina.

Em pH fisiológico (7,5) tanto a hidroquinona quanto a dopamina na presença de cisteína formam espontaneamente luciferina. Em pH 7,5, a hidroquinona se oxida espontaneamente a benzoquinona, que então reage com D-cisteína para produzir D-luciferina, emitindo intensa bioluminescência ao se misturar com a luciferase de vaga-lume e MgATP. A dopamina também sofre oxidação espontânea para produzir dopamina-quinona, que também pode reagir com D-cisteína, mas produzindo bioluminescência mais fraca, indicando que a dopamina é menos eficaz do que benzoquinona para produzir D-luciferina.

Em pH neutro, a oxidação da dopamina na presença de cisteína é conhecida por produzir também os intermediários cisteinildopamina e dihidrobenzotiazina (ZHANG; DRYHURST, 1994; SHEN; ZHANG; DRYHURST, 1997). Para investigar se a enzima lacase participa da formação de D-luciferina utilizando a hidroquinona como substrato, também analisamos a bioluminescência produzida após a incubação hidroquinona e cisteína com lacase em pH 6,5, que é o pH ótimo da lacase comercial com hidroquinona. A reação da hidroquinona e D-cisteína na presença de lacase produziu bioluminescência consideravelmente maior do que a reação de controle na ausência de lacase, indicando a provável participação da lacase na biossíntese da luciferina a partir das benzoquinonas. A formação de luciferina nessas reações de quinonas e cisteína também foi confirmada por TLC e fluorescência das amostras sob irradiação de luz UV.

5.2.5. Possível relação entre a esclerotização/melanização e a síntese de luciferina

Com os resultados obtidos nos estudos sobre a formação de luciferina, juntamente com análises transcriptômicas realizadas por nosso grupo de pesquisa, sugerimos que a formação de luciferina pode estar relacionada com o processo de esclerotização/melanização dos vagalumes, com a possibilidade de haver uma ligação comum entre essas vias metabólicas (Figura 22).

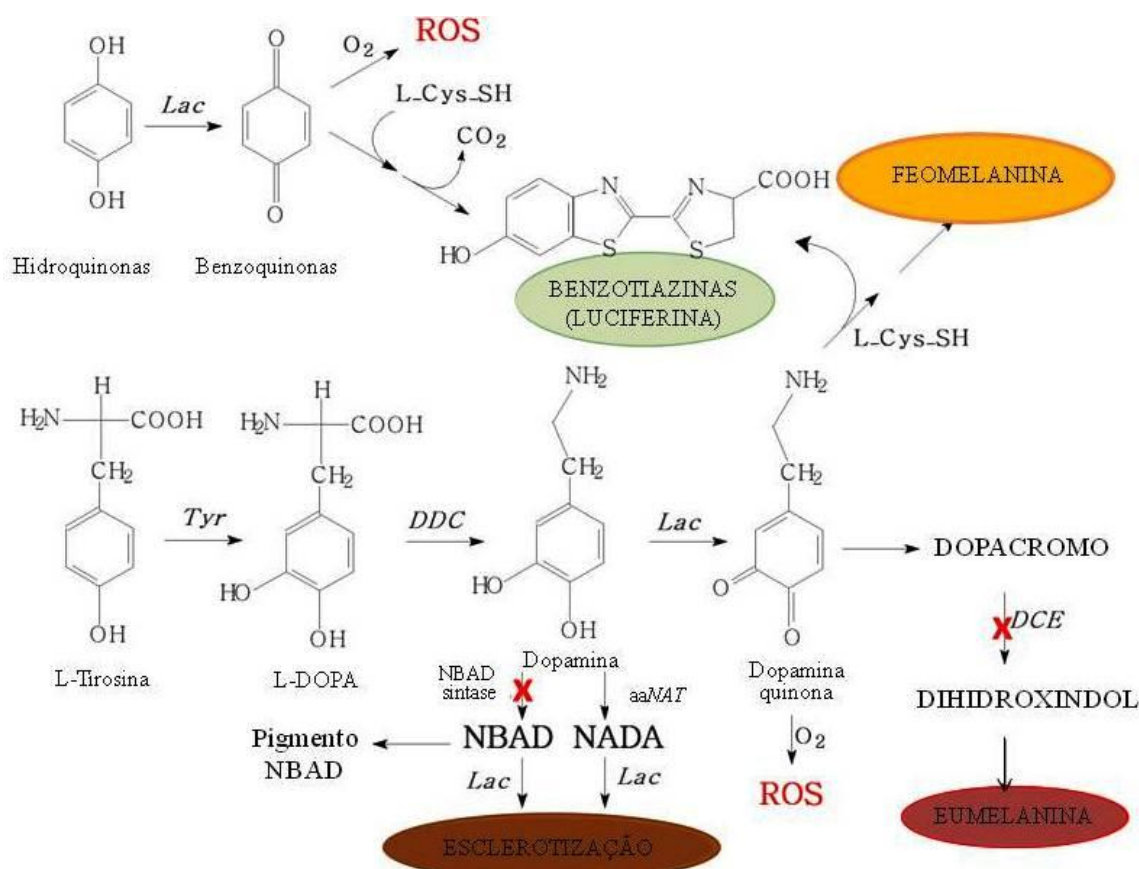


Figura 22. Proposição da biossíntese de luciferina como uma rota alternativa de desintoxicação de quinonas dependente de cisteína, a partir das rotas de esclerotização e melanização de coleópteros. Os “X” em vermelho indicam vias deficientes em enzimas que podem levar a toxicidade por quinonas. Tyr: tirosinase; Lac: lacases; DDC: dopa descarboxilase; aaNAT: dopamina N-acetil transferase; DCE dopacromo isomerase. Fonte: (SOUZA *et al.*, 2022).

Compostos benzotiazólicos são encontrados na natureza em melaninas, tiamina e antibióticos, geralmente esses dois últimos não são sintetizados por eucariotos

superiores, sendo mais provável que nos insetos esses compostos tenham origem na melanogênese ou sejam adquiridos pela dieta (DAY *et al.*, 2004). A melanogênese envolve dois ramos principais: 1) a **eumelanogênese**, que utiliza aminas como grupos nucleofílicos, é responsável pela formação de eumelanina mais escura; 2) a **feomelanogênese** que utiliza cisteína para produzir feomelanina benzotiazólica (SOLANO, 2014).

A via biossintética da luciferina envolve cisteína e benzoquinonas, que também são precursoras nas vias de esclerotização da cutícula e melanização. Na presença de cisteína, quinonas de diferentes origens como a hidroquinona, armazenada como glicosídeo arbutina (OBA *et al.*, 2013), o ácido benzoquinona acético formado a partir da degradação de tirosina (ZHANG *et al.*, 2020), ou quinonas intermediárias da via de pigmentação/esclerotização como DOPA-quinona (DAY *et al.*, 2004), produzem benzotiadiazinas, como a luciferina de vagalumes.

Realizamos uma revisão dos dados transcriptômicos de lanternas de vagalumes e tecidos não bioluminescentes realizados por nosso grupo de pesquisa (AMARAL *et al.*, 2017a, 2017b, 2019; SILVA *et al.*, 2019), para entender melhor o possível envolvimento de transcritos relacionados às vias de esclerotização/melanização com a síntese de luciferina.

Em besouros, a síntese de melanina e a esclerotização partem do metabolismo de tirosina, esse processo envolve precursores comuns, incluindo intermediários de quinona. A hidroxilação da tirosina pela enzima tirosina didroxilase produz DOPA, essa é convertida em dopamina pela enzima DOPA descarboxilase. Fenoloxidasas, como as laccases, catalisam a oxidação de DOPA e dopamina às suas quinonas correspondentes e essas quinonas são convertidas em dopacromo ou dopamina-cromo que são então convertidos em 5,6-dihidroindol pela dopacromo isomerase, e finalmente sua oxidação

e polimerização produzem pigmentos semelhantes à melanina (SUGUMARAN, 2002; KLOWDEN, 2007; ANDERSEN, 2012; NOH *et al.*, 2016).

Quinonas são altamente reativas a grupos nucleofílicos de proteínas, como aminas de lisinas, grupos imidazol de histidinas e tióis de cisteínas durante a esclerotização. A dopamina também pode ser N-acetilada a N-acetildopamina (NADA) pela enzima N-acetiltransferase ou a N- β -alanildopamina (NBAD) pela NBAD sintetase, e essas catecolaminas podem ser oxidadas em suas quinonas correspondentes pelas fenoloxidasas. NADA-quinonas e NBAD-quinonas são finalmente utilizadas no processo de pigmentação e esclerotização (KLOWDEN, 2007; NOH *et al.*, 2016).

As enzimas tirosina hidroxilase, DOPA-descarboxilase, lacase 2 e dopamina N-acetiltransferase podem ser encontradas em todos os tecidos fotogênicos e não fotogênicos analisados, porém, sua abundância é comparativamente menor nesses tecidos do que os transcritos mais abundantes. A deficiência ou alterações na expressão de algumas dessas enzimas podem causar alterações na estrutura da cutícula e nos padrões de pigmentação (SHERALD, 1980; SUGUMARAN & BAREK, 2016; MUN *et al.*, 2020). A perda da dopacromo isomerase e da lacase 2 no coleóptero *Tenebrio molitor*, por exemplo, resulta em cutícula amarelada e branca, respectivamente (MUN *et al.*, 2020). Mutantes deficientes em NBAD-sintetase apresentam cutícula mais macia e escura. A explicação para esse fenótipo é que NBAD não é produzido e o excesso de dopamina resultante é direcionado à síntese de pigmento escuro (SUGUMARAM & BAREK, 2016).

Nas análises das lanternas de vagalumes, apesar de encontrarmos transcritos supostamente envolvidos na produção de dopamina quinona e NADA quinona a partir de dopamina e NADA, que são intermediários da pigmentação/esclerotização, não foram encontrados transcritos semelhantes à dopacromo isomerase nem à enzima

NBAD sintetase. A ausência de dopacromo isomerase nesses tecidos sugere que a dopamina não é convertida em eumelaninas, enquanto a ausência de NBAD-sintetase indica que NBAD e seu produto quinona não são produzidos nos tecidos de besouros bioluminescentes. Na ausência de NBAD, pode ocorrer o acúmulo de dopamina e dopamina-quinona, a última causando potenciais efeitos citotóxicos, como a inativação de enzimas e estresse oxidativo por ROS (Figura 22). Além disso, a presença de laccase 2 e dopamina N-acetiltransferase, e a ausência de dopacromo isomerase e NBAD-sintetase em lanternas de vagalumes podem explicar a coloração mais clara e a cutícula mais macia encontrada nas regiões das lanternas, corroborando com nossa hipótese de que as lanternas primitivas surgiram das áreas mais translúcidas e menos esclerotizadas em larvas de vagalumes (VIVIANI *et al.*, 2008).

Trabalhos com dados transcriptômicos também mostraram que as lanternas de larvas e adultos de vagalumes exibem uma grande abundância de enzimas relacionadas ao metabolismo de cisteína, como a cistationina- β -sintase, que converte homocisteína em cistationina, e a cistationina- β -liase, que converte cistationina em L-cisteína, indicando que tecidos fotogênicos produzem uma grande quantidade de cisteína, que está diretamente envolvida na síntese de luciferina (VIVIANI *et al.*, 2013; AMARAL *et al.*, 2017a, 2017b, 2019; ZHANG *et al.*, 2020). Por outro lado, em tecidos de besouros não bioluminescentes, como os túbulos de Malpighi e corpo gorduroso de *Z. morio*, essas enzimas apresentam baixa abundância.

Desse modo, o metabolismo altamente ativo de cisteína nas lanternas e tecidos fotogênicos, juntamente com a falta de algumas enzimas envolvidas na via da esclerotização que podem gerar acúmulo de quinonas tóxicas, sugerem que a luciferina pode ter surgido como um produto secundário do metabolismo de quinonas nas vias de esclerotização.

Portanto, é possível que a origem da luciferina, na história evolutiva dos besouros, tenha sido inicialmente como produto da desintoxicação de quinonas acumuladas reagindo com cisteína durante a esclerotização desses besouros. Não surpreende que a maioria das famílias de besouros bioluminescentes como Phengodidae, Rhagophthalmidae e Lampyridae seja de corpo mole (antiga superfamília Malacodermata e Cantharoidea), consequência de uma esclerotização mais fraca. As exceções são os adultos de Elateridae de corpo duro, nos quais a bioluminescência aparece apenas nas regiões menos esclerotizadas do protórax e sob as áreas esclerotizadas do abdome que ficam expostas durante o voo.

6. CONCLUSÕES

Nesta tese aprofundamos o conhecimento sobre luciferases e evolução da bioluminescência de fengodídeos e coleópteros. Até pouco tempo, as únicas luciferases clonadas e investigadas eram aquelas de *Phengodes* sp. da tribo Phengodini e as luciferases emissoras de luz verde das lanternas laterais de *Phrixotrix vivianniii* e vermelha da cabeça de *Phrixotrix hirtus*.

Através do uso dos genes marcadores 16S e 18S rRNA, juntamente com os espectros de bioluminescência, conseguimos associar pela primeira vez a larva e adulto de uma espécie de fengodídeo, *Stenophrixotrix pallens*, que ocorre no campus da UFSCar de Sorocaba.

A presença de uma única luciferase no transcriptoma de lanternas da cabeça de *Brasilocerus* sp, bem como as sequencias idênticas das luciferases clonadas de lanternas laterais e da cabeça desta espécie indicam pela primeira que as larvas de algumas espécies de fengodídeos da tribo Mastinocerini podem apresentar apenas uma isoforma de luciferase nos dois tipos de lanternas. Isto é suportado também pela análise dos espectros *in vitro* idênticos de lanternas laterais e da cabeça de larvas de *Stenophrixotrix palles* que sugerem a presença de uma única isoenzima.

Clonamos as luciferases ativas que emitem luz verde-amarela, da cabeça de larvas de *Brasilocerus* sp e das lanternas laterais de *Phrixotrix hirtus*. As luciferases das lanternas laterais de *Phrixotrix hirtus* e *Brasilocerus* sp., apresentam uma cinética de luminescência lenta com elevados valores de K_{MS} para luciferina e ATP. A sequência da luciferase das lanternas *Phrixotrix hirtus* clonada aqui mostrou ser diferente das outras sequencias encontradas em transcriptoma da mesma espécie oriunda de localidade diferente (AMARAL *et al.*, 2017), indicando tratar-se de uma espécie diferente.

A mutação R215T na luciferase das lanternas laterais de *Phrixotrix hirtus* mostrou uma queda significativa na atividade luminescente da enzima com luciferina, além de um deslocamento no espectro de ~30 nm para a região do vermelho. A inserção de uma asparagina na posição 351, na luciferase emissora de luz verde-amarela das lanternas laterais de *P. hirtus*, causou um deslocamento batocrômico de ~36 nm, porém a mutação reversa (N351del) na luciferase da lanterna da cabeça não altera significativamente o espectro de bioluminescência, reforçando a hipótese de que a determinação espectral das luciferases de *Phrixotrix* é complexa e não pode ser explicada por substituições pontuais.

Os estudos sobre a síntese de luciferina a partir de cisteína e *p*-benzoquinona com bactérias *E.coli* transformadas com o gene da luciferase de *Amydetes vivianii*, sugerem pela primeira vez que a luciferina pode ter surgido como produto acidental de uma via alternativa de detoxificação de quinonas, geradas no processo de esclerotização/melanização, durante a evolução da bioluminescência em coleópteros.

7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F. *et al.* **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res.* V.25, p. 3389–3402, 1997.

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. *et al.* **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.

AMARAL, D. T.; SILVA, J. R.; VIVIANI, V. R. **Transcriptional comparison of the photogenic and non-photogenic tissues of *Phrixothrix hirtus* (Coleoptera: Phengodidae) and non-luminescent *Chauliognathus flavipes* (Coleoptera: Cantharidae) give insights on the origin of lanterns in railroad worms.** *Gene Reports*, v. 7, p. 78–86, 2017a.

AMARAL, D. T.; SILVA, J. R.; VIVIANI, V. R. **Transcriptomes from the photogenic and non-photogenetic tissues and life stages of the *Aspisoma lineatum* firefly (Coleoptera: Lampyridae): Implications for the evolutionary origins of bioluminescence and its associated light organs.** *Gene Reports*, v. 8, p. 150-159, 2017b.

AMARAL, D. T., SILVA, J. R. & VIVIANI, V. R. **RNA-Seq analysis of the bioluminescent and non-bioluminescent species of Elateridae (Coleoptera): comparison to others photogenic and non-photogenic tissues of Elateroidea species.** *Comp. Biochem. Physiol.* **29**, 154-165, 2019.

AMARAL, D. T. *et al.* **Genome analysis of *Phrixothrix hirtus* (Phengodidae) railroad worm shows the expansion of odorant-binding gene families and positive selection on morphogenesis and sex determination genes.** *Gene*, v. 850, 146917, 2023.

ANDERSEN, S. O. **Cuticular Sclerotization and Tanning** in *Insect Molecular Biology and Biochemistry* (ed. Gilbert, L. I.) p. 167-192 Academic Press, 2012.

ARNOLDI, F. G. C.; NETO, A. J. S.; VIVIANI, V. R. **Molecular insights on the evolution of the lateral and head lantern luciferases and bioluminescence colors in Mastinocerini railroad-worms (Coleoptera:Phengodidae).** *Photochemical & Photobiological Sciences*. V. 9, p. 87-92, 2010.

BEVILAQUA, V. *et al.* ***Phrixotrix* luciferase and 6'-aminoluciferins reveal a larger luciferin phenolate binding site and provide novel far-red combinations for bioimaging purposes.** *Scientific Reports*, 9:8998, 2019.

BITLER, B.; MCELROY, W. D. **Preparation and properties of firefly luciferin.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 72, n. 2, p. 358-368. 1957.

BRANCHINI, B. R. *et al.* **The role of active site residue arginine 218 in firefly luciferase bioluminescence.** Biochemistry, v. 40(8), p. 2410–2418, 2001.

CARRASCO-LOPEZ, C. *et al.* **Beetle luciferases with naturally red- and blue-shifted emission.** Life Science Alliance, v. 1, n. 4, 2018.

CARRASCO-LOPEZ, C. *et al.* **The elusive relationship between structure and colour emission in beetle luciferases.** Nature Reviews Chemistry 5, p. 4-20, 2021.

COSTA, C. *et al.* **Larvae of Neotropical Coleoptera. XXVII. *Phrixothrix hirtus* Olivier, 1909, descriptions of immatures, neotenic female, adult male and and bionomic data (Phengodinae, Phengodidae, Coleoptera).** Ilheringia. Ser. Zool. v. 86, p. 9-28, 1999.

DAY *et al.* **Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin.** Luminescence, 19, p. 8–20, 2004.

DELUCA M. **Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase.** Biochemistry, v. 8, p. 160-166, 1969.

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, Amsterdam, v. 1173, p. 121–132, 1993.

De WET, J. R., *et al.* 1985. **Cloning of firefly luciferase cDNA and expression of active luciferase in *Escherichia coli*.** Proceeding of the Nacional Academy of Sciences of the USA, v.82, n. 23, p. 7870-7873, 1985.

FALLON, T. R.; LI, F. S.; VICENT, M. A.; WENG, J. K.. **Sulfoluciferin is biosynthesized by a specialized luciferin sulfotransferase in fireflies.** *Biochemistry* 55, p. 3341–3344, 2016.

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.** Analytical Biochemistry 445, p. 72–78, 2014

GREEN, A. A.; MCELROY, W. D. **Cristalline firefly luciferase.** Biochimica et biophysica acta, v. 20, p. 170-176, 1956.

GRUBER, M.; KUTUZOVA G. D.; WOOD K. V.. **Cloning and expression of a *Phengodes* luciferase.** In Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons (Edited by J. W. Hastings, L. J. Kricka and P. E Stanley), pp. 244–247. Wiley & Sons, Chichester, UK, 1996.

GOMI, K.; KAJIYAMA, N. **Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regeneration into luciferin.** J. Biol. Chem. 276, p. 36508–36513, 2001.

HALL, T.A. . **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucleic Acids Symposium Series, V.41, p.95-98, 1999.

HADDOCK, S. H. D.; MOLINE, M. A.; CASE, J. F. **Bioluminescence in the Sea.** Annual. Rev. Mar. Sci. Vol.2, p. 443–93, 2010.

HARVEY, E. N. **A history of luminescence. From the earliest times until 1900.** Philadelphia: The American Philosophical Society, 1957.

HASTING, J. W.; MORION, J. G. **Bioluminescence.** In: PROSSER, L. (Ed.) Neural and Integrative Animal Physiology. (L. Prosser ed.), New York, Wiley-Liss, p.131-169, 1991.

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

HIGGINS, D. *et al.* **CLUSTAL, W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting. Position-specific gap penalties and weight matrix choice.** Nucleic Acids Res. v. 22, p. 4673-4680, 1994.

KAJIYAMA, N.; NAKANO, E. **Isolation and characterization of mutants of firefly luciferase which produce colors of light.** Protein Engineering Design & Selection, v. 4(6), p: 691-693, 1991.

KANIE *et al.* **One-pot non-enzymatic formation of firefly luciferin in a neutral buffer from *p*-benzoquinone and cysteine.** Scientific reports, 2016.

KANIE *et al.* **2-S-cysteinylhydroquinone is an intermediate for the firefly luciferin biosynthesis that occurs in the pupal stage of the Japanese firefly, *Luciola lateralis*.** Bioorganic Chemistry, v. 80, p. 223-229, 2018.

KLOWDEN, J. M. In **Physiological System in Insects.** 2^a ed. United States of America: Academic Press, 2007.

KUNDRATA R. *et al.* **The comprehensive phylogeny of the superfamily Elateroidea (Coleoptera: Elateriformia).** Mol. Phylogenet. Evol., v. 76, p. 162-171, 2014.

KUSY, D. *et al.* **Phylogenomic relationships of bioluminescent elateroids define the ‘lampyroid’ clade with clicking Sinopyrophoridae as its earliest member.** Syst Entomol, 46 , pp. 111-123, 2021.

LI *et al.* **Recent achievements of bioluminescence imaging based on firefly luciferin-luciferase system.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 211, 2021.

LIU *et al.* **Second Rhagophthalmid Luciferase Cloned from Chinese Glow-worm *Menghuoius giganteus* (Rhagophthalmidae: Elateroidea).** *Photochem Photobiol.*, v. 96, p. 46-54, 2020.

MAEDA, J. *et al.* **Biosynthesis-inspired deracemizative production of d-luciferin by combining luciferase and thioesterase.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, volume 1861, p. 2112–2118, 2017.

McCAPRA F., *et al.* **The chemical origin of color differences in beetle bioluminescence.** In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and Applied Aspects*, p. 387 – 391, 1994.

MEZZANOTTE, L. *et al.* **In Vivo Molecular Bioluminescence Imaging: New Tools and Applications.** *Trends in Biotechnology*, v. 35, p. 640-652, 2017.

MUN, S., NOH, M. Y., KRAMER, K. J., MUTHUKRISHNAN, S., ARAKANE, Y. **Gene functions in adult cuticle pigmentation of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* v. 117, 10391, 2020.

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.

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

NIWA, K.; NAKAMURA, M.; OHMIYA, Y. **Stereoisomeric bioinversion key to biosynthesis of firefly D-luciferin.** *FEBS Letters*, v. 580, p.5283–5287. 2006.

NOH, M. Y., MUTHUKRISHNAN, S., KRAMER, K. J.; ARAKANE, Y. **Cuticle formation and pigmentation in beetles.** *Curr. Opin. Insect Sci.* v. 17, p. 1-9, 2016.

OBA, Y. *et al.* **Selected Least Studied but not Forgotten Bioluminescent Systems.** *Photochemistry and Photobiology*, v. 93, p. 405–415, 2017.

OBA, Y. *et al.* **Orthologous gene of beetle luciferase in non-luminous click beetle, *Agrypnus binodulus* (Elateridae), encodes a fatty acyl-CoA synthetase.** *Gene*, v. 407, p. 169-175, 2008.

OBA Y. *et al.* **Characterization of luciferase and its paralogue in the Panamanian luminous click beetle *Pyrophorus angustus*: a click beetle luciferase lacks the fatty acyl-CoA synthetic activity.** *Gene*, v. 452, p.1-6, 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.*, Malden, v. 62, p. 309–313, 1995.

OHMIYA, Y. *et al.* **Comparative aspects of a luciferase molecule from the Japanese luminous beetle, *Rhagophthalmus ohbai*.** Science Report of the Yokosuka City Museum , v. 47, p. 31-38, 2000.

PELENTIR, G. *et al.* **A highly efficient, thermostable and cadmium selective firefly luciferase suitable for ratiometric metal and pH-biosensing and for sensitive ATP assays.** Photochemical & Photobiological Sciences, 2019.

REES, J. F. *et al.* **The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defense mechanisms into deep-sea communication tools.** J. Exp. Biol., v. 201, p. 1211-1221, 1998.

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

SHEN, X. M., ZHANG, F. & DRYHURST, G. **Oxidation of dopamine in the presence of cysteine: Characterization of new toxic products.** *Chem. Res. Toxicol.* **10**, p. 147–155, 1997.

SHERALD, A. F. **Sclerotization and coloration of the insect cuticle.** *Experientia.* v. 36, p. 143-266, 1980.

SHIMOMURA, O. **Bioluminescence. Chemical Principles and Methods,** Massachusetts: Mainland Press Pte Ltd, 2006.

SILVA, J. R., AMARAL, D. T. & VIVIANI, V. R. **Comparison of the Malpighian tubules and fat body transcriptional profiles of *Zophobas morio* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae).** *Comp. Biochem. Physiol.* v. 29, p. 95-105, 2019.

SOLANO, F. **Melanins: skin pigments and much more – types, structural models, biological functions, and formation routes.** *New Journal of Science.* v. 5, p. 1-28, 2014.

SOUZA, D. R. *et al.* **Biosensing firefly luciferin synthesis in bacteria reveals a cysteine-dependent quinone detoxification route in Coleoptera.** *Sci Rep* 12, 14815, 2022.

STANGER-HALL, K. F.; LLOYD, J. E.; HILLS, D. M. **Phylogeny of North American fireflies (Coleoptera: Lampyridae): implications for the evolution of light signals.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 45, p. 33-49, 2007.

SUGUMARAN, M. **Comparative of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects.** *Pigment Cell Res.* v. 15, p. 2-9, 2002.

SUGUMARAN, M.; BAREK, H. **Critical analysis of the melanogenic pathway in insects and higher animals.** *Int. Mol. Sci.* v. 17, 1753, 2016.

SUN, X. *et al.* **Fusion expression of bifunctional enzyme complex for luciferin-recycling to enhance the luminescence imaging.** Journal of Photochemistry & Photobiology, 185, p. 66-72, 2018.

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

TAFRESHI, N. K; *et al.* **The influence of insertion of a critical residue (Arg356) in Structure and Bioluminescence Spectra of firefly Luciferase.** Journal of Biological Chemistry, v. 282, n.12, p: 8641-8647, 2007.

TAFRESHI, N. K *et al.* **Site-directed mutagenesis of firefly luciferase: implication of conserved residue(s) in bioluminescence emission spectra among firefly luciferases.** Biochemical Journal, v. 412, p: 27-33, 2008.

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

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.** Biochemistry (Easton), v.52, p: 19–27, 2013.

VIVIANI, V. R.; BECHARA, E. J. H. **Biophysical and Biochemical Aspects of Phengodid (Railroad-Worm) Bioluminescence.** Photochemistry and Photobiology, Vol. 58, No. 4, pp. 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., Malden, v. 62, p. 490–495, 1995.

VIVIANI, V. R.; BECHARA, E. J. H. **Larval tenebrio molitor (coleoptera: tenebrionidae) fat body extracts catalyze firefly d-luciferin and ATP-dependent chemiluminescence : a luciferase-like enzyme.** Photochemistry and Photobiology, v. 63, n. 6, p. 713-8, 1996.

VIVIANI V. R.; BECHARA, E. J. H. **Bioluminescence and Biological Aspects of Brazilian Railroad-Worms (Coleoptera: Phengodidae).** Ann. Entomol. Soc. Am. V. 90, p. 389–398, 1997.

VIVIANI, V. R. *et al.* **Cloning and molecular characterization of the cDNA for the brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* luciferase.** Photochem. Photobiol., Malden, v. 70, n. 2, 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.** Biochemistry, Washington, v. 38, p. 8271–8279. 1999b

VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. **Bioluminescence color determinants of *Phrixotrix* Railroad-worm luciferases: Chimeric luciferases, site-directed mutagenesis on Arg 215 and guanidine effect.** Photochemistry and Photobiology, 72, p. 267-271, 2000.

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., Amsterdam, 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., Malden, v. 81, p. 843–848, 2005.

VIVIANI, V. R. *et al.* **An ancestral luciferase in the Malpighi tubules of a non-bioluminescent beetle!** Photochemical & Photobiological Sciences. Cambridge: Royal Soc Chemistry, v. 8, n. 1, p. 57-61, 2009.

VIVIANI, V. R., OKAWACHI, F. M., SCORSATO, V. & ABDALLA, F. C. **CCD imagin of basal bioluminescence in larval fireflies: clues on the anatomic origin and evolution of bioluminescence.** Photochem. Photobiol. Sci. v. 7, p. 448-452, 2008.

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

VIVIANI, V. R.; CAMARGO, I. A.; AMARAL, D. T. **A transcriptional survey of the cDNA library of *Macrolampis* sp2 firefly lanterns (Coleoptera: Lampyridae).** Comparative Biochemistry and Physiology, Part D 8, p. 82–85, 2013.

VIVIANI, V. R. **Luciferases de Vagalumes: Estrutura, função e aplicação em bioanálise e bioimageamento.** Revista Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento, 37, p. 8-19, 2007.

VIVIANI, V. R. **The origin, diversity and structure function relationships of insect luciferases.** Cellular and molecular life sciences, v.59, p. 1833-1850, 2002.

VIVIANI, V. R.; HASTINGS, J. W.; WILSON, T. **Two Bioluminescent Diptera: The North American *Orfelia fultoni* and the Australian *Arachnocampa flava*. Similar Niche, Different Bioluminescence Systems.** Photochemistry and Photobiology, vol. 75(1), p. 22–27, 2002.

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

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., Malden, v. 10, n. 12, p. 1879–1886, 2011.

VIVIANI, V. R. *et al.* **Glu311 and Arg337 stabilize a closed conformation and provide a critical catalytic base and counteraction for green bioluminescence in beetle luciferases.** Biochemistry, v. 55, p. 4764–4776, 2016.

VIVIANI, V. R. *et al.* **The proton and metal binding sites responsible for the pH-dependent green-red bioluminescence color tuning in firefly luciferases.** Scientific Reports, 2018.

VIVIANI, V. R. *et al.* **A new brilliantly blue-emitting luciferin-luciferase system from *Orfelia fultoni* and Keroplatinae (Diptera).** Scientific Reports, 2020.

VIVIANI, V. R.; BEVILAQUA, V. R. **Luciferases emissoras de luz vermelha e vermelho distante modificadas por engenharia genética e suas aplicações.** 2020, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10202001264, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 19/06/2020

VIVIANI V. R. *et al.* **A Very Bright Far-Red Bioluminescence Emitting Combination Based on Engineered Railroad Worm Luciferase and 6'-Amino-Analogs for Bioimaging Purposes.** International Journal of Molecular Sciences, v. 22, 2021.

WHITE E. H. *et al.* **The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: an efficient chemical production of excited states.** Bioorg. Chem. V. 1, p. 92–122, 1971.

WHITE E. H.; BRANCHINI B. **Modification of firefly luciferase with a luciferin analog: a red light producing enzyme.** J. Am. Chem. Soc. 97: 1243–1245, 1975.

WILSON, T.; HASTINGS, J. W. **Bioluminescence.** Annual review of cell and developmental biolog, v. 14, p. 197-230, 1998.

WOOD, K. V. **The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence.** Photochem. Photobiol., Malden, v. 62, n. 4, p. 662–673, 1995.

YASUNAGA, M.; NAKAJIMA, Y.; OHMIYA, Y. **Dual-color bioluminescence imaging assay using green- and red-emitting beetle luciferases at subcellular resolution.** Analytical and Bioanalytical Chemistry v. 406, p. 5735–5742, 2014.

ZHANG, F.; DRYHURST, G. **Effects of L-cysteine on the oxidation of dopamine: New reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's Disease.** J. Med. Chem. **37**, p. 1084–1098, 1994.

ZHANG, R. *et al.* **Genomic and experimental data provide new insights into luciferin biosynthesis and bioluminescence evolution in fireflies.** *Scientific Reports*, 10:15882, 2020.

8. ANEXO. Produção científica

SOUZA, D. R.; SILVA, J. R.; MOREIRA, A.; VIVIANI, V. R.. Biosensing firefly luciferin synthesis in bacteria reveals a cysteine-dependent quinone detoxification route in Coleoptera. *Sci Rep* 12, 14815, 2022.

VIVIANI V. R.; BEVILAQUA, V. R.; SOUZA, D. R.; PELENTIR, G. F.; KAKIUCHI, M.; HIRANO, T.. **A Very Bright Far-Red Bioluminescence Emitting Combination Based on Engineered Railroad Worm Luciferase and 6'-Amino-Analogs for Bioimaging Purposes.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, 2021.