

# ACÇÃO SPECTRA

## Sua importância para terapia de luz de baixo nível

Tiina Karu


Laboratório de Laser Biomedicina  
Instituto de Laser e Tecnologias de Informação  
Academia Russa de Ciências  
Troitsk 142190, Região de Moscou, Rússia  
tkaru@isan.troitsk.ru  
www.isan.troitsk.ru/dls/karu.html

### 1. INTRODUÇÃO

Os comprimentos de onda de radiação eficazes para a fotobiologia variam entre 300 e 900 nm, ou seja, de UV (ultravioleta) a proximidade de IR (infravermelho). Praticamente todos os processos fotobiológicos em plantas e animais, como fotossíntese, fototropismo, fototaxis, fotoperiodismo e visão, utilizam essa faixa de radiação. As moléculas fotorreceptoras responsáveis por essas fotorespostas foram bem estudadas há décadas.

A regulação do metabolismo celular pela luz visível não é um tópico clássico da fotobiologia. Apenas a descoberta da existência de espectros de ação na região de 330 a 860 nm para o aumento das taxas de síntese de DNA e RNA em células de mamíferos, bem como para a estimulação do crescimento de microorganismos eucariotas e procarióticos registrados na década de 1980 (revisado em 1) , **Indicou que a luz monocromática na região visível para a proximidade pode ser um instrumento sutil para regular o metabolismo celular. Esta descoberta significa que o tema da fototerapia a laser de baixo nível (ou terapia de luz de baixo nível, ou bioestimulação a laser) pertence à fotobiologia.**

**Um espectro de ação é um enredo da eficácia relativa de diferentes comprimentos de onda da luz em causar uma resposta biológica particular e, em condições ideais, deve imitar o espectro de absorção da molécula que absorve a luz e cuja alteração fotoquímica causa o efeito ( 2).**

Os primeiros espectros de ação com o objetivo de provar ou desaproveitar a existência de um chamado efeito de bioestimulação a laser no nível celular foram registrados no início da década de 1980 (3-5).  Lembre-se de que a bioestimulação a laser (hoje chamada terapia a laser de baixo nível, terapia de luz de baixo nível, fotobiomodulação ou fototerapia a laser) como tratamento médico remonta à década de 1960 com o uso de um laser He-Ne ( = 632,8 nm) para a melhoria da Cura de feridas prejudicadas.

Com o progresso técnico na segunda metade do século 20 e o advento do laser, essas novas fontes de luz encontraram sua aplicação em

medicina e em terapia. O laser de rubi ( $\lambda = 694 \text{ nm}$ ), que foi o primeiro laser inventado em 1960, foi usado em oftalmologia e dermatologia muito logo após sua aparição. Endre Mester, que é considerado o pai da "bioestimulação laser", também usou o laser rubi em 1964. Mas o boom real no uso terapêutico de lasers começou logo após a invenção do laser He-Ne em 1961, porque o laser He-Ne ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) foi o primeiro laser comercial amplamente disponível. O efeito estimulante da luz e da luz vermelha em particular foi redescoberto quando esta nova fonte de luz foi usada. Os efeitos observados foram atribuídos à única e alta coerência da radiação laser He-Ne, embora não haja fundamentos físicos para tal conclusão (6).

O professor Mester também usou o laser He-Ne em sua prática e realizou muitos estudos pioneiros no nível celular. Ao mesmo tempo (final dos anos 60 - início dos anos 70), o uso em grande escala de lasers de He-Ne em laboratórios e clínicas começou na URSS (Universidade de Harkov, Universidade de Estado de Kazahztan em Alma-Ata, **Instituto de Física em Minsk, Instituto de Problemas de Oncologia em Kiev, Instituto de Engenharia de Rádio e Eletrônica em Fryazino, Região de Moscou**). **A propagação da bioestimulação a laser em vários países começou no final dos anos 70 e obteve um interesse maior (Itália, Japão, Reino Unido e China) após a aparição de lasers médicos semicondutores na década de 80.**

Os espectros de ação na região IR visível para a proximidade para as respostas biológicas das células cultivadas mostraram que a luz vermelha a  $632,8 \text{ nm}$  não era o único comprimento de onda adequado para a bioestimulação a laser (3-5). Esses espectros, juntamente com os resultados de experimentos usando a irradiação dicromática de células e a modificação de efeitos de luz com produtos químicos (6-9), mostraram que a "bioestimulação a laser" é um fenômeno fotobiológico. *Esses dados também permitiram sugerir que o fotoacceptor para a estimulação do metabolismo celular é a enzima terminal da cadeia respiratória, isto é, a citocromo c oxidase para células eucarióticas (9) e o complexo citocromo bd para Escherichia coli (10).* Na região espectral azul, flavoproteínas como NADH-desidrogenase também podem funcionar como fotorreceptores (8). A sugestão de que o citocromo c oxidase é a molécula fotoacceptiva foi recentemente confirmada em experimentos elegantes com neurônios primários funcionalmente inativados, propondo que a luz upregula essa enzima (11).

Uma circunstância surpreendente é que os fotoacceptores para este fenômeno em células eucarióticas e em células procarióticas (*E. coli*) pareciam ser componentes naturais da cadeia respiratória, **E não moléculas fotorreceptoras especializadas. Isso é diferente dos fenômenos fotobiológicos clássicos que utilizam fotorreceptores específicos (clorofilas, rodopsinas, etc.). Por outro lado, não é surpreendente do ponto de vista dos centros absorventes no fotoacceptor (para células eucarióticas, estes são Cu e bastante provavelmente Fe em citocromo c oxidase, ver Seção 3). Os metais de transição (Cu e Fe) geram estados excitados eletronicamente em condições de reação muito moderadas. A fotoquímica bioorgânica, uma nova área de pesquisa de desenvolvimento rápido, está preocupada com os aspectos biológicos da química do metal de transição e a física sob a irradiação (12). Por último, mas não menos importante, também é conhecida a ativação de algumas enzimas pela luz, um fenômeno similarmente próximo (13, 14). Como a vida evoluiu em um mundo de luz, Deve haver muitas interações entre**

## **sistemas biológicos e luz, incluindo acomodações para seus efeitos deletérios (15).**

Os espectros de ação inicial serão descritos na Seção 2. A análise de como o fotoacceptor foi determinado a partir desses espectros é o tópico da Seção 3. A Seção 4 descreve a comparação de espessuras de ação e absorção. A seção 5 é dedicada a uma breve análise de como os sinais gerados pelos quanta de luz nas mitocôndrias são transduzidos para as organelas celulares, onde os medidores de ação iniciais foram medidos (o núcleo). **A Seção 4 descreve a comparação de espessuras de ação e absorção. A seção 5 é dedicada a uma breve análise de como os sinais gerados pelos quanta de luz nas mitocôndrias são transduzidos para as organelas celulares, onde os medidores de ação iniciais foram medidos (o núcleo).** **A Seção 4 descreve a comparação de espessuras de ação e absorção. A seção 5 é dedicada a uma breve análise de como os sinais gerados pelos quanta de luz nas mitocôndrias são transduzidos para as organelas celulares, onde os medidores de ação iniciais foram medidos (o núcleo).**

1. Qualquer gráfico que represente uma resposta fotorreceptora em função do comprimento de onda, do número de onda  $\lambda^{-1}$  ou da energia fotônica  $e$ , é chamado de ESPECTRO DE AÇÃO.
2. A espectroscopia de ação analisa os efeitos causados pela irradiação para caracterizar os pigmentos envolvidos (chamados fotoacceptores ou fotorreceptores).
3. Depois de determinar a molécula de fotoacceptor, onde o espectro de absorção é espelhado no espectro de ação inicial, pode-se sugerir sobre as vias de sinalização celular dentro de uma célula entre o fotoacceptor tentativo e a molécula em que a atividade foi medida por espectroscopia de ação.

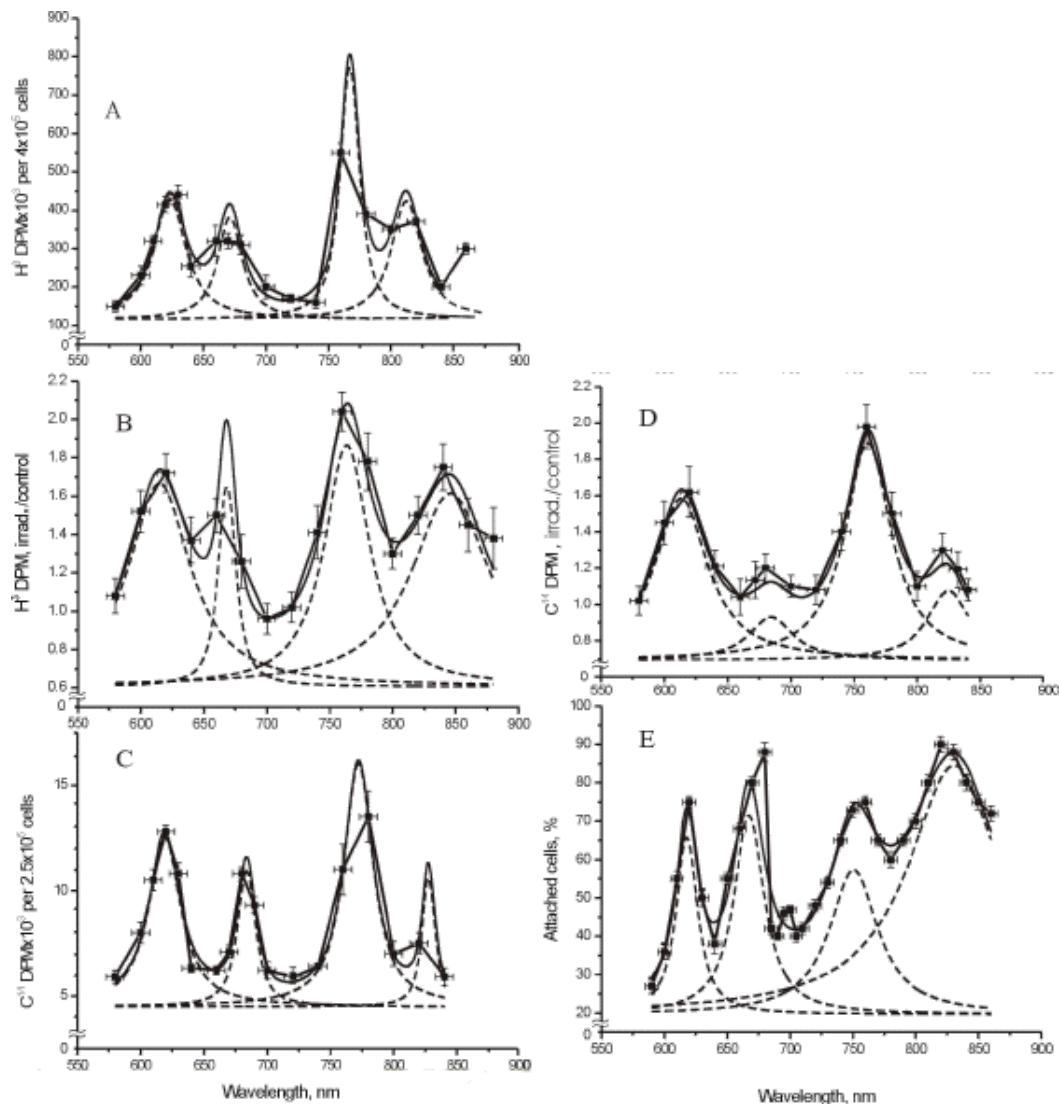
## **2. ACÇÃO SPECTRA para um aumento da taxa de síntese de DNA e RNA em CÉLULAS MAMÍFERAS CULTURADAS**

Em primeiro lugar, lembremos que em células eucarióticas, a síntese de DNA e RNA ocorre no núcleo, que não possui cromóforos absorventes na região espectral usada para Fototerapia a laser (600-900 nm). Pode-se encontrar os espectros originais (incluindo a região espectral UV-para azul) (3-5), e na forma exata analisada pelo software contemporâneo, em (16). Abaixo, analisaremos o espectro de ação para aumentar a ligação celular a uma matriz de vidro (17).

A Figura 1 apresenta cinco espectros de ação na região de IR vermelho a próximo para células de mamíferos, e a Tabela 1 fornece os dados de sua deconvolução. Os dados experimentais originais (4, 5, 17) são apresentados aqui junto com encaixe de curva e encaixe Lorentziano (16). O desvio do quadrado médio,  $R^2$ , para cada encaixe também é mostrado na Tabela 1. No melhor ajuste,  $R^2 = 1$ . As Espectro A e B apresentam a estimulação da taxa de síntese do DNA em culturas de fase logarítmica e fase platônica, respectivamente. Spectra C e D são as dependências da estimulação da taxa de síntese de RNA em células de fase logarítmica e de platô. Estes quatro espectros foram gravados usando um

monocromador MDR-2, com uma lâmpada de halogéneo com potência de 150 W colocada em um refletor parabólico (4). A largura total espectral a meio máximo (FWHM) da luz produzida foi de 14 nm (Figuras 1A-D). A intensidade da luz foi mantida constante ( $10 \text{ W} / \text{m}^2$ ) variando a tensão através da lâmpada de halogéneo. O tempo de irradiação foi de 10 s, e a dose foi de  $100 \text{ J} / \text{m}^2$ . **O espectro E mostra um aumento na ligação celular a uma matriz de vidro. Neste caso, o monocromador foi um mais avançado, construído no Institute of Spectroscopy of Russian Academy Science (17).**

Os parâmetros de luz para gravação deste espectro foram os seguintes:  $I = 1.3 \text{ W} / \text{m}^2$ ,  $t = 40 \text{ seg}$ ,  $D = 52 \text{ J} / \text{m}^2$ , FWHM 10 nm.



**Figura 1.** Espectros de ação na região de 580-860 nm para (A) estimulação da taxa de síntese de DNA em fases logarítmicas e (B) culturas em fase de platô; (C) estimulação da taxa de síntese de RNA em fases de fase logarítmica e (D) culturas em fase de platô; (E) aumento da ligação celular a uma matriz de vidro. Curvas experimentais (adaptadas -■- de 4, 5, 17), guindastes (linha contínua) e acessórios Lorentzian (linha tracejada) são mostrados. Dose  $100 \text{ J} / \text{m}^2$  (AD) ou  $52 \text{ J} / \text{m}^2$  (E). Adaptado de (16).

Todos os cinco espectros na Figura 1 são caracterizados por quatro máximos largos, mas as posições de pico exatas são diferentes (Tabela 1). As maiores diferenças na posição do pico podem ser observadas na região IR próxima a 800 nm. Este pico aparece a 812,5 nm no espectro

A, entre 827,5 e 830,7 nm nos espectros C, D, E e a 846,0 nm, no espectro B.

**Table 1.** Parameters of the bands in the action spectra in Figure 3, determined by deconvolution of the spectra with Lorentzian fitting. Adapted from (16).

<i>Stimulation of DNA synthesis rate</i>				<i>Stimulation of RNA synthesis rate</i>				Increase of cell adhesion to glass matrix	
Proliferating culture Figure 3A ( $R^2=0.97$ )		Plateau-phase culture Figure 3B ( $R^2=0.98$ )		Proliferating culture Figure 3C ( $R^2=0.98$ )		Plateau-phase culture Figure 3B ( $R^2=0.93$ )		Proliferating culture Figure 3E ( $R^2=0.91$ )	
Peak position, nm	FWHM*, nm	Peak position, nm	FWHM, nm	Peak position, nm	FWHM, nm	Peak position, nm	FWHM, nm	Peak position, nm	FWHM, nm
623.5	29.5	615.0	58.1	619.1	29.0	613.5	49.4	618.0	18.9
671.5	22.1	668.7	13.8	683.7	14.7	684.5	41.6	667.5	27.8
767.3	16.4	763.7	42.1	772.3	26.0	761.1	43.3	750.7	45.6
812.5	28.1	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	827.5	9.5	824.7	39.1	830.7	89.3
—	—	846.0	74.5	—	—	—	—	—	—

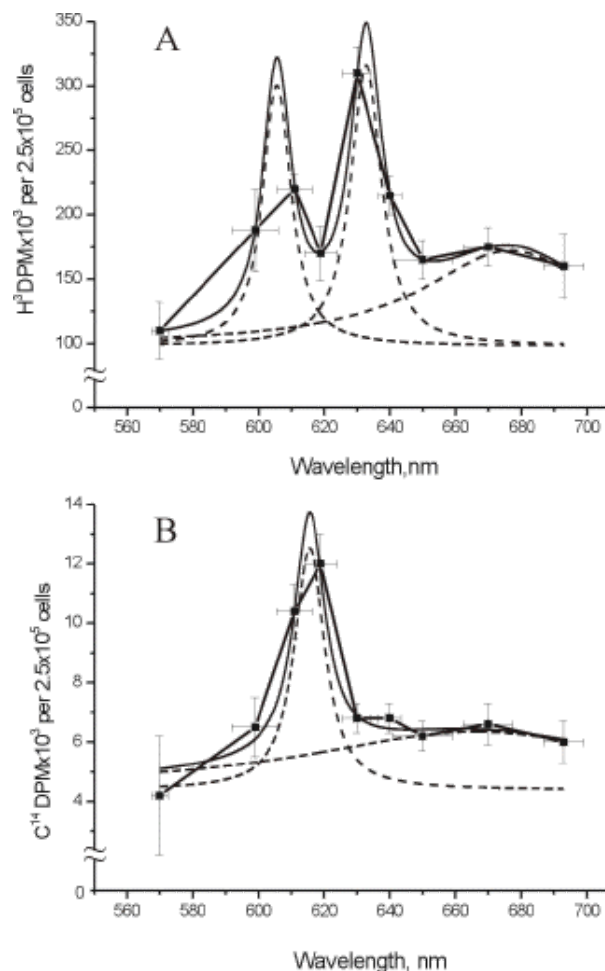
\* $R^2$  = mean-square deviation

\*\*FWHM = full width of the band at half maximal height

O máximo no espectro AE na Figura 1 tem posições de pico de 750,7 a 772,3 nm (Tabela 1). Em quatro espectros, esse pico está entre 761,1 e 772,3 nm, o que pode ser uma linha no espectro de absorção. Uma aparência deste máximo com uma posição de pico a 750,7 nm no espectro E poderia provavelmente refletir outra linha em um espectro de absorção.

O máximo extremo-vermelho no espectro de ação (Figura 1) tem posições de pico de 667,5 a 684,5 nm. Estas posições de pico podem ser divididas em dois grupos: 667,5, 671,5 e 668,0 nm num grupo e 684,5 e 683,7 nm na outra (Tabela 1). O máximo vermelho no espectro de ação (Figura 1) tem posições de pico de 613,5 a 623,5 nm (Tabela 1).

Deve notar-se que, num espectro de ação precoce (3), um pico a 606 nm apareceu juntamente com um pico a 632,8 nm (Figura 2A, Tabela 2). Estes dois primeiros espectros para a estimulação da taxa de síntese de DNA e RNA foram registrados de 570 a 650 nm, utilizando lâmpadas de incandescência com potência de 20 e 90 W e filtros de interferência (3). Com essa configuração, não conseguimos manter a intensidade da luz igual em todos os comprimentos de onda. Isso significa que, para uma dose constante, foi forçado a usar vários tempos de irradiação. No nosso caso, a intensidade foi de 1,5 e 0,3 W / m<sup>2</sup>, e a dose de 80 J / m<sup>2</sup> foi atingida por irradiação das células de 2 s para 4,5 min. Isso significa que, para uma dose constante, foi forçado a usar vários tempos de irradiação. No nosso caso, a intensidade foi de 1,5 e 0,3 W / m<sup>2</sup>, e a dose de 80 J / m<sup>2</sup> foi atingida por irradiação das células de 2 s para 4,5 min. Isso significa que, para uma dose constante, foi forçado a usar vários tempos de irradiação. No nosso caso, a intensidade foi de 1,5 e 0,3 W / m<sup>2</sup>, e a dose de 80 J / m<sup>2</sup> foi atingida por irradiação das células de 2 s para 4,5 min.



**Figura 2.** Espectros de ação na região de 570-650 nm para a estimulação de (A) DNA e (B) síntese de ARN em culturas de fase logarítmica em  $D = 80 \text{ J / m}^2$  em condições onde os tempos de irradiação não foram mantidos constantes. Curvas experimentais (adaptadas -■- de 3), guindastes (linhas contínuas) e acessórios Lorentzian (linhas tracejadas) são mostrados. Adaptado de (16).

Esta não foi uma medida correta de um espectro de ação, mas este primeiro experimento mostrou várias características importantes do fenômeno da bioestimulação. Primeiro, não apenas a luz laser He-Ne em 632,8 nm causa "bioestimulação", um resultado semelhante foi alcançado usando luz não-coerente com o mesmo comprimento de onda. Lembre-se que, no ano de 1982, a comunidade médica de laser acreditava que a radiação laser He-Ne possuía propriedades benéficas mágicas. Em segundo lugar, depois de melhorar o equipamento e comparando novos espectros de ação (Figura 1, AD) aos primeiros espectros apresentados na Figura 2A, B, entendemos que deve haver dependência da intensidade da luz na região distante 650-680 nm. Falando em termos fotobiológicos, a regra de reciprocidade não é válida. De acordo com a regra de reciprocidade (ou Bunsen-Roscoe) Uma reação fotoquímica é diretamente proporcional à dose total de energia, independentemente do tempo em que essa dose é administrada. No entanto, a razão pela qual, em um espectro (Figura 2A), duas bandas vermelhas apareceram, ainda é obscura. Pode-se supor que isso se deve a parâmetros de irradiação, intensidade e tempo de irradiação. Resolver essa pergunta requer novas experiências.



**Table 2.** Parameters of the bands in the action spectra in Figure 2 determined by deconvolution of the spectra with Lorentzian fitting. Adapted from (16).

Figure 2A: Stimulation of DNA synthesis rate ( $R^2=1$ )*		Figure 2B: Stimulation of RNA synthesis rate ( $R^2=0.97$ )	
Peak position, nm	FWHM**, nm	Peak position, nm	FWHM, nm
606.0	9.5	616.0	10.6
632.8	10.6	—	—
677.0	65.7	666.1	127.1

\* $R^2$  = mean-square deviation

\*\*FWHM = full width of the band at half maximal height

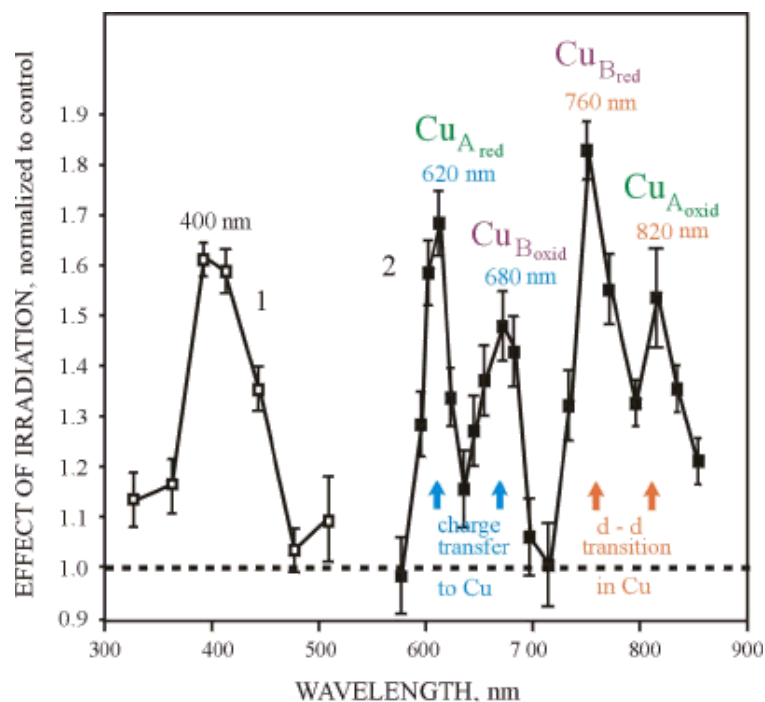
Encontrar a ausência de reciprocidade nos leva a realizar uma experiência especial, onde a dose foi mantida constante, mas o tempo e a intensidade da irradiação foram variados. Esses dados são apresentados aqui para chamar a atenção mais uma vez para o tipo de comportamento do limite da dependência de intensidade que ainda não é entendido, e muitas vezes não é levado em consideração em experimentos. Parece que o máximo vermelho no espectro de ação é sensível à intensidade da luz (Figura 3), e que existe um certo limiar para receber um efeito de estimulação (no nosso caso, a 4-5 W / m<sup>2</sup>) (3). O efeito máximo ocorreu perto de 8 W / m<sup>2</sup> (tempo de irradiação 10-12 s) (1, 3). A existência do limiar de intensidade é especialmente importante desde um ponto de vista prático (tanto no laboratório como na clínica) para decidir os parâmetros de irradiação. *Um tipo similar de curva foi gravado a 454 nm para E. coli* (10). Mais tarde, a invalidez da regra de reciprocidade foi mostrada para a luz em  $\lambda = 632,8$  nm quando irradiar fibroblastos humanos (18) e *E. coli* (19). É claro que o mesmo tipo de medidas são necessárias para todas as bandas nos espectros de ação.

Na faixa de comprimento de onda utilizada em nossos experimentos e importante para fototerapia (600-860 nm), existem quatro regiões "ativas", mas as posições de pico não são exatamente as mesmas para todos os espectros de ação. A banda vermelha tem uma posição de pico entre 613,5 e 623,5 nm (em um espectro, a 606 nm); A banda de vermelho distante tem posições de pico entre 667,5 e 683,7 nm, e duas bandas de IR próximas na faixa de 750,7-772,3 nm e 812,5-846,0 nm.

### 3. INTERPRETAÇÃO DA ACÇÃO ESPECÍFICA: CYTOCHROME C OXIDASE é a MOLECULA DE FOTOACCETOR

No início dos anos 90, os espectros de ação anteriores (3-5, 17) foram analisados usando todos os dados da literatura espectroscópica disponíveis (9, 20), o que permitiu a formação Uma sugestão sobre os cromóforos envolvidos. Tenha em mente que os cromóforos são os componentes das moléculas que absorvem a luz.

Os espectros de ação para a taxa de síntese de DNA e RNA (3-5), e mudanças na adesão das células a uma matriz de vidro (17) sem ajuste de curva de Lorentzian (que não foi feito naquele momento) foram utilizados para uma soma, e isso O espectro de ação generalizada é mostrado na Figura 3.



**Figura 3.** O espectro de ação generalizado (uma soma de 5 espectros de ação) para o aumento da proliferação de células HeLa para  $\lambda = 330-860$  nm (3-5,17). Curva 1: dose  $10 \text{ J} / \text{m}^2$ , Curva 2: dose  $100 \text{ J} / \text{m}^2$ . A identidade sugerida dos cromóforos absorventes está marcada, usando dados de (9).

A Figura 3 mostra que o espectro de ação generalizada para a proliferação celular na faixa de 580-860 nm consiste em duas séries de bandas de duplete na faixa de 620-680 nm e 760-895 nm com máxima bem pronunciado a 620, 680, 760 e 825 nm. Na região azul violeta, há um máximo de 400 nm, com a borda do envelope perto de 450 nm. Lembre-se que, na faixa de comprimento de onda de 310-500 nm, obteve-se um efeito estimulante máximo com uma dose de radiação de uma ordem de magnitude menor do que na faixa espectral de onda longa (3, 4). Isto é observado na Figura 3 pelas Curvas 1 e 2.

As bandas no espectro de ação foram identificadas em (20 e revisadas em 9) por analogia com os espectros de absorção de sistemas metal-ligando característicos desta faixa espectral. As regiões 400-450 nm e 620-680 nm são caracterizadas pelas bandas pertencentes a complexos com transferência de carga em um sistema metal-ligando, e dentro de 760-830 nm, estas são transições dd em metais (21-23).  $\pi-\pi^*$  A região 400-420 nm é típica de transições em um anel de porfirina (24).

A análise comparativa de dados espectrais para metais de transição e seus complexos, por um lado, e biomoléculas que participam na regulação do metabolismo celular, por outro, nos permitiram sugerir que as enzimas multinucleares contendo Cu (II) podem estar participando (9, 20). A análise das transições de excitação de elétrons de moléculas participantes contendo Cu (II) (25-27) mostrou que as transições metal-



ligando na faixa de 400-450 nm correspondem à transição de N<sub>imidazole</sub>  
→ Cu, A 620 nm para a transição de S<sub>cisteína</sub> → e a 680 nm para a  
transição de → metionina com S.

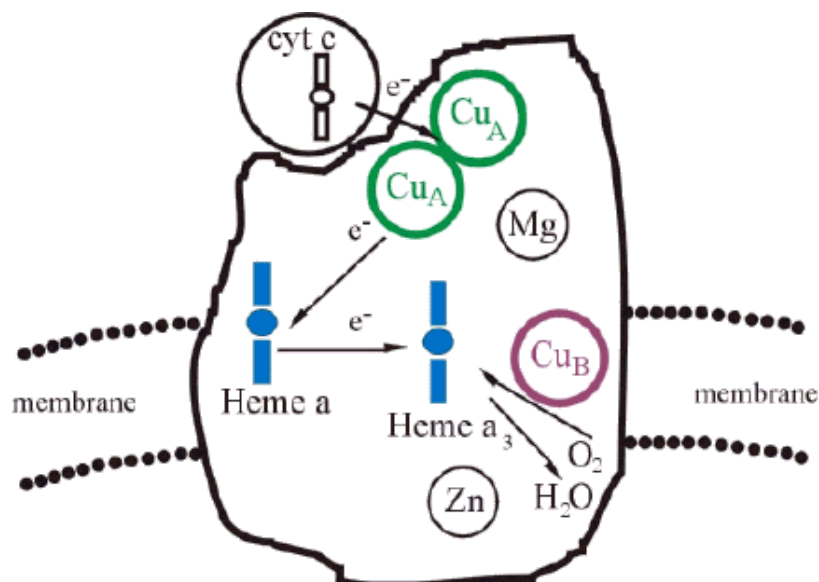
A comparação das linhas de possíveis transições de dd e complexos de transferência de carga de Cu (24-28) com nosso espectro de ação (Figura 3) permitiu assumir que a molécula fotorreceptor possui diferentes tipos de centros contendo Cu (II) nas faixas de 420 -450 nm e 760-830 nm. No intervalo de 420-450 nm, esta pode ser uma combinação de centros dos Tipos I e II (para as características dos centros dos Tipos I, II e III, ver referência 23), embora um centro do Tipo I possa estar presente. A 330 nm, um centro do Tipo III pode estar presente, e na gama de 760-820 nm, os centros dos Tipos I e III coexistem. Dentro de 620-680 nm, existe um centro de Tipo I e uma combinação de centros de diferentes tipos é improvável.

A análise acima permitiu-nos concluir que todas as bandas no espectro de ação na Figura 3 podem estar relacionadas ao citocromo c oxidase (9, 20). Os dados de experimentos de irradiação dicromática e modificação de efeitos de luz adicionando vários produtos químicos (1, 6-9) também foram levados em consideração nesta análise.

Em células eucarióticas, a citocromo c oxidase é a enzima terminal da cadeia respiratória, que medeia a transferência de elétrons do citrato c para o oxigênio molecular (29). O ferrocitocromo c é oxidado, o oxigênio é reduzido e os prótons são bombeados da matriz mitocondrial para o citossol. A energia livre resultante desta química redox é convertida em um potencial eletroquímico através da membrana interna da mitocôndria, que finalmente impulsiona a produção de ATP. Adequadamente, A citocromo c oxidase desempenha um papel central na bioenergética da célula. As cadeias respiratórias de células eucarióticas estão localizadas nas mitocôndrias.

Citocromo c oxidase de células de mamífero é uma grande proteína de membrana multicomponente de considerável complexidade estrutural. A estrutura de raios-X tridimensional de alta resolução da citocromo c oxidase de coração bovino (30-32) e *Paracoccus denitrificans* (33) foi relatada em 1995. Esses estudos indicaram que Cu<sub>A</sub> é um centro de cobre binuclear com uma estrutura inesperada semelhante Para um centro de ferro-enxofre de tipo (2Fe-2S), no qual os íons de Fe e os átomos de enxofre inorgânico são substituídos por átomos de cobre e átomos de enxofre de cisteína, respectivamente. O s<sub>2</sub> local de ligação contém um heme<sub>3</sub> ferro e Cu<sub>B</sub>; Não existe um ligando de ponte detectável entre átomos de ferro e cobre. Heme a é coordenado com dois imidazoles de resíduos de histidina. O quinto ligando de heme a<sub>3</sub> é um imidazol, enquanto que Cu<sub>B</sub> é coordenado por três imidazoles de histidina. Resíduos de duas cisteínas, duas histidinas, uma metionina e um péptido carbonilo de um centro de Cu<sub>A</sub> (Cu-Cu) de coordenadas de glutamato (30). Esses relatos das estruturas de cristal abriram uma nova era na pesquisa de citocromo c oxidase (34). O quinto ligando de heme a<sub>3</sub> é um imidazol, enquanto que Cu<sub>B</sub> é coordenado por três imidazoles de histidina. Resíduos de duas cisteínas, duas histidinas, uma metionina e um péptido carbonilo de um centro de Cu<sub>A</sub> (Cu-Cu) de coordenadas de glutamato (30). Esses relatos das estruturas de cristal abriram uma nova

era na pesquisa de citocromo c oxidase (34).



**Figura 4.** O esquema de transferência eletrônica intramolecular para o centro da reação redox-ativo  $a_3$ -Cu<sub>B</sub> de citocromo c oxidase. Adaptado de (31).

Os elétrons são transferidos sequencialmente do citocromo c água-solúvel para o Cu<sub>A</sub> de citocromo c oxidase, depois para heme a, e para o centro binuclear  $a_3$ -Cu<sub>B</sub> (centro catalítico da citocromo c oxidase), onde o oxigênio é reduzido à água ( Figura 4). O oxigênio liga-se ao centro catalítico e é reduzido à água através de uma série de intermediários evasivos de curta duração. A análise de decomposição de valor singular indicou a presença de pelo menos sete intermediários (35). As espécies mais caracterizadas são as espécies de oxigênio ferroso e oxigênio (36-38).

De um modo geral, a oxidase do citocromo c pode ser totalmente oxidada (quatro centros de metal redox ativo: Cu<sub>A</sub>, Cu<sub>B</sub>, ferros em hemes a e  $a_3$ , Estão em seu estado de oxidação comum mais elevado;  $+3$  para ferro e  $+2$  para cobre) ou totalmente reduzidas (quatro centros metálicos estão em seu estado de oxidação inferior comum,  $+2$  para ferro e  $+1$  para cobre). A enzima parcialmente reduzida, geralmente chamada de valência mista, tem alguns centros metálicos em seu maior estado de oxidação e o restante em seu estado de oxidação mais baixo. Existem também várias formas de enzima oxidada: enzima rápida (reage relativamente rapidamente com cianeto), enzima lenta (reage em cerca de 1% da taxa de enzima rápida, também chamada enzima de repouso), enzima pulsada (obtida por redução Enzima lenta e oxidando-a com oxigênio em condições em que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é evitada), Enzima oxigenada (submetida a um ciclo de redução e reoxidação em condições em que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é produzido ) (38-40). Esses detalhes são dados para ilustrar o quão complicado e controverso ainda é a imagem geral da função da citocromo c oxidase.

Voltando à análise comparativa do espectro de ação na Figura 2 e aos dados espectroscópicos sobre a citocromo oxidase citada acima, sugeriu-se (9, 20) que a banda de 820 nm pertence principalmente ao Cu<sub>A</sub> oxidado, a banda de 760 nm para Diminuiu o Cu<sub>B</sub>, a banda de 680 nm para o Cu<sub>B</sub> oxidado e a banda de 620 para o Cu<sub>A</sub> reduzido (Figura 3). A faixa de 400-450 nm é mais provável que seja o envelope de algumas bandas de absorção na faixa de 350-500 nm (ou seja, Uma superposição de várias bandas). A faixa com um máximo de cerca de 404-420 nm pode ser atribuída ao heme

oxidado, enquanto que a borda de onda mais longa do envelope a 450 nm (devido à sua assimetria) deve ser atribuída ao Cu B reduzido . A participação do heme nos espectros de ação é confirmada pela relação de dose ideal ( $10$  e  $100 \text{ J / m}^2$  , respectivamente, para 404 e outros máxima da região visível, (3-5)). Note-se que a banda Soret de compostos de heme (ou seja, a banda na faixa de 400-420 nm) é mais intensa por uma ordem de grandeza do que as bandas de absorção desses compostos na região visível (24). A banda fraca a 330 nm pode pertencer ao Cu B oxidado . Assim, as bandas em 330, 404-420, 680 e 825 nm podem ser atribuídos a uma forma relativamente oxidada de citocromo c oxidase; O bordo da banda azul-violeta a 450 nm e as bandas distintas a 620 e 760 nm pertencem a uma forma relativamente reduzida da enzima. Esta análise (9, 20) foi realizada antes da estrutura tridimensional de raio X da citocromo c oxidase ser relatada (30-33). Os resultados de nossa análise não têm contradições principais com dados sobre a estrutura da citocromo c oxidase por Tsukihara et al. (30, 31). Deve-se enfatizar que cada banda nos espectros de absorção é resultado da absorção sobreposta de diferentes cromóforos, mas em um espectro de ação, nem todos podem aparecer.

Uma análise das formas de banda nos espectros de ação (Figura 3) e as relações de intensidade da linha nos permitiram concluir que a citocromo c oxidase não pode ser considerada como um fotorreceptor primário quando totalmente oxidado ou totalmente reduzido, mas somente quando está em uma das formas intermediárias (isto é, enzima de valência mista parcial ou mista) (9, 20).

Nossa sugestão de que o citocromo c oxidase é o fotoacceptor responsável por várias respostas celulares ligadas à terapia de luz na região do IR vermelho-a-próximo (9) foi posteriormente confirmada pelo trabalho de Pastore et al. (41), Wong-Riley et al. (11, 42) e Eells et al. (43, 44), bem como pelo nosso próprio trabalho espectroscópico descrito abaixo na próxima seção (45, 46). Mas somente quando está em uma das formas intermediárias (ie, parcialmente reduzida, ou enzima de valência mista) (9, 20). Nossa sugestão de que o citocromo c oxidase é o fotoacceptor responsável por várias respostas celulares ligadas à terapia de luz na região do IR vermelho-a-próximo (9) foi posteriormente confirmada pelo trabalho de Pastore et al. (41), Wong-Riley et al. (11, 42) e Eells et al. (43, 44), bem como pelo nosso próprio trabalho espectroscópico descrito abaixo na próxima seção (45, 46).

Foram realizados vários outros tipos de experiências (dependências de dose e intensidade para vários comprimentos de onda, irradiação dicromática de várias maneiras, modificação de experiências de irradiação por produtos químicos específicos e outros) (revisões: 1, 6, 9, 47, 48). Os resultados de todas essas experiências, juntamente com experimentos de espectroscopia de ação, que foram resumidos brevemente acima, permitiram concluir que o

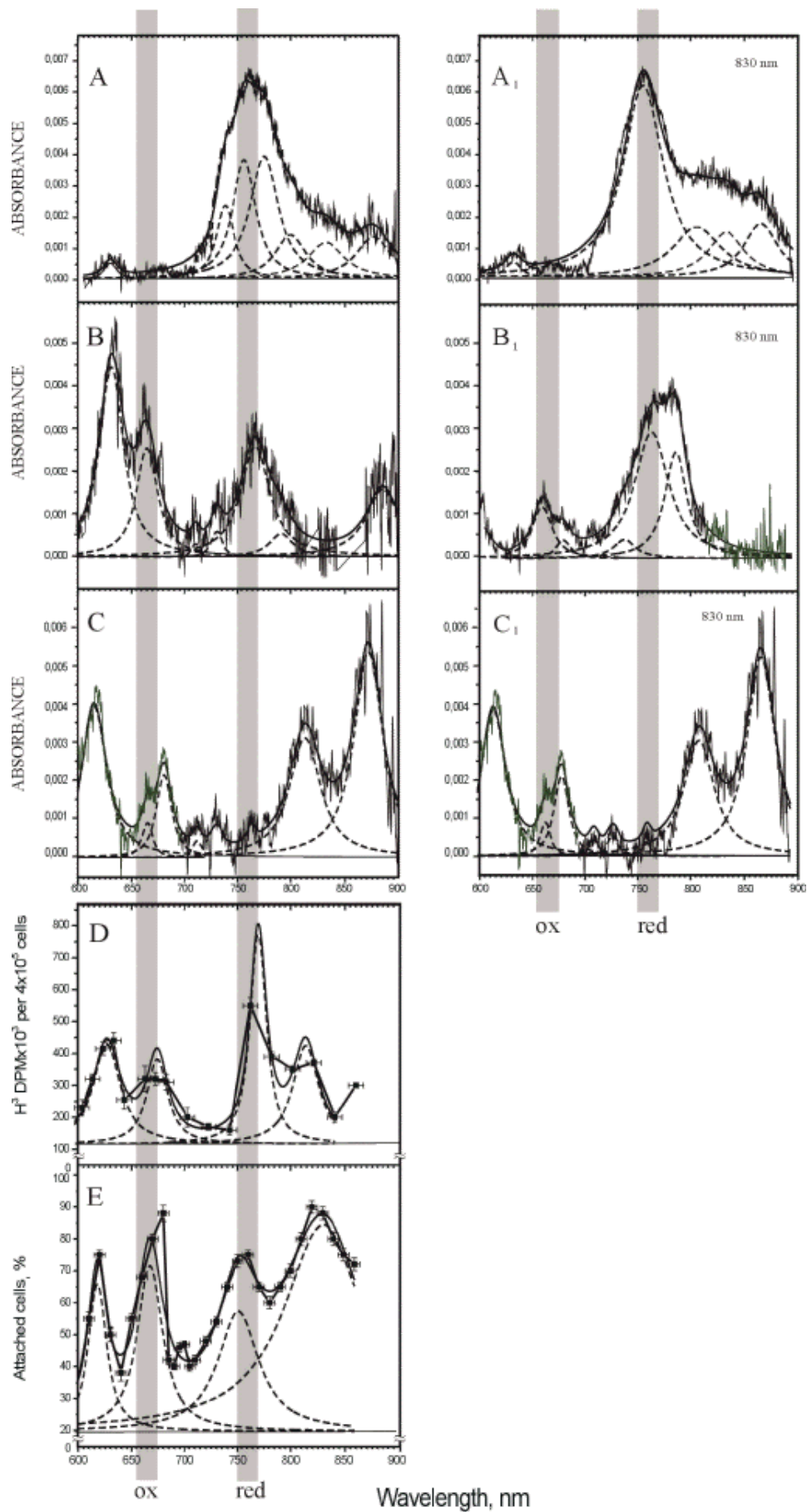
citocromo c oxidase poderia ser um fotoaceptor universal para células eucarióticas.

#### 4. COMPARAÇÃO DA AÇÃO E DA ESPECIFICAÇÃO DE ABSORÇÃO

Na medida em que um espectro de ação espelha o espectro de absorção da molécula que absorve a luz e é responsável pelo espectro de ação registrado, um passo importante na identificação dessa molécula fotabsorvente é a comparação dos espectros de ação e absorção .

Gravar um espectro de absorção de uma monocamada celular ou célula individual não é uma tarefa fácil, devido à fraca absorção e baixa concentração de cromóforos. Os espectros de absorção de células individuais foram registrados há anos atrás até 700 nm com o objetivo de identificar portadores de corrente respiratória (49, 50). O espectro de absorção de 8 monocamadas paralelas de fibroblastos humanos na região de IR vermelho-para-próximo foi registrado usando um espectrofotômetro de feixe duplo comercial (51). **O espectro de absorção de células inteiras na região visível foi qualitativamente similar ao de mitocôndrias isoladas (49).** *A extensão das medições ópticas da faixa espectral visível às regiões do extremo vermelho e próximo de IR (650-1000 nm) foi realizada no final dos anos setenta com o objetivo de monitorar o comportamento redox da citocromo c oxidase in vivo .* Esses estudos levaram à descoberta de uma "janela próxima do IR" no corpo e ao desenvolvimento de uma espectroscopia IR próxima para o monitoramento da oxigenação tecidual (52-54).

Para registrar a absorção de uma camada celular com o objetivo de estudar as mudanças induzidas pela radiação na absorção de cromóforos celulares, desenvolveu-se um método de registro multicanal (55, 56). A Figura 5 apresenta os espectros de absorção (AC),



**Figura 5.** Espectros de absorção da monocamada de células HeLa: (A-C) antes e (A<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>) após irradiação a 830 nm. A, A<sub>1</sub> (cuvete fechada), B, B<sub>1</sub> (cubeta aberta), C, C<sub>1</sub> (monocamada seca no ar). O espectro original, o ajuste da curva (linhas contínuas) e o encaixe Lorentziano (linhas tracejadas) são mostrados (adaptados de (57)).



Espectros de ação para: (D) estimulação da síntese de DNA e (E) estimulação da adesão celular HeLa a uma matriz de vidro, medida respectivamente 1,5 h após irradiação da monocamada de células HeLa ( $D = 100 \text{ J} / \text{m}^2$ ,  $t = 10 \text{ s}$ ,  $I = 10 \text{ W} / \text{m}^2$ ) e 30 min após a irradiação da suspensão de células HeLa ( $D = 52 \text{ J} / \text{m}^2$ ,  $t = 40 \text{ s}$ ,  $I = 1,3 \text{ W} / \text{m}^2$ ). As curvas experimentais (adaptadas -■-■-de (4, 5, 17)), encaixe de curva (linhas contínuas) e encaixes de Lorentzian (linhas tracejadas) são mostradas como descrito em (16).

As monocamadas celulares para todos os nossos experimentos foram cultivadas em cubetas fechadas. A primeira série de experiências sobre a gravação dos espectros de absorção antes e após a irradiação foram realizadas com as cubetas restantes fechadas. Um espectro típico registrado nestas condições antes da irradiação é apresentado na Figura 5A, e aquela registrada após a irradiação, na Figura 5A<sub>1</sub>. O Espectro A é caracterizado por uma forte absorção na região de 730-850 nm (as bandas resolvidas pelo método de ajuste de curva de Lorentzian estão em 736, 754, 773 e 797 nm, Tabela 3) e baixa absorção perto de 600 nm (a Banda simples a 630 nm) e acima de 800 nm (os picos a 830 e 874 nm são resolvidos, Tabela 3). Este é o espectro das células com a oxidase do citocromo c mais fortemente reduzida em nossas experiências. A irradiação das células causa as seguintes mudanças nas posições de pico neste espectro, como é evidente a partir do espectro A<sub>1</sub> apresentado na Figura 3 e na Tabela 3. A banda de baixa altura é resolvida na região vermelha a 634 nm. Um único pico forte é resolvido a 756 nm. As três bandas com as posições de pico em 807, 834 e 867 nm caracterizam a região dos comprimentos de onda em 800 nm. Como um todo, ambos os espectros, A e A<sub>1</sub>, têm bandas dominantes na região de 750-770 nm.

Um espectro típico das células com a oxidase citocromo c oxidada mais forte em nossos experimentos é apresentado na Figura 5C. Neste caso, as cubetas foram abertas durante 30 min para deixar secar a monocamada celular no ar. A banda vermelha neste espectro é resolvida a 616 nm, e as bandas distantes, a 665 e 681 nm. A região NIR é caracterizada por bandas fracas a 712, 730 e 762 nm, e por duas bandas fortes a 813 e 872 nm (Tabela 3). A irradiação desta monocamada não causou alterações no espectro de absorção, como mostrado na Figura 5 (espectro C<sub>1</sub>) e Tabela 3. Este não é um achado inesperado, porque as cadeias respiratórias não funcionam em células secas. Este experimento foi necessário para registrar o espectro das células com oxidase citocromo c oxidada. Como um todo, o espectro C na Figura 5 foi caracterizado por fortes bandas de absorção na região vermelha, bem como na região NIR de comprimentos de onda acima de 800 nm, e bandas extremamente fracas na região de 750-770 nm. Uma comparação entre os espectros A e C permite concluir que a banda a 750-770 nm é característica de moléculas de fotoacceptor relativamente reduzidas e a banda a 650-680 nm, Bem como a 800-870 nm, de oxidados.

Na terceira série de experiências, as cuvetes foram mantidas abertas durante 5 min antes de tomar medidas. Os espectros de absorção das células nessas condições são tipicamente caracterizados por uma banda a 633 nm na região vermelha e as bandas com a posição de pico em 666, 711, 730, 767, 791 e 880 nm no extremo vermelho e Regiões NIR (Figura 5, Tabela 3). A irradiação destas células provoca mudanças significativas nos espectros de absorção em todas as regiões espectrais (espectro B<sub>1</sub> na Figura 5). A banda a 750-800 nm torna-se dominante nos espectros das células irradiadas. Não há bandas resolvidas em

comprimentos de onda acima de 800 nm, bem como na região de 600-630 nm. Spectrum B<sub>1</sub> apresenta bandas com as posições de pico em 661, 681, 739, 765, E 788 nm (Tabela 3).

Portanto, realizamos um conjunto de experimentos para medir os espectros de absorção de células cultivadas na região ~ 600-860 nm, e comparamos esses espectros com os espectros de ação já registrados. Então, tivemos que verificar se houve alguma alteração nos espectros de absorção devido à irradiação.

**Table 3.** Peak positions in absorption and action spectra of HeLa cells in red-to-NIR region as resolved by Lorentzian fitting. A, B, C: absorption spectra before, and A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>: after irradiation at 830 nm. R<sub>1</sub>: mean-square deviation of fitting. Weak bands are marked with brackets. Adapted from [57].

Absorption spectra						Action spectra		Characterization
A	A <sub>1</sub>	B	B <sub>1</sub>	C	C <sub>1</sub>	D DNA synthe- -sis R <sup>2</sup> = 0.97	E Adhe- sion R <sup>2</sup> = 0.91	
R <sup>2</sup> = 0.99	R <sup>2</sup> = 0.98	R <sup>2</sup> = 0.95	R <sup>2</sup> = 0.98	R <sup>2</sup> = 0.95	R <sup>2</sup> = 0.95			
–	–	–	–	616	616	–	618	oxidized photoacceptor
(630)	(634)	633	–	–	–	624	–	reduced photoacceptor
–	–	666	661	665	665	672	668	gray line in Fig. 5 oxidized photoacceptor
–	–	–	681	681	681	–	–	
–	–	(711)	–	(712)	(712)	–	–	
736	–	(730)	739	(730)	(730)	–	–	
754	756	767	765	(762)	(762)	767	751	gray line in Fig. 5 reduced photoacceptor
773	–	–	–	–	–	–	–	
797	–	(791)	788	–	–	–	–	
–	807	–	–	813	813	813	–	
830	834	–	–	–	–	–	831	oxidized photoacceptor
874	867	880	–	872	872	not measu- red	not measu- red	

Para fins de caracterização quantitativa, bem como para comparação entre os espectros de absorção registrados, decidimos usar taxas de intensidade entre certas bandas de absorção. O uso de relações de intensidade da banda espectral para analisar vários espectros não é um problema novo para a espectroscopia em geral (58), mas, a nosso conhecimento, não foi utilizado na espectroscopia de absorção de mitocôndrias isoladas ou células vivas. O cálculo dos índices de intensidade mostrou proporcionar benefícios para a comparação exata de espectros na região IR (58). Utilizamos a banda presente em todos os espectros de absorção perto de 760 nm (exatamente em 754, 756, 767, 765 e 762 nm) (Tabela 3) como uma banda característica para o fotoacceptor relativamente reduzido. A banda usada por nós para caracterizar o fotoacceptor relativamente oxidado foi a próxima de 665 nm (exatamente em 666, 661, E 665 nm) nos espectros B, B<sub>1</sub>, C, C<sub>1</sub> (Tabela 3). Esta banda é tão fraca que não poderia ser resolvida pelo método de encaixe de Lorentzian nos espectros A e A<sub>1</sub>, pertencendo ao fotoacceptor mais fortemente reduzido em nossas experiências. Por esse motivo, utilizamos nos cálculos de intensidade para a absorção de espectro A e A<sub>1</sub> no nível de ajuste da curva a 665 nm. As linhas verticais cinzentas na Figura 5 marcam as bandas escolhidas. A razão de intensidade  $I_{760} / I_{665}$  foi calculada para caracterizar cada espectro.

Nestes cálculos simples, utilizamos apenas as intensidades de pico (alturas de pico), e não as intensidades integrais (áreas de pico) que são certamente necessárias para desenvolvimentos futuros. *No caso de concentrações iguais das formas reduzidas e oxidadas da molécula fotoacceptor, a razão  $I_{760} / I_{665}$  deve ser igual à unidade.* Quando as formas reduzidas prevalecem, a razão  $I_{760} / I_{665}$  é maior do que a unidade, e é menor que a unidade nos casos em que as formas oxidadas dominam. Lembre-se de que a transferência interna de elétrons dentro da molécula de citocromo c oxidase provoca a redução do oxigênio molecular através de vários intermediários transitórios de vários estados redox (38, 59-61).

A magnitude do critério  $I_{760} / I_{665}$  é de 9,5 para o espectro A (Figura 5), 1,0 para o espectro B e 0,36 para o espectro C. Por esse critério, *A irradiação das células, cujo espectro é marcado por A ( $I_{760} / I_{665} = 9,5$ ), causa a redução da molécula absorvente ( $I_{760} / I_{665}$  para o espectro A<sub>1</sub> é igual a 16).* A irradiação das células caracterizadas pelo espectro B também provoca a redução do fotoacceptor, como evidenciado pelo aumento da razão  $I_{760} / I_{665}$  de 1,0 a 2,5 no espectro B<sub>1</sub>. No espectro das células com fotoacceptor inicialmente mais reduzido (espectro A), a irradiação causa redução em menor grau ( $16 / 9,5 = 1,7$ ) do que nas células com fotoacceptor inicialmente menos reduzido (espectro B). A razão de intensidade neste caso é  $2.5 / 1 = 2.5$ .

A Figura 5 também apresenta dois espectros de ação, um para estimulação da síntese de DNA em nossas células HeLa (D), e o outro para a estimulação da ligação das células HeLa a uma matriz de vidro (E). Uma comparação das posições de pico nos espectros de absorção com esses dois espectros de ação (Tabela 3) mostra uma similaridade entre eles.

A forma oxidada da citocromo c oxidase possui uma ampla banda de absorção acima de 800 nm centrada a 830 nm (62). O Cu<sub>A</sub>, um complexo de cobre dimérico com quatro ligandos, é responsável por 77% da absorção a 810-820 nm, enquanto a contribuição de heme a e heme a<sub>3</sub> / Cu<sub>B</sub> é de 18 e 5%, respectivamente (59). Devido à dominação da forte absorção de Cu<sub>A</sub> nesta região, linhas subjacentes fracas são mascaradas no espectro de absorção da citocromo c oxidase (63). Uma distância de 33,5 nm entre as posições de pico mínima e máxima nos espectros (Tabela 1) é muito longa para ser explicada por erro de medição (por exemplo, FWHM de luz de irradiação 10 ou 14 nm). Provavelmente, diferentes linhas nos espectros de absorção de intermediários de citocromo c oxidase aparecem nos espectros de ação. Esta sugestão, no entanto, requer mais provas experimentais.

Um estudo dos espectros de absorção de IR próximo da citocromo c oxidase ligada à membrana a baixa temperatura mostra que há vestígios sobrepostos cobrindo a faixa de comprimento de onda total de 680 a 870 nm (64-66). A fotólise instantânea provoca a formação de um composto de valência misto com um pico de 740-750 nm, que supostamente poderia pertencer ao cobre invisível (Cu<sub>B</sub>) (67). Uma banda a ~ 785 nm está presente em um heme ferroso coordenado totalmente reduzido, não gravado, com  $\text{Fe}^{2+}$  (68). A adição de monóxido de carbono à enzima reduzida causa uma mudança azul de 785 nm para 760 nm no espectro de diferença, e a fotodissociação de CO resulta em uma reversão da banda de 760 a 784 nm (63).

Na faixa de comprimento de onda 670-680 nm, não existem bandas de absorção de intermediários de citocromo c oxidase registrados até o momento. Uma pequena banda de absorção pertencente a um

intermediário (composto A) foi registrada a  $\sim 660$  nm (59). A aparência da banda de absorção de 655 nm sugere que Cu<sub>B</sub> é oxidado e participa de um estado de rotação (69). Sugere-se que o recurso de 655 nm pode surgir a partir de uma banda de transferência de carga de ferro heme de alta rotação  $\mu_3$ , que é modulada pelo estado redox de Cu<sub>B</sub>. A banda de 655 nm desaparece à medida que o centro binuclear é reduzido (70). Provavelmente, esta é uma linha nos espectros de absorção de citocromo c oxidase e / ou seus intermediários.

É bem sabido que a redução da cicatricção c oxidase tem um pico a 605 nm, e esse pico foi registrado tanto nas mitocôndrias como nas células inteiras (71). Para a citocromo c oxidase ligada à membrana, este pico pode ser deslocado em vermelho  $\sim 10$  nm, em comparação com a enzima solubilizada (69). Alguns intermediários peróxicos isospectrais têm um pico a  $\sim 607$  nm em seus espectros de absorção (59). A absorção desta região é de 75% devido ao baixo teor de hema a e 25% por alta hema a<sub>3</sub>. No entanto, uma contribuição definitiva de Cu<sub>A</sub> em  $\sim 615$  nm também foi sugerida (72).

A mesma técnica de medidas de absorção descrita em (57) foi utilizada para estudar a oxidação ou a redução do fotoacceptor sob irradiação a  $\lambda = 632,8$  nm em função da dose (46).

A comparação dos espectros de ação ligados às reações no núcleo celular e os espectros de absorção de monocamadas celulares em (600-860 nm permitem concluir que, por posições de pico, esses dois grupos de espectros podem pertencer à mesma molécula.

## 5. SINALIZAÇÃO MITOCHONDRIAL: COMO O SINAL GERAIS LEGAIS EM MITOCHONDRIA pode INFLUIR AO METABOLISMO CELULAR

Sabemos dos **espectros** de ação que a taxa de síntese de DNA e RNA é influenciada pela irradiação (Seção 2), e sabemos que o fotoacceptor (tentativamente citocromo c oxidase) Está localizado nas mitocôndrias (Seção 3). Há uma questão importante a seguir: como o sinal gerado pelos quanta de luz na citocromo c oxidase é transduzido para o núcleo. A resposta é que a **sinalização retrógrada mitocondrial** bastante provável é responsável por isso. Os leitores interessados são orientados para uma revisão recente (73), no entanto, abaixo é um breve resumo.

O trabalho recente descobriu um número impressionante de fatores mitocondriais extras que regulam a expressão de genes nucleares para proteínas mitocondriais. **No entanto, relativamente pouco se sabe sobre como as mitocôndrias enviam sinais ao núcleo e como o núcleo controla a expressão de genes individuais. Um caminho de comunicação nas células da mitocôndria ao núcleo que influencia muitas atividades celulares em condições normais e fisiopatológicas é a sinalização retrógrada mitocondrial (74, 75). Esta sinalização recentemente descoberta é uma via de sinalização oposta a uma via comum e bem definida que transforma a informação do núcleo e do citoplasma para as mitocôndrias. A sinalização retrógrada mitocondrial envia informações de volta ao núcleo sobre mudanças no estado funcional das mitocôndrias.**

A existência de uma via de sinalização celular: citoplasma das → mitocôndrias → ( → citoplasma da membrana plasmática) → , núcleo, **Foi proposto em 1988 (8). O motivo para sugerir a existência de uma via de sinalização celular (então chamada de transdutor fotosignal e cadeia de amplificação) foi simples. Parecia que os espectros de ação para o aumento da taxa de síntese de DNA e RNA poderiam ser registrados quando as células cultivadas são irradiadas na região de 300 a 860 nm. O núcleo não possui cromóforos absorvendo nesta região. Em segundo lugar, os dados coletados até o momento mostraram que os fotoacceptores estão localizados na cadeia respiratória. Então, então, era lógico supor a existência de cascatas de sinalização celular entre organelas. Em 2004, descobriu-se uma nova via de sinalização mitocondrial em células de mamíferos ativadas por radiação vermelha e quase IR (76). Foi mostrado por Schroeder et al. (77) que a radiação IR-A (760-1440 nm), em contraste com a radiação UV, Provoca uma resposta de sinalização retrógrada em fibroblastos normais da pele humana.**

A Figura 6 apresenta um esquema putativo de sinalização retrógrada mitocondrial ativado por radiação nas regiões visíveis e IR-A. Este esquema foi proposto pela primeira vez em 1988 (8, revisão: 47) e depois complementado com novos detalhes de acordo com novos dados experimentais (1, 9). Algumas novas modificações também estão incluídas no esquema atual na Figura 6. A

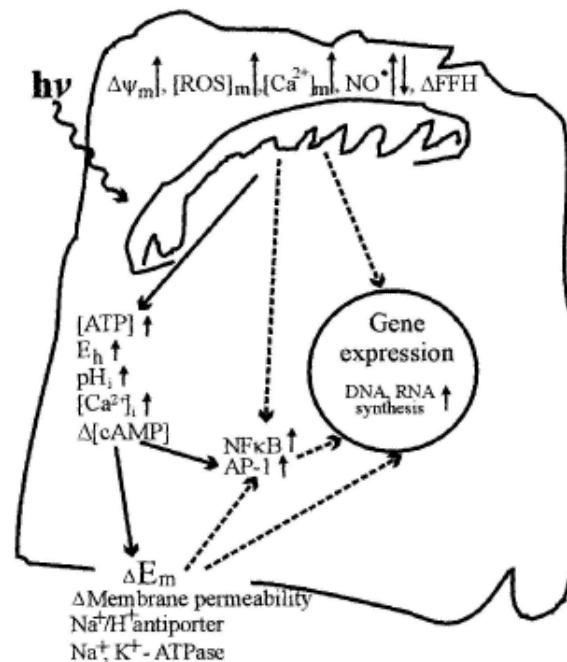
sinalização retrógrada mitocondrial foi inicialmente definida por um potencial de membrana mitocondrial alterada  $\Delta\Psi_m$ (74). Posteriormente, foram introduzidas outras características, como mudanças na concentração de ROS mitocondrial,  $Ca^{2+}$  e óxido nítrico, bem como mudanças na homeostase de fusão-fusão de mitocôndrias (75). **As mudanças nessas características sob a irradiação com luz em diferentes comprimentos de onda seguem um padrão cíclico. Primeiro, uma estimulação caracterizada por um limiar e uma fase de aumento ocorre. Após um máximo rigoroso e uma fase de diminuição, o nível de controle é atingido.**  $\Delta\Psi_m$  Como exemplo, no nível de uma única célula e durante a gravação em tempo real, observou-se um aumento máximo do potencial de membrana mitocondrial (30% do seu valor basal) aos 2 min após uma irradiação de 15 s a 647 nm. Em seguida,  $\Delta\Psi_m$  diminuiu gradualmente para o nível basal, que foi alcançado 4 minutos depois (78). Os dados experimentais sobre a modulação de elementos da sinalização retrógrada mitocondrial por irradiação são revisados em (73).

A irradiação de células de mamíferos causa uma regulação positiva de vários genes (78). A regulação positiva dos genes, **E o aumento da taxa de síntese de DNA e RNA (Secções 1, 2) estão marcados na Figura 6 no núcleo da célula. A técnica de microarray de cDNA foi utilizada para fibroblastos humanos irradiados a 628 nm (79). Dos 9982 perfis de expressão gênica estudados, 111 genes em 10 categorias de funções foram upregulated. Note-se que entre essas 10 categorias de funções, 7 delas estavam diretamente ou indiretamente envolvidas na proliferação celular. As outras 3 categorias de funções reguladas foram genes relacionados a fatores de transcrição, imune / inflamação e citocinas, bem como alguns genes não identificados (79).**

Deve-se notar que as respostas das células de mamíferos à radiação IR



visível e próxima, bem como a sensibilidade dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial a esta radiação nunca ganharam atenção tão grande por fotobiologistas, **Assim como os fotoaceptores funcionais, como a clorofila e a rododose. No entanto, o conhecimento fragmentado reunido até agora força um a perguntar se a fotossensibilidade de algumas enzimas da cadeia respiratória mitocondrial pode ter um significado fisiológico apesar da adaptação completa dos sistemas vivos aos fótons como um fator externo natural.**



**Figure 6.** A schematic explaining putative mitochondrial retrograde signaling pathways after absorption visible and IR-A radiation (marked  $h\nu$ ) by the photoacceptor, cytochrome c oxidase. Arrows  $\uparrow$  and  $\downarrow$  mark increase or decrease of the values, brackets  $[ ]$  mark concentration.  $\Delta FFH$  = changes in mitochondrial fusion-fission homeostasis; AP-1 = activator protein-1; NF- $\kappa$ B = nuclear factor kappa B. Experimentally proved ( $\rightarrow$ ) and theoretically suggested ( $----->$ ) pathways are shown. Details are described in (73).

Há todos os motivos para acreditar, com base em dados experimentais reunidos até agora, que a sinalização retrógrada mitocondrial, uma via de sinalização celular recentemente descoberta, também funciona em células irradiadas. A modulação de elementos de sinalização mitocondriais retrógrados como  $\Delta\Psi_m$ ,  $(ROS)_m$ ,  $(Ca^{2+})_m$  em células irradiadas está bem documentada (revisão: 73). Além disso, as respostas à irradiação que ocorrem no núcleo (ou seja, aumento da taxa de síntese de DNA e RNA e expressão de genes de várias categorias de função) são definitivamente documentadas. No entanto, as vias de transdução de sinal de luz entre estas duas extremidades precisam de mais investigação.

1. A similaridade dos espectros de ação para diferentes respostas celulares sugere que o fotoacceptor é o mesmo para essas respostas. Para as respostas relatadas aqui, o fotoacceptor parece ser citocromo c oxidase. Lembre-se de que foi sugerido em 1981 que a fotossensibilidade poderia ser uma propriedade mitocondrial comum em animais superiores e poderia ter significado fisiológico em certas condições, por exemplo, exposição a luz vermelha-laranja e níveis altos de ADP (80).

2. Com base nestes espectros de ação, vários comprimentos de onda podem ser usados para terapia de luz de baixo nível, ou seja, em torno de 404, 620, 680, 760 e 820 nm.

3. A existência dos espectros de ação para processos bioquímicos que ocorrem em várias organelas celulares (núcleo, **Membrana plasmática**) **assumem a existência de caminhos de sinalização celular entre um fotoacceptor nas mitocôndrias e o núcleo, bem como entre o fotoacceptor e a membrana plasmática.**

4. Acredita-se que o "mecanismo mitocondrial" da terapia de luz de baixo nível funciona em todos os tipos de células contendo mitocôndrias (1).

## REFERÊNCIAS

1. T. Karu (2007). "Dez lições sobre ciência básica da fototerapia com laser" Prima Books AB, Grngesberg (Suécia).

2. Hartmann, KM (1983). Espectroscopia de ação, em W. Hoppe, W. Lohmann, H. Marke, H. Ziegler (Eds.). A biofísica, Springer: Heidelberg, Ch. 3.2.7. Pp.115-144.

3. Karu, TI, Kalendo, GS, Letokhov, VS e Lobko VV (1982). Biostimulação de células HeLa por luz visível de baixa intensidade. Nuovo Cimento D, 1, 828-840.

4. Karu, TI, Kalendo, GS, Letokhov, VS e Lobko VV (1984). Biostimulação de células HeLa por luz visível de baixa intensidade. II. Estimulação da síntese de DNA e RNA em uma ampla faixa espectral. Nuovo Cimento D, 3, 308-318.

5. Karu, TI, Kalendo, GS, Letokhov, VS e Lobko VV (1984). Biostimulação de células HeLa por luz visível de baixa intensidade. III Estimulação da síntese de ácido nucleico em células da fase do platô. Nuovo Cimento D, 3, 319-325.

6. Karu TI (1987). Fundamentos fotobiológicos de terapia a laser de baixa potência. IEEE J. Quantum Electronics, QE-23, 1703-1717.

7. Karu, TI, Letokhov, VS e Lobko VV (1985). Biostimulação de células HeLa por luz visível de baixa intensidade. IV. Irradiação dicromática. Nuovo Cimento D, 5, 483-496.

8. Karu TI (1988). **Mecanismo molecular do efeito terapêutico da radiação laser de baixa intensidade. Lasers Life Sci., 2, 53-74.**

9. Karu TI (1999). Mecanismos de ação primários e secundários de radiação IR visível a proxima nas células. J. Photochem. Photobiol. B: Biologia, 49, 1-17.

10. Tiphlova, O. e Karu, T. (1991). Ação de radiação laser de baixa intensidade em *Escherichia coli*. CRC Critical Rev. Biomed. Eng., 18, 387-412.
11. Wong-Riley, MTT, Liang, HL Eells, JT, Chance B., Henry, MM, Buchmann, E., Kane, M. e Whelan, HT (2005). A fotobiomodulação beneficia diretamente os neurônios primários funcionalmente inativados pelas toxinas: papel da citocromo c oxidase. J. Biol. Chem., 280, 4761-4771.
12. Szacilowski, K., Macyk, W. Drzewiecka-Matuszek, A., Brindell, M. e Stochel, G. (2005). **Fotoquímica bioincorgrânica: fronteiras e mecanismos. Chem. Rev. 105, 2647-2694.**
13. Abraço, DN (1978). A ativação de enzimas com luz. Em: Photochem. Photobiol. Rev. Ed. Por K. Smith, Nova York, Londres: Plenum Press, vol. 3, pp. 1-33.
14. Hug, DN e Hunter, YK (1991). Fotomodulação de enzimas. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 10, 3-22.
15. Jagger, J. (2004). Reflexões pessoais em monocromadores e espectros de ação para fotoreativação. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 73, 109-114.
16. Karu, TI e Kolyakov, SF (2005). Espectros de ação exata para respostas celulares relevantes para fototerapia. Fotomed. Laser Surg. 23, 355-361.
17. Karu, TI, Pyatibrat, LV, Kalendo, GS e Esenaliev, RO (1996). **Efeitos da luz monocromática de baixa intensidade e irradiação laser na adesão de células HeLa in vitro. Lasers Surg. Med., 18, 171-177.**
18. van Breugel, HHFI e Dop Bar, PR (1992). A densidade de potência eo tempo de exposição da irradiação a laser He-Ne são mais importantes do que a dose de energia total na fotobiomodulação de fibroblastos humanos in vitro. Laser Surg. Med., 12, 528-537.
19. Karu, T., Tiphlova, O., Esenaliev, R. e Letokhov, V. (1994). Dois mecanismos diferentes de efeitos fotobiológicos a laser de baixa intensidade em *Escherichia coli*. J. Photochem. Photobiol. B: Biologia, 24, 155-161.
20. Karu, TI e Afanasyeva, NI (1995). Chytochrome oxidase como fotoacceptor primário para células cultivadas em regiões IR visíveis e próximas. Doklady Akad. Nauk (Moscou) 342, 693-695.
21. Wilkinson, G., Gillard, **RD e McCleverty, JA, Eds. (1987). Química de Coordenação Integral. Oxford: Pergamon Press, vol. 1-7.**
22. Siegel, H. Ed. (1971-1981). Ions de Metal em Sistemas Biológicos. Nova York, Basileia: M. Dekker, v. 1-13.
23. Hughes, M. (1987). Compostos de Coordenação em Biologia. Em: Química de Coordenação Integral. Ed. Por G. Wilkinson, RD Gilland e JA McCleverty, Oxford: Pergamon Press, vol. 6, pp. 541-753.
24. Gouterman, M. (1978). Espectros ópticos e estrutura eletrônica de

porfirinas e anéis relacionados. Em: The Porphyrins. Ed. Por D. Dolphin. Nova Iorque: Acad. Pressione, v. 3, pp. 1-16.

25. Hathaway, BJ (1987). Cobre. Em: Química de Coordenação Integral. Ed. Por G. Wilkinson, RD Gillard e JA McCleverty. Oxford: Pergamon Press, vol. 5, pp.534-774.

26. Lontie, R., Ed. **(1984). Proteínas de Cobre e Enzimas de Cobre. Boca Raton: CRC Press, v. 1-3.**

27. Spiro, G., Ed. (1981). Proteínas de cobre. Nova Iorque: Wiley Intersci.

28. Karlin, D. e Zubieta, J., Eds. (1983). Coaching Coordination Chemistry. Nova Iorque: Acad. Pressione.

29. Brunori, M. e Chance, B., Eds. (1988). Citocromo Oxidase: Estrutura, Função e Fisiopatologia. Ann. NY Acad. Sci., V. 550.

30. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. , E Yoshikawa, S. (1995). Estruturas de locais metálicos de citocromo c oxidase de coração bovino oxidado a 2,8 Å. Ciência 269, 1069-1074.

31. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. e Yoshikawa, S. ( 1996). **A estrutura inteira da 13-subunidade oxidou a citocromo c oxidase a 2,8 Å. Science 272, 1136-1144.**

32. Gennis, R. e Ferguson-Miller, S. (1995). Estrutura da citocromo c oxidase, gerador de energia da vida aeróbica. Science 269, 1063-1064.

33. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. e Michel, H. (1995). Estrutura de 2,8 Å de resolução de citocromo c oxidase de Paracoccus denitrificans. Natureza 376, 660-669.

34. Yoshikawa, S. (1997). Coração da carne de citocromo c oxidase. Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 574-579.

35. Sucheta, A., Georgiadis, KE e Einarsdottir, O. (1997). Mecanismo de redução do dioxígeno catalítico com citocromo c oxidase: evidência de intermediários peroxi e ferryl à temperatura ambiente. Bioquímica 36, 554-565.

36. Babcock, GT e Wikström, M. (1992). **Ativação de oxigênio e conservação de energia na respiração celular. Nature 356, 301-309.**

37. Verkhovsky, MI, Morgan, JE e Wikström, M. (1996). Transições de Redox entre intermediários de oxigênio em citocromo c oxidase. Proc. Acad. Sci. USA 93, 12235-12339.

38. Brunori, M., Giuffrè, A. e Sarti, P. (2005). Cytochrome c oxidase, ligandos e elétrons. J. Inorg. Biochem. 99, 324-336.

39. Capaldi, RA (1990). Estrutura e função da citocromo c oxidase. Annu. Rev. Biochem. 59, 569-596.

40. Palmer, G. (1993). Problemas atuais na química da citocromo c

oxidase. J. Bioenerg. Biomembr. 25, 145-151.

41. Pastore, D., Greco, M. e Passarella, S. (2000). Sensibilidade específica ao laser de hélio-néon da citocromo c oxidase purificada. Int. J. Rad. Biol. 76, 863-870.

42. Wong-Riley, MT, Bai, X., Buchman, E. e Whelan, HT (2001). O tratamento com diodos emissores de luz reverte o efeito do TTX na citocromo c oxidase nos neurônios. Neuroreport 12, 3033-3037.

43. Eells, JT, Henry, MM, Summerfelt, P., Wong-Riley, MT, Buchmann, EV, Kane, M., Whelan, NT e Whelan, HT (2003). Fotobiomodulação terapêutica para toxicidade retiniana induzida por metanol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 3439-3444.

44. Eells, J., Wong-Riley, MT, VerHoeve, J., Henry, M., Buchman, EV, Kane, MP, Gould, LJ, Das, R., Jett, M., Hodgson, BD, Margolis, D., e Whelan, HT (2004). Introdução do sinal mitocondrial na cicatrização acelerada e cura da retina por terapia de luz do infravermelho próximo. Mitochondria 4, 559-567.

45. Karu, TI, Pyatibrat, LV Kolyakov, SF e Afanasyeva, NI **(2005). Medições de absorção de uma monocamada celular relevante para fototerapia: redução da oxidase do citocromo c sob uma radiação IR próxima. Photochem. Photobiol. B: Biol. 81, 98-106.**

46. Karu, TI, Pyatibrat, LV, Kolyakov, S. e Afanasyeva, NI (2008). Medições de absorção de monocamadas de células relevantes para mecanismos de fototerapia a laser: redução ou oxidação da citocromo c oxidase sob radiação laser a 632,8 nm. Fotomedicina e cirurgia a laser, 26 (na imprensa). 47. Karu, T. (1989). Fotobiologia de efeitos de laser de baixa potência. Health Phys. 56, 691-704.

48. Karu, TI (1989). Fotobiologia da Laser Therapy de baixa potência. Chur, Londres: Harwood Acad. Publ.

49. Chance, B. e Hess, B. (1959). Evidência espectroscópica de controle metabólico. Science 129, 700-708.

50. Nicholls, P. e Elliot, WB **(1974). Os citocromos. Em: Ferro em Bioquímica e Medicina. Ed por A. Jacobs e M. Worwood, Londres, Nova Iorque: Acad. Pressione, pp. 221-272.**

51. van Breugel, HH e Dop Bär, PR (1992). A densidade de potência e o tempo de exposição da irradiação laser He-Ne são mais importantes do que a dose total de energia na foto-biomodulação de fibroblastos humanos in vitro. Lasers Surg. Med. 12, 528-537.

52. Jöbsis, FF (1977). Monitoramento infra-vermelho não-invasivo de suficiência cerebral e miocárdica de oxigênio e parâmetros circulantes. Science 198, 1264-1267.

53. Jöbsis-vander Vliet, FF (1999). Descoberta da janela do infravermelho próximo para o corpo e o desenvolvimento precoce da espectroscopia do infravermelho próximo. J. Biomed. Optar. 4, 392-396.

54. Cooper, C. e Springett, IR (1997). **Medição de citocromo c oxidase e energética mitocondrial por espectroscopia de infravermelho próximo. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 352, 669-**



55. Karu, TI, Afanasyeva, NI, Kolyakov, SF e Pyatibrat, LV (1998). Mudança no espectro de absorção de uma monocamada de células vivas sob irradiação a laser de baixa intensidade. Dokl. Akad. Nauk. (Moscou) 360, 267-270.

56. Karu, TI, Afanasyeva, NI, Kolyakov, SF, Pyatibrat, LV e Welser, L. (2001). Alterações na absorvância da monocamada de células vivas induzidas por radiação laser em 633, 670 e 820 nm. IEEE Select. Tópicos Quantum Electr. 7, 982-988.

57. Karu, TI, Pyatibrat, LV Kolyakov, SF e Afanasyeva, NI (2005). Medições de absorção de uma monocamada celular relevante para fototerapia: redução da oxidase do citocromo c sob uma radiação IR próxima. Photochem. **Photobiol. B: Biol.** **81, 98-106.**

58. Smith, B. (1986). Fundamentos da espectroscopia de infravermelho de transformação de Fourier. Nova York: CRC Press.

59. Szundi, I., Liao, G.-L., e Einarsdottir, O. (2001). Estudos de absorção óptica resolvidos pelo tempo do infravermelho próximo da reação de citocinco c oxidase completamente reduzida com dióxigeno. Bioquímica 40, 2332-2339.

60. Szundi, I., Cappuccio, J. e Einarsdottir, O. (2004). A análise de amplitude dos dados de absorção dependentes do tempo de um único comprimento de onda não suporta o mecanismo sequencial convencional para a redução do dióxido de água catalisada pela citocromo c oxidase do coração bovino. Bioquímica 43, 15746-15758.

61. Richter, O.-M. E Ludwig, B. (2003). Citocromo c oxidase - estrutura, função e fisiologia de uma máquina molecular redox. Rev. Physiol. Biochem. **Pharmacol.** **147, 47-74.**

62. Griffiths, DE e Wharton, DC (1961). Estudos do sistema de transporte de elétrons. XXXV. Purificação e propriedades da citocromo oxidase. J. Biol. Chem., 236, 1850-1856.

63. Rich, PR, Moody, AJ e Ingledew, WJ (1992). Detecção de banda de absorção infravermelha próxima de ferrohaem a  $\pi$  em citocromo c oxidase. FEBS Lett. 305, 171-173.

64. Shaw, RW, Hansen, RE e Beinert, H. (1979). As reações de oxigênio da redução da oxidase do citocromo c. Posição de uma forma com um sinal EPR incomum na sequência de intermediários iniciais. Biochim. Biophys. Acta 548, 386-396.

65. Beinert, H., Hansen, RE e Hartzell, CR (1976). Estudos cinéticos sobre citocromo c oxidase por epr combinado e espectroscopia de reflectância após congelamento rápido. Biochim. Biophys. **Acta** **423, 339-335.**

66. Beinert, H., Shaw, RW, Hansen, RE e Hartzell, CR (1980). Estudos sobre a origem da absorção do citocromo c oxidase no meio do infravermelho próximo (800-900). Biochim. Biophys. Acta 591, 458-470.

67. Chance, B. e Leigh, JS (1977). Intermediários de oxigênio e estados de valência mista de citocromo c oxidase: espectros de diferença de

absorção infravermelha dos compostos A, B e C de citocromo oxidase e oxigênio. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 74, 4777-4780.

68. Einarsdottir, O., Georgiadis, KE e Dawes, TD (1992). Evidencia de um análogo da banda III nos espectros de absorção do infravermelho próximo da citócter c oxidase. Biochem. Biophys. Res. Comm., 184, 1035-1041.

69. Clore, M. (1980). **Caracterização dos intermediários na reação de citocromo oxidase de estado de valência misturada com membrana com oxigênio a baixas temperaturas por espectroscopia óptica na região visível. Biochem. J. 187, 617-622.**

70. Mitchell, R., Mitchell, P. e Rich, P. (1991). A atribuição de banda espectral de 655 nm de citocromo c oxidase. FEBS Lett., 280, 321-324.

71. Chance, B. e Hess, B. (1959). Evidência espectroscópica de controle metabólico. Science, 129, 700-708.

72. Brunori, M., Antonini, E. e Wilson, MT (1981). Cytochrome c oxidase: uma visão geral do trabalho recente. Em: H. Siegel, (Ed.). Ions de metal em sistemas biológicos M. Dekker: NY, Basel, vol. 13, pp. 187-228.

73. Karu, T. (2008). Sinalização mitocondrial em células de mamíferos ativadas por radiação vermelha e quase IR. Photochem. Photobiol. 84, **1091-1099.**

74. Butow, RA e NG Avadhani (2004) Sinalização mitocondrial: a resposta retrógrada. Mol. Célula. 14, 1-15.

75. Ryan, MT e NJ Hoogenraad (2007) Comunicações nucleares mitocondriais. Annu. Rev. Biochem. 76, 701-722.

76. Karu, T., Pyatibrat, L. e Afanasyeva, N. (2004). Uma nova via de sinalização mitocondrial ativada por radiação infravermelha visível para perto. Photochem. Photobiol. 80, 366-372.

77. Schroeder, P., C. Pohl, C. Calles, C. Marks, S. Wild e J. Krutmann. (2007). A resposta celular à radiação infravermelha envolve a sinalização mitocondrial retrógrada. Free Rad. Biol. Med. 43, 128-135.

78. Zhang, Y., Song, S., Fong, C.-C., Tsang, C.-H., Yang, Z. e Yang, M. (2003). **Análise de microarrays de cDNA de perfis de expressão gênica em células de fibroblastos humanas irradiadas com luz vermelha. J. Invest. Dermatol. 120, 849-857.**

79. Alexandratou, E., D. Yova, P. Handris, D. Kletsas e S. Loukas (2002) Alterações de fibroblastos humanos induzidas por irradiação a laser de baixa potência no nível de célula única usando microscopia confocal. Photochem. Photobiol. Sci. 1, 547-552.

80. Kato, M., K. Sinizawa e S. Yoshikawa (1981). O citocromo c oxidase é um possível fotoacceptor nas mitocôndrias. Photochem. Photobiophys. 2, 263-269.

14/10/08 **Photobiol. Sci. 1, 547-552.** 80. Kato, M., K. Sinizawa e S. Yoshikawa (1981). O citocromo c oxidase é um possível fotoacceptor nas mitocôndrias. Photochem. Photobiophys. 2, 263-269. 14/10/08

**Photobiol. Sci. 1, 547-552.** 80. Kato, M., K. Sinizawa e S. Yoshikawa (1981). O citocromo c oxidase é um possível fotoacceptor nas mitocôndrias. Photochem. Photobiophys. 2, 263-269. 14/10/08

[\[ TOPO \]](#)