

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Programa de Pós-Graduação em Biociências

Andrezza Maria Côrtes Thomé

Avaliação do efeito de *lasers* monocromáticos e dicromáticos de baixa potência em culturas de *Pantoea agglomerans*

Rio de Janeiro 2017 Andrezza Maria Côrtes Thomé

Avaliação do efeito de lasers monocromáticos e dicromáticos de baixa

potência em culturas de Pantoea agglomerans

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biociências ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca

Rio de Janeiro 2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T452	 Thomé, Andrezza Maria Côrtes. Avaliação do efeito de <i>lasers</i> monocromáticos e dicromáticos de baixa potência em culturas de <i>Pantoea agglomerans</i> / Andrezza Maria Côrtes Thomé. – 2017. 73 f.
	Orientador: Adenilson de Souza da Fonseca.
	Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.
	1. Terapia com luz de baixa intensidade – Teses. 2. Cicatrização de feridas - Teses. 3. Pantoea. 4. Ferimentos e lesões – Tratamentos - Teses. I. Fonseca, Adenilson de Souza da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.
	CDU 616.314

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Andrezza Maria Côrtes Thomé

Avaliação do efeito de *lasers* monocromáticos e dicromáticos de baixa potência em culturas de *Pantoea agglomerans*

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biociências ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em 27 de julho de 2017.

Banca Examinadora:

Prof.⁻ Dr. Adenilson de Souza da Fonseca (Orientador) Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof.⁻ Dr. Eduardo Tavares Lima Trajano Universidade Severino Sombra

Prof.⁻ Dr. André Luiz Mencalha Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

> Rio de Janeiro 2017

DEDICATÓRIA

À minha família que me deu todo suporte para que eu alcançasse meus objetivos. Aos amigos, por tornarem mais leve a jornada. Aos meus pacientes, a inspiração para este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus pelo dom da vida, pela proteção e perseverança que me concedeu para ultrapassar os obstáculos encontrados durante a pós-graduação, a Nossa Senhora de Aparecida que a todo instante se faz presente em minha vida, no instante que sentia fraqueza, me fortalecia pela fé.

O grande diferencial em minha vida são as pessoas que estão ao meu redor, neste sentido, caso um dia hesitei em acreditar que o mundo conspira ao nosso favor, realmente, estava errada. A força que recebi das pessoas que acreditaram em mim foi superior a qualquer perspectiva que poderia ter em minha vida.

Desde a graduação, passei por grandes exemplos de orientadores. Ao entrar no mestrado, o professor Adenilson, não apenas aceitou me orientar, mas acreditou em mim e mais do que isto, me mostrou que posso fazer diferença na vida das pessoas, seja dos pacientes ou na vida acadêmica, sempre com paciência, humildade, dedicação e cooperação.

Não posso jamais afirmar que foi fácil, mas as pessoas que encontrei nesta jornada tornaram este período mais leve e, até mesmo engraçado. Foram as gargalhadas da Larissa, conselhos da Solange, o jeito acolhedor e iluminado do Luiz, a praticidade da Keila, a calma da Isis, a sapiência do Adilson, a política da paz e organização da Layane, sem contar com todo o apoio dos alunos da Universidade Severino Sombra, Bianca, Bruna, João Pedro e Adriano, tenho grande orgulho desta equipe.

E, claro, minha família e meu noivo são os alicerces. Meus pais são os maiores exemplos para mim de perseverança e companheirismo. Meu pai sempre passou que o trabalho era o engrandecedor e que cada problema seria resolvido em seu tempo, precisamos ter calma, pensar no próximo e acreditar. Minha mãe, a todo o momento, demonstrou que para vencer a gente precisa estudar, podemos perder tudo, mas ninguém nos retira o conhecimento adquirido e o quão é importante em agradecer a cada vírgula da nossa história, pois mesmo que um momento seja ruim, devemos encarar como apenas uma tempestade passageira que vai molhar e ajudar a nutrir. Meu bem, nós conseguimos, obrigada pela paciência e não desistir deste sonho, mas peço desculpa pela minha ausência, mas tudo que fiz, foi pensando em orgulhar vocês. Minha família possui base sólida no amor e na fé, através das minhas conquistas tento retribuir tudo que foi dedicado a mim. A todos vocês, meu amor e gratidão.

É preciso estudar todos os dias e sempre... Madre Maria São Miguel

RESUMO

THOMÉ, Andrezza Maria Côrtes. **Avaliação do efeito de** *lasers* **monocromáticos e dicromáticos de baixa potência em culturas de** *Pantoea agglomerans*. 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

Apesar dos efeitos benéficos dos lasers de baixa potência sobre a cicatrização de feridas, sua aplicação para o tratamento de lesões infectadas é controversa, porque poderiam estimular o crescimento bacteriano, exacerbando o processo infeccioso. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos in vitro de lasers de baixa potência sobre sobrevivência, morfologia, aglomeração celular, resistência antimicrobiana, taxa de divisão e formação de biofilme em culturas de Pantoea agglomerans. As amostras de Pantoea agglomerans foram isolados de lesões por pressão humanas e as culturas foram expostas a radiação laser dicromática simultânea e monocromáticas de baixa potência. Fluência, comprimento de onda e modo de emissão foram utilizados de acordo com protocolos terapêuticos para cicatrização de feridas. Os dados não mostram alterações nas áreas da colônia, morfologia e na aglomeração celular, contudo a radiação laser dicromática diminuiu a sobrevida bacteriana e formação de biofilme em fase de crescimento exponencial e os lasers monocromáticos aumentaram a sobrevivência bacteriana na mesma fluência, enquanto que o laser monocromático vermelho com baixa dose aumentou a formação de biofilme e o infravermelho em alta dose diminuiu a resistência à ampicilina. Os Lasers de Baixa Potência modulam a resistência antimicrobiana e formação de biofilmes da Pantoea agglomerans, mas estes dependem dos parâmetros de irradiação, uma vez que a radiação *laser* dicromática induz efeitos biológicos que diferem daqueles induzidos pela radiação laser monocromática. Assim, o laser dicromático vermelho e infravermelho simultâneo pode ser uma nova opção para o tratamento de lesões infectadas, reduzindo a sobrevivência bacteriana e formação de biofilmes, não alterando a resistência antimicrobiana e a taxa de divisão nas culturas de Pantoea agglomerans.

Palavras-chave: Bioestimulação. Laser Dicromático. Lesões infectadas. Lesão por pressão.

Pantoea agglomerans.

ABSTRACT

THOMÉ, Andrezza Maria Côrtes. **Evaluation of monochromatic and dichrotomic low power lasers effects on** *Pantoea agglomerans* **strains.** 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

Despite the beneficial effects of low power lasers on wound healing, their application for treatment of infected injuries is controversial because low power lasers could stimulate bacterial growth exacerbating the infectious process. Thus, the aim of this work was to evaluate in vitro effects of low power lasers on survival, morphology, cell aggregation, resistance antibiotic, division rate and biofilm formation of Pantoea agglomerans. P. agglomerans samples were isolated from human pressure injuries and cultures were exposed to low power monochromatic and simultaneous dichromatic laser radiation. Fluence, wavelength and emission mode were those used in therapeutic protocols for wound healing. Data show no changes in areas of colonies, morphology and cell aggregation, but dichromatic laser radiation decreased biofilm formation and bacterial survival in exponential growth phase and monochromatic red and infrared lasers increased bacterial survival at the same fluence. Monochromatic red laser at low dose increased biofilm formation and infrared at high dose decreased resistance antibiotic to ampicilin. Low Power Lasers modulate resistance antibiotic and biofilm formation of Pantoea agglomerans, but these depend on laser irradiation parameters, since dichromatic laser radiation induces biological effects that differ from those induced by monochromatic laser radiation. Thus, simultaneous dichromatic low power red and infrared lasers could be a new option for treatment of infected wounds, reducing biofilm formation, no altering antibiotic resistance and division rate in *Pantoea agglomerans* cultures

Keywords: Biostimulation. Dichromatic Laser. Infected Injuries. Pressure injury. Pantoea

agglomerans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação de técnica de coleta com swab	33
Figura 2 –	Representação da irradiação	35
Figura 3 –	Fotografia de células de P. agglomerans na fase exponencial, expostas	
	aos lasers vermelho e infravermelho de baixa potência, indicando	
	filamentos bacterianos	41
Figura 4 –	Fotografia de células de P. agglomerans na fase estacionária, expostas aos	
	lasers vermelho e infravermelho de baixa potência, indicando filamentos	
	bacterianos	42
Figura 5 –	Fotografia de células de P. agglomerans na fase exponencial, expostas	
	aos lasers vermelho e infravermelho de baixa potência, indicando	
	aglomerados celulares bacterianos	44
Figura 6 –	Fotografia de células de P. agglomerans na fase estacionária, expostas aos	
	lasers vermelho e infravermelho de baixa potência, indicando	
	aglomerados celulares bacterianos	45
Figura 7 –	Diâmetros das zonas de inibição formados ao redor dos discos de	
	ampicilina de P. agglomerans na fase exponencial, expostas aos lasers	
	vermelho e infravermelho de baixa potência	47
Figura 8 –	Diâmetros das zonas de inibição formados ao redor dos discos de	
	piperacilina + tazobactam de P. agglomerans na fase exponencial,	
	expostas aos lasers vermelho e infravermelho de baixa potência	48
Figura 9 –	Áreas das colônias bacterianas de P. agglomerans na fase exponencial,	
	expostas aos lasers vermelho e infravermelho de baixa	
	potência	49
Figura 10 –	Quantificação de formação de biofilme de culturas de P. Agglomerans na	
	fase exponencial, expostas aos lasers vermelho e infravermelho de baixa	
	potência	50
Figura 11 –	Esquema ilustrativo com o resumo dos dados	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros do <i>laser</i> de baixa potência	34
Tabela 2 –	Fração de Sobrevivência de culturas de P. agglomerans expostas aos	
	lasers vermelho e infravermelho de baixa potência na fase exponencial de	
	crescimento	40
Tabela 3 –	Fração de Sobrevivência de culturas de P. agglomerans expostas aos	
	<i>lasers</i> vermelho e infravermelho de baixa potência na fase estacionária de	
	crescimento	41
Tabela 4 –	Porcentagens de filamentação bacteriana em culturas de <i>P</i> .	
	agglomerans expostas aos <i>lasers</i> vermelho e infravermelho de baixa	42
Tabala 5	Demonstra and de filomente a bestariana em entruras da D	42
Tabela 5 –	Porcentagens de filamentação bacteriana em culturas de <i>P</i> .	
	agglomerans expostas aos lasers vermelho e infravermelho de baixa	10
	potencia na fase estacionaria de crescimento	43
Tabela 6 –	Areas superficiais de células individuais de <i>P. agglomerans</i> expostas aos	
	lasers vermelho e infravermelho de baixa potência na fase exponencial de	
	crescimento	44
Tabela 7 –	Áreas superficiais de células individuais de <i>P. agglomerans</i> expostas aos	
	lasers vermelho e infravermelho de baixa potência na fase estacionária de	
	crescimento	45
Tabela 8 –	Quantidade de aglomerados celulares de P. agglomerans expostos aos	
	lasers vermelho e infravermelho de baixa potência na fase exponencial de	
	crescimento	46
Tabela 9 –	Quantidade de aglomerados celulares de P. agglomerans expostos aos	
	lasers vermelho e infravermelho de baixa potência na fase estacionária de	
	crescimento	46
Tabela 10 –	Áreas superficiais dos aglomerados celulares de P. agglomerans expostas	
	aos lasers vermelho e infravermelho de baixa potência na fase	
	exponencial de crescimento	46
Tabela 11 –	Áreas superficiais dos aglomerados celulares de P.	

agg	lomerans	expostas	aos	lasers	vermelho	e	infravermelho	de	baixa	
potê	ència na fa	se estacio	nária	de cres	scimento	••••			•••••	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP-1	Proteína ativadora-1
ASLMS	American Society of Lasers in Medicine and Surgery
ATP	Adenosina trifosfato
bla	Genes de resistência β-lactâmicos
Ca^{2+}	Íon Cálcio
CCO	Citocromo c Oxidase
CO_2	Dióxido de Carbono
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E. coli	Escherichia coli
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina reduzido
fpg	DNA-Formamidopirimidina Glicosilase
H^+	Próton
H ₂ O	Água
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
	(Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
LBP	Lasers de baixa potência
LP	Lesão por Pressão
Maser	Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation
	(Amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação
MEC	Matriz extra celular
MMPs	Metaloproteases de Matriz
mutM	Mutator mutant
NAALT	North American Association for Photobiomodulation Therapy

NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NPUAP	National Presure Ulcer Advisory Panel
O ₂	Oxigênio
ON	Óxido Nítrico
OSA	Optical Society of America
P. agglomerans	Pantoea agglomerans
RNA	International Society for optics and photonics
SPIE	Ácido ribonucléico
TLBP	Terapia com <i>laser</i> de baixa potência
TNF-alfa	Fatores de necrose tumoral-alfa
TSI	Caldo soja tripticaseína
UV	Ultravioleta
xthA	Exonuclease III

LISTA DE SÍMBOLOS

cm ²	centímetro quadrado
mW	Miliwatts
nm	Nanômetros
W	Watt
S	Segundos
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
λ	lâmbda / comprimento de onda
<	menor que
>	maior que
β	Beta
%	por cento
=	igual
h	hora
±	mais ou menos
°C	graus Celsius
mg	miligrama
μg	micrograma
rpm	rotação por minuto
μL	microlitro
mL	mililitro
n	número
×	vezes

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1	Lesão por pressão	19
1.2	Lasers	20
1.2.1	Conceitos históricos do Laser	20
1.2.2	Conceitos físicos do Laser	22
1.2.2.1	Constituição de um dispositivo laser	23
1.2.2.2	Diferenciação de equipamentos	24
1.2.3	Interação dos lasers de baixa potência com tecidos biológicos	25
1.2.3.1	Cromóforos	25
1.2.3.2	Mecanismo de ação	26
1.2.4	TLPB na cicatrização de feridas	29
1.3	Pantoea agglomerans	30
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivos gerais	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Coleta da Amostra	33
3.2	Culturas bacterianas	34
3.3	Laser de Baixa Potência	34
3.4	Irradiação	35
3.5	Ensaio Sobrevivência Bacteriana	36
3.6	Ensaio de Filamentação Bacteriana	36
3.7	Análise morfológica	36
3.8	Análise de aglomerados celulares	37
3.9	Teste de resistência antimicrobiana	37
3.10	Quantificação das áreas das colônias bacterianas	37

3.11	Quantificação de biofilme	38
3.12	Análise estatística	38
4	RESULTADOS	40
4.1	Sobrevivência de culturas de P. agglomerans expostos ao laser vermelho e	
	infravermelho de baixa potência	40
4.2	Indução de filamentação de culturas de P. agglomerans expostas aos lasers	
	vermelho e infravermelho de baixa potência	41
4.3	Efeito dos <i>lasers</i> vermelho e infravermelho de baixa potência na área superficial de células de <i>P. agglomerans</i>	43
4.4	Efeito de <i>lasers</i> vermelho e infravermelho de baixa potência na área	
	superficial e quantidade de aglomerados celulares de P. agglomerans	44
4.5	Resistência antimicrobiana em culturas na fase exponencial de P.	
	agglomerans expostas aos lasers vermelho e infravermelho de baixa	
	potência	47
4.6	Quantificação das áreas das colônias de culturas na fase exponencial de P.	
	<i>agglomerans</i> expostas aos <i>lasers</i> vermelho e infravermelho de baixa	
	potência	48
4.7	Quantificação da formação de biofilme de culturas na fase exponencial de	
	P. agglomerans expostas aos lasers vermelho e infravermelho de baixa	
	potência	49
5	DISCUSSÃO	51
5.1	Sobrevivênvia Bacteriana	51
5.2	Alterações Morfológicas	52
5.3	Aglomerados celulares	53
5.4	Resistência antimicrobiana	54
5.5	Taxa de divisão celular	55
5.6	Formação de biofilme	56
	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	APENDICE – Artigo publicado	68

INTRODUÇÃO

Do ponto de vista microbiológico, a função primária da pele normal e intacta é controlar as populações microbianas que vivem em sua superfície, evitando que o tecido subjacente se torne colonizado e invadido por patógenos potenciais (BLUESTEIN *et al.*, 2008). Uma vez que a pele é lesionada, os microrganismos na superfície da pele obtêm acesso aos tecidos subjacentes, onde competem pelo oxigênio e nutrientes disponíveis e produzem enzimas, estas destroem fatores de crescimento e estimulam a produção excessiva de metaloproteases de matriz (MMPs) (EDSBERG, 2016; SEN *et al.*, 2009). Assim, microrganismos, como bactérias, podem infectar e danificar os tecidos lesados, atrasando a cicatrização e podendo ocasionar uma doença sistêmica (WUWHS, 2008). Em verdade, a ferida sendo alvo de infecções, pode levar a complicações, como septicemia, osteomielite e morte, como a que causou a morte prematura do ator Christopher Reeve (SEN *et al.*, 2009).

As feridas crônicas não cicatrizadas são normalmente colonizadas por uma flora polimicrobiana, oriundas do ambiente externo, da flora cutânea local, do trato entérico, da vagina e da mucosa oral (LATIFA *et al.*, 2016). Nos eventos de infecção, as feridas não conseguem cicatrizar, pois a carga microbiana é o principal contribuinte para a cicatrização retardada em feridas crônicas. Em consequência, os pacientes sofrem, os custos de tratamento aumentam e as práticas gerais de tratamento de feridas precisam de mais exigência (AMMONS *et al.*, 2015). As feridas não cicatrizadas afetam cerca de 3 a 6 milhões de pessoas nos Estados Unidos, principalmente, em pessoas com 65 anos ou mais, sendo responsáveis por 85% desses eventos e resultando em enormes despesas com cuidados de saúde, com custo total estimado em mais de US\$ 3 bilhões por ano (GUO *et al.*, 2010).

Os *lasers* de baixa potência (LBP) têm sido utilizados com sucesso no reparo de tecidos biológicos com base em seus efeitos de biostimulação e biomodulação (LUCAS *et al.*, 2003). Estes efeitos seriam explicados pelo aumento induzido pelo *laser* da síntese de ATP, DNA, RNA e proteínas, levando ao aumento da síntese de colágeno e proliferação de fibroblastos, melhorando o processo de cicatrização de feridas. Além disso, há evidências de que LBP aumenta o fluxo sanguíneo local, aumentando a saturação de oxigênio e a epitelização (ORTÍZ *et al.*, 2014)

Ao longo da última década, foram realizados progressos significativos no tratamento de lesões cutâneas (AMMONS *et al.*, 2015). Existem conhecimentos acumulados sobre estas feridas e tratamentos em desenvolvimento, tais como a *laserterapia*. A *laserterapia* é um

termo amplo, geralmente referido à terapia baseada na utilização de *lasers* de baixa potência (LBP) (DIXIT *et al.*, 2012). As terapias baseadas em LBP são cada vez mais utilizadas no tratamento de várias doenças, bem como na cicatrização de feridas (ANDRADE *et al.*, 2014). Além disto, a terapia com *laser* de baixa potência (TLBP) tem acumulado, nas últimas décadas, evidências científicas sobre seus efeitos e aplicações nas mais diversas áreas da saúde. Porém, a falta de formação acadêmica na área da *laserterapia* contribui para que muitos profissionais adquiram equipamentos *laser* e os subutilizam por falta de conhecimento, ou ainda, que acabem se negando a utilizá-los não com base em informações científicas, mas sim em preconceitos (GARCEZ *et al.*, 2012). Apesar de alguns efeitos biológicos induzidos por LBP serem relatados, o tratamento de lesões infectadas com LBP é controversa. Alguns estudos mostraram que a LBP pode estimular o crescimento bacteriano, exacerbando o processo infeccioso, mas esta hipótese não está totalmente elucidada e os achados na literatura são controvérsios (FONSECA *et al.*, 2011; NUSSBAUM *et al.*, 2003).

O controle de microrganismos é um dos campos mais ativos da atual pesquisa em farmacologia. Esta é uma fronteira do conhecimento científico que demanda cuidado. Ao longo de nossa história, parte significativa de nossa moderna civilização foi afetada por doenças causas por microrganismos. Novas ameaças estão surgindo no dia-a-dia. A indústria da quimioterapia antimicrobiana está em constante alerta, principalmente devido à rápida capacidade de evolução e variedade de patógenos encontrados (BAGNATO, 2008a).

O aparecimento de uma grande variedade de patógenos resistentes aos agentes químicos faz com que haja um grande aumento da morbidade de infecções que eram facilmente tratadas no passado. Apesar de nossa grande capacidade tecnológica, certos microrganismos parecem ser mais capazes, e parece claro que as possibilidades farmacológicas para combater certos microrganismos estão atingindo um limite. Portanto, alternativas para controle microbiológico são necessárias. É neste aspecto que modernas técnicas desenvolvidas em biofotônica (uso da luz e óptica em problemas relacionados com a matéria viva) podem trazer importantes contribuições. Muitas infecções locais não precisariam ser tratadas com medicação sistêmica se houvessem alternativas viáveis. Agentes químicos sistêmicos deveriam ser utilizados nos tratamentos de infecções mais graves, evitando assim o desenvolvimento da resistência antimicrobiana a estes agentes, além de minimizar os efeitos colaterais associados à antibioticoterapia sistêmica (BAGNATO, 2008a). Neste sentido, a bactéria *Pantoea agglomerans* (*P. agglomerans*) é a espécie mais clinicamente significativa do gênero altamente diversificado de *Pantoea*, porém, constantemente, possui diagnóstico tardio pelo baixo nível de suspeita clínica para este tipo de infecção (CHENG *et al.*, 2013). Entretanto, a *P. agglomerans* não é apenas um contaminante inocente, pois é resistente a mudanças de temperatura e pH. A lesão cutânea é considerada um meio de cultura ideal para esta bactéria, uma vez que, possui temperatura e pH aceitáveis para seu creescimento com um bom suprimento de íons Na⁺ e Cl⁻ dos tecidos e glicose do sangue (VAIMAN *et al.*, 2013).

Sendo assim, uma vez que as infecções bacterianas são causas comuns de cicatrização tardia da pele e as terapias tradicionais nem sempre são bem sucedidas, estudos são necessários para compreender os efeitos da LBP sobre as bactérias comumente encontradas em lesões infectadas, visto que, o fato de a lesão estar infectada ou não, na maioria dos casos, é negligenciado no momento da irradiação.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Lesão por pressão

A lesão por pressão (LP), também chamadas de úlcera de decúbito, escaras ou úlceras por pressão, são lesões na pele e/ou tecidos moles subjacentes, geralmente sobre uma proeminência óssea, como resultado de pressão ou pressão em combinação com cisalhamento e/ou atrito (BLUESTEIN *et al.*, 2008; EDSBERG, 2016; SEN *et al.*, 2009).

O *National Presure Ulcer Advisory Panel* (NPUAP - Conselho Consultivo Nacional sobre Úlceras por Pressão), uma organização norte-americana independente formada em 1987 e dedicada à prevenção, manejo, tratamento e pesquisa sobre lesão por pressão, a classifica como (EDSBERG, 2016):

- a) Estágio 1, pele íntegra com eritema que não embranquece;
- b) Estágio 2, perda da pele em sua espessura parcial com exposição da derme;
- c) Estágio 3, perda da pele em sua espessura total;
- d) Estágio 4, perda da pele em sua espessura total e perda tissular;
- e) Não Classificável, perda da pele em sua espessura total e perda tissular não visível;
- f) Tissular Profunda, descoloração vermelho escura, marrom ou púrpura, persistente e que não embranquece;
- g) Relacionada a Dispositivo Médico;
- h) Em Membranas Mucosas.

As LPs podem levar a consequências significativas para os pacientes. Causam dor, aumentam as taxas de morbidade e mortalidade, além de elevar o custo financeiro para os sistemas de saúde e diminuirem a qualidade de vida do paciente, desenvolvem-se rapidamente, com dificuldade no tratamento em alguns pacientes, sendo então um problema de saúde doloroso e caro (CANO et al., 2015; THOMAS *et al.*, 2014; LYDER *et al.*, 2008; LATIFA *et al.*, 2016). Da mesma forma, que a LP prolonga a hospitalização, dificulta a recuperação do doente e aumenta o risco para o desenvolvimento de outras complicações como infecção ou osteomielite. Para o paciente, representa um acréscimo no sofrimento físico

e emocional, reduzindo a sua independência e funcionalidade na realização das atividades da vida diária, comprometendo qualquer processo reeducacional. As LPs merecem por parte da equipe multiprofissional toda a atenção, no sentido de prevenir o seu aparecimento ou favorecer o seu tratamento (BLANES *et al.*, 2004).

Estima-se que existem mais de 7,4 milhões de casos no mundo e a prevalência no Brasil é de 16,9% (SEN *et al.*, 2009; LYDER *et al.*, 2008; BRITO *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos, a LP atinge 2,5 milhões de pacientes e o custo do tratamento foi estimado em US\$ 11 bilhões por ano, com custo de US\$ 70.000 por paciente (SEN *et al.*, 2009; CANO *et al.*, 2015). Além disto, com uma população estimada de 1,5 milhões de idosos vivendo em instituições de longa permanência nos EUA, as LPs têm ganhado grande importância, uma vez que 25% a 33% dos pacientes chegam nas instituições com LP e aproximadamente 35% dos pacientes as desenvolverão em algum tempo de sua estadia (COSTA *et al.*, 2005). Assim, a prevalência de LP tem aumentado nos últimos anos, devido ao aumento da expectativa de vida da população, associada aos avanços da medicina moderna, que tornaram possível a sobrevivência e lentamente debilitantes (WADA *et al.*, 2010). A terapia *laser* de baixa potência (TLBP) foi introduzida há mais de 50 anos, primeiramente na dermatologia, no reparo de feridas cutâneas, como LP, devido ao seu efeito bioestimulador na cicatrização de férias (KUJAWA *et al.*, 2004).

1.2 Lasers

1.2.1 Conceitos Históricos do Laser

Historiadores reportam que civilizações antigas, como a egípcia, a grega e a asteca, conheciam os benefícios da exposição do corpo à luz solar: os egípcios teriam usado para tratar desordens da pele, Heródoto observou o fortalecimento dos ossos e Apolo ensinou medicina aos homens e passou a ser chamado de "o Deus da Luz" (GARCEZ *et al.*, 2012). A partir do século XVIII, relatos esporádicos começaram a aparecer na literatura médica,

indicando que a luz solar poderia ser usada para tratar uma grande variedade de doenças. Na segunda metade do século XIX, a aplicação terapêutica da luz solar, conhecida como helioterapia, gradualmente tornou-se popular (HAMBLIN *et al.*, 2017). Essas seriam as primeiras observações do que hoje é conhecida como fotobiologia (GARCEZ *et al.*, 2012).

Porém, a terapia com luz, a fototerapia moderna, começou com Niels Ryberg Finsen (1860-1904), o pai da terapia ultravioleta. Finsen tratou mais de 800 pacientes com *lúpus vulgar*, no total, 80% dos pacientes foram curados (MOSKVIN, 2017). Por isto, recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1903 (HAMBLIN *et al.*, 2017).

Entretanto, uma nova perspectiva foi apresentada com os postulados de Albert Einstein em 1916, considerando as implicações da física quântica recém descoberta, previu que os raios eletromagnéticos poderiam estimular os átomos a emitir mais raios do mesmo comprimento de onda (HAMBLIN *et al.*, 2017). Baseado nesta nova teoria de Einstein, em 1951, Charles H. Townes propôs o conceito do *maser*, um acrômio para *microwave amplification by stimulated emission of radiation* (emissão estimulada de radiação por amplificação de microondas). Enquanto isso, Gordon Gould, em 1957, registrou pela primeira vez o termo *laser* como um acrômio de: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação) (CONVISSAR, 2011).

A partir disto, iniciou-se a busca pela construção do *laser*. Theodore Maiman (1927-2007) em 1960, após a montagem de um cristal de rubi dentro de um flash em espiral, observou os primeiros feixes de *laser* vermelho (HAMBLIN *et al.*, 2017). Em 1961, Ali Javan, W. R. Bennett e D. R. Herriott anunciaram o funcionamento bem-sucedido de um *laser* gasoso, feixe contínuo de Hélio-Neônio (He-Ne), com um comprimento de onda de 1152,3 nm. O *laser* de He-Ne foi um dos mais estudados para aplicações médicas, funcionando principalmente na faixa do visível do espectro eletromagnético (633 nm) e fornecendo alguns miliwatts de potência contínua (GARCEZ *et al.*, 2012).

Contudo, a primeira evidência da ação da irradiação com *laser* de baixa potência veio das experiências do Dr. Endre Mester em 1967 (FREITAS *et al.*, 2016). Mester observou que camundongos irradiados com *laser* de rubi de baixa potência (694 nm), estimulava o crescimento de pêlo mais rapidamente no dorso do animal, chamando isso de "Bioestimulação a *Laser*" (HUANG *et al.*, 2009). Assim, a Terapia com *Laser* de Baixa Potência (TLBP) foi descoberta há quase 50 anos por Mester e recentemente foi tomada uma decisão de consenso

para usar a terminologia fotobiomodulação, uma vez que o termo "baixa potência" era muito subjetivo (HAMBLIN *et al.*, 2017).

Várias sociedades profissionais acadêmicas e são agora dedicadas à fotobiomodulação: World Association of Laser Therapy (WALT); North American Association for Photobiomodulation Therapy (NAALT); ou parcialmente dedicado: International Society for Optics and Photonics (SPIE); American Society of Lasers in Medicine and Surgery (ASLMS); e Optical Society of America (OSA). Muitas doenças, condições e campos diferentes de tratamento médico estão agora se tornando passíveis de efeitos benéficos da fotobiomodulação. O Brasil tem um número notável de laboratórios produtivos que investigam temas relacionados à esta terapia (HAMBLIN et al., 2017).

1.2.2 Conceitos Físicos do Laser

O *laser* se enquadra em um tipo de fonte de radiação eletromagnética, que apresenta características únicas por emitir feixes com características especiais, assim, um *laser* difere de fontes de luz comuns em decorrência aos seus átomos emitirem radiação de maneira cooperativa, o tornando mais coerente. Além disso, a radiação *laser* é quase monocromática, sendo emitida em um feixe fino com pouca expansão e pode ser focada em uma largura que quase coincide com o comprimento de onda da luz, isso permite a entrega de grandes quantidades de energia, o tornado mais colimado (WALKER, 2011).

De maneira geral, a radiação eletromagnética, interpretada como ondas eletromagnéticas são criadas pela oscilação de campos elétricos e magnéticos (CHUNG *et al.*, 2012). A amplitude de uma onda é a magnitude do deslocamento máximo dos elementos de suas posições de equilíbrio, quando está em seu extremo deslocamento descendente, um vale (ou ponto baixo extremo), ou movendo-se de volta para cima, encontrando seu deslocamento para cima extremo, um pico (ou ponto alto extremo). Podendo estar apresentadas em uma série de oscilações por unidade tempo, chamado de frequência, possuindo uma distância entre estas repetições, conhecido como comprimento de onda (WALKER, 2011).

Há uma grande variedade possível de comprimentos de onda, por isso, o espectro eletromagnético de luz (BAGNATO, 2008), e nele as radiações emitidas pelos *lasers* de baixa

potência referem-se ao uso de radiação na região vermelha ou infravermelha próxima, com comprimentos de onda geralmente na faixa de 600 a 700nm e 780 a 1100 nm (FREITAS *et al.*, 2016).

Com o advento da teoria quântica, a luz foi melhor compreendida e pode ser interpretada como uma partícula complementar à onda, as partículas de luz (fótons) (HAMBLIN, 2017). Se uma radiação (fótons) ressonante incide sobre a matéria que contenha átomos num estado energético menor (estado fundamental), há possibilidade que estes átomos mudem para o estado de maior energia (excitado), se a energia do fóton for transferida para os mesmos. Este é o processo de absorção da energia eletromagnética. Átomos excitados decaem para um estado fundamental espontaneamente, ou seja, por si mesmo, ocorrendo processo de emissão espontânea de um fóton pelo sistema atômico. Estes fótons são emitidos em todas as direções e sem relação de fase entre si.

No entanto, há um terceiro processo que pode ocorrer neste sistema, além da absorção e da emissão espontânea e torna-se fundamental para o entendimento do funcionamento do *laser*, a emissão estimulada. Um fóton externo estimula o decaimento do elétron excitado e, ao passar para o estado de mais baixa energia, o elétron emite um fóton que emerge do sistema juntamente com aquele que causou a transição. Desse modo, dois fótons emergem do sistema juntos com a mesma energia, propagando-se em fase, sendo praticamente indistinguíveis (BAGNATO, 2008).

1.2.2.1 Constituição de um dispositivo laser

Um *laser* é um dispositivo que emite radiação através de um processo de amplificação óptica com base na emissão estimulada de fótons (CHUNG *et al.*, 2013). Para o funcionamento deste processo, três condições fundamentais deverão ser atendidas: em primeiro lugar é necessário um meio ativo, ou seja, composto por átomos, moléculas ou íons que emitam radiação, podendo estar em estado gasoso, liquido ou sólido; em segundo lugar, deverá ocorrer inversão de população, que é gerada por um processo de excitação denominado bombeamento, transformando o meio ativo em amplificador da radiação, através de uma fonte excitatória externa de energia, podendo ser um dispositivo de lâmpada flash ou

um circuito elétrico; finalmente, a sede de uma oscilação *laser*, desta forma, constituído uma cavidade óptica do *laser*, composta por dois espelhos, sendo um semireflexivo, localizados um em cada extremidade da cavidade óptica, atuando como ressonadores ópticos, que refletem os fótons emitidos, assim voltam para o sistema, conseguindo a amplificação (GARCEZ *et al.*, 2012).

1.2.2.2 Diferenciação de equipamentos

Os *lasers* podem ser diferenciados pelo comprimento de onda (ou frequência), pelo modo de emissão (contínuo ou pulsado) ou ainda pela sua potência, esta variando de baixa (*laser* terapêutico), média ou alta (*laser* cirúrgico) (NIEMZ, 2007).

Uma consideração importante deve envolver as propriedades ópticas do tecido. Existe uma chamada "janela terapêutica" no tecido, onde a penetração efetiva da luz no tecido é maximizada (HUANG *et al.*, 2009). Como mencionado anteriormente, esta janela ocorre aproximadamente de 650 nm a 1200 nm (FREITAS *et al.*, 2016).

A potência de saída pode variar amplamente de 1 mW até 500 mW (FREITAS *et al.*, 2016), consistindo em um *laser* de baixa potência (*low intensity* ou *low level*, ou ainda *low power lasers*), apresentando efeitos biomoduladores e não térmicos, enquanto os de alta potência (*hight intensity* ou *high level*, ou ainda *high power lasers*) são capazes de cortar, coagular e vaporizar materiais (NIEMZ, 2007).

Este tipo de irradiação pode ser uma onda contínua ou uma luz pulsada (FREITAS *et al.*, 2016). Os *lasers* de emissão contínua tem potência de saída constante durante todo período do tempo. O regime pulsado é dirigido pelo modo de bombeamento e têm potência de saída oscilante, que varia entre um valor máximo (potência de pico e zero durante um determinado período de tempo (GARCEZ *et al.*, 2012).

Os parâmetros de irradiação, como o comprimento de onda (nm), a potência (mW), a área do feixe (cm²), a estrutura do pulso, estão relacionados com as opções da fonte de irradiação. Por outro lado, os parâmetros de "dose", como energia (J), densidade de energia (J/cm²), cronologia do tratamento e tempo (s) de irradiação, são controlados pelo operador.

Além disso, a dosimetria depende de características específicas do paciente e das condições do tecido fisiológico (HAMBLIN *et al.*, 2017).

1.2.3 Interação dos lasers de baixa potência com tecidos biológicos

A radiação que atravessa o interior do tecido biológico interage, basicamente, de dois modos, pela absorção e pelo espalhamento (HAMBLIN *et al.*, 2017) Incidindo sobre um tecido biológico, parte da radiação é refletida, outra parte, que não foi refletida, penetrará e poderá ser absorvida por componentes dos tecidos, como a água (com alta absorção a partir de 1150nm), hemoglobina ou melanina (com alta absorção para comprimentos de onda menores que 600nm), assim, ocorre quando um fóton interage com um átomo ou molécula e toda a energia do fóton é transferida, a energia absorvida da radiação por estas moléculas ou partes de molécula (cromóforos) pode, então, ser transformada em energia química (GARCEZ et al., 2008; HAMBLIN *et al.*, 2017).

Parte da radiação que penetra no tecido biológico diverge devido a múltiplos espalhamentos, perdendo assim sua potência (GARCEZ et al., 2012). As interações de espalhamento podem mudar a direção e a energia dos fótons (espalhamento inelástico), ou apenas a direção (elástica). A irradiação do visível ao infravermelho próximo, que interage com o tecido biológico dá origem principalmente ao espalhamento elástico (HAMBLIN *et al.*, 2017). Por fim, a radiação que atravessa toda a espessura do tecido, sem ser absorvida ou sofrer espalhamentos é transmitida (GARCEZ *et al.*, 2012).

1.2.3.1 Cromóforos

Uma reação fotobiológica envolve a absorção do comprimento de onda específico da radiação por um fotoaceptor funcional, ou cromóforos (KARU, 1999). Foi estabelecido que as mitocôndrias são um alvo intracelular principal de radiação vermelha à infravermelha próxima (KARU, 1999; CHEN *et al.*, 2011). Um dos principais fotoaceptores propostos para

estes *lasers* é a citocromo c oxidase (CCO) ou complexo IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, já na região do espectro violeta à azul, as flavoproteínas também estão entre os fotoaceptores (KARU, 2014; KARU, 1999). Apesar da universalidade, uniformidade geral e princípio da respiração celular, a cadeia respiratória dos procariontes difere da cadeia mitocondrial das células eucarióticas. Assim, em bactérias, como *Escherichia coli*, os fotoaceptores responsáveis pela aborção da radiação *laser* de baixa potência são os complexos de citocromo *bd* e *bo* (KARU, 1988; KARU, 1999).

A fotoreatividade da CCO é devido aos seus quatro centros metálicos: duas porções heme (heme a e heme a3) e dois locais de cobre redox ativo (CuA e CuB); CuA aceita elétrons do citocromo c, e a transferência de elétrons entre CuA, heme a e heme a3-CuB resulta na redução do oxigênio molecular (HAMBLIN *et al.*, 2017). A irradiação acelera a passagem de heme a para heme a3, fazendo que mais elétrons estejam acessíveis para redução da molécula de oxigênio, intensificando a transferência de elétrons (KARU, 2014).

1.2.3.2 Mecanismo de ação

A respiração celular ocorre em três grandes estágios. No primeiro estágio, as moléculas dos combustíveis orgânicos – glicose, ácidos graxos e alguns aminoácidos – são oxidadas para liberar fragmentos de dois átomos de carbono na forma de um grupo acetilcoenzima A. No segundo estágio, esses grupos acetil são introduzidos no ciclo do ácido citrico, o qual os oxida enzimaticamente até CO₂. A energia liberada pela oxidação é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos, NADH e FADH₂. No terceiro estágio da respiração essas coenzimas reduzidos são oxidados, desfazendo-se de prótons (H⁺) e elétrons. Os elétrons são conduzidos ao longo de uma cadeia de moléculas transportadores de elétrons, conhecida como cadeia repiratória, até o O₂, o qual eles reduzem para formar H₂O. Durante esse processo de transferência de elétrons, uma grande quantidade de energia é liberada e conservada na forma de ATP, por meio do processo chamado de fosforilação oxidativa (NELSON *et al.*, 2002).

Durante a excitação leve de estados eletrônicos, uma fração da energia é inevitavelmente convertida em aquecimento. O aumento transitório local da temperatura dos fotoaceptores

pode causar alterações estruturais e desencadear atividade bioquímica. Em terceiro lugar, o uso principal de oxigênio na via da cadeia respiratória envolve a redução do dioxigênio, através de quatro elétrons, em água. Ao ativar o fluxo de elétrons na cadeia respiratória, também pode-se esperar aumento da produção de ânion superóxido, mesmo um pequeno aumento destes resulta em múltiplos mecanismos secundários (KARU, 1999). Desta forma, em seguida, o fluxo transmembrana de protóns, no sentido do seu gradiente de concentração por meio de canais protéicos específicos, fornece energia livre para a síntese do ATP, que é catalisada por um complexo protéico ligada à membrana (ATP sintase) e que acopla o fluxo de prótons à fosforilação do ADP (NELSON *et al.*, 2002).

Em decorrência à interação da radiação com o CCO, ocorre aumento do potencial da membrana mitocondrial e gradiente de prótons, causando acidificação do citoplasma e alterações nas concentrações de ATP, adenosina monofosfato cíclico (AMPc), espécies reativas de oxigênio (EROs), Ca²⁺ e Óxido Nítrico (NO) (FREITAS *et al.*, 2016).

Karu (1999) propõe que o espectro de ação *laser*, baseado na síntese de DNA, ocorre no núcleo, mas o fotoaceptor, responsável por esse resultado, está localizado nas mitocôndrias. Isso significa que uma via de sinalização celular deve existir entre a cadeia respiratória mitocondrial e o núcleo. Essa via de sinalização são os mecanismos secundários (KARU, 2010).

A teoria mais aceita para explicar o processo de absorção de fótons pela CCO que pode levar ao aumento da sua atividade baseia-se na fotodissociação de NO inibitório. Uma vez que o NO é covalentemente ligado aos centros heme e Cu e bloqueia competitivamente o oxigênio, um fóton de energia relativamente baixo poderia causar dissociação do NO e, com isso, permitir maior taxa de respiração celular, aumentando o potencial de membrana mitocondrial e os níveis de ATP, AMPc e EROs, que irão atuar como moléculas sinalizadoras (KARU, 2014).

Várias vias regulatórias importantes são mediadas por meio do estado redox celular. Mudanças no estado redox induzem a ativação de numerosas vias de sinalização intracelular e regulam a síntese de ácido nucleico, síntese de proteínas, ativação de enzimas e a progressão do ciclo celular (GARCEZ *et al.*, 2012). Muitos genes têm sua transcrição regulada (positivamente ou negativamente) após a irradiação com diferentes comprimentos de onda e fluências. Por exemplo, a irradiação com *laser* altera a expressão de 111 genes (68 para cima, 43 para baixo) (ZHANG *et al.*, 2003). O fator nuclear kappa B (NF-kB) é um fator de

transcrição que rege a expressão de genes múltiplos e demonstrou atuar em várias funções celulares, incluindo respostas inflamatórias e respostas induzidas pelo estresse e pela sobrevivência. Foi demonstrado que a ativação do NF-kB após a irradiação com *laser* é mediada por geração EROs (CHAN *et al.*, 2011). Assim como, a regulação positiva da atividade da citocromo-oxidase, aumentou fosforilação da *Jun N-terminal* quinase, que posteriormente ativa a proteína ativadora-1 (AP-1), o que, por sua vez, leva ao aumento da proliferação celular (HU *et al.*, 2007).

Como consequência do mecanismo secundário, ocorre aumento da secreção de fatores quimiotáticos dos mastócitos, que contribuirá para a melhora da cicatrização tecidual, associada a uma melhora da microcirculação, regeneração do tecido e imunomodulação. Estes efeitos constituem o *mecanismo terciário* de ação dos *lasers* de baixa potência (KARU, 2010).

Quanto aos efeitos dos *lasers* de baixa potência, alguns autores os dividem em dois, os primário (ou diretos) e os secundário (ou indiretos). Segundo Genovese (2007), os efeitos diretos incluem o aumento da produção de ATP, causando aceleração da mitose e degranulação de mastócitos, que favorecem alterações circulatórias locais e ação fibrinolítica.

Também, a modulação da produção de substâncias liberadas na dor e na inflamação, como as histaminas, serotoninas, bradicinas, prostaciclinas, leucotrienos e prostaglandinas. Os efeitos diretos também incluiriam alterações na condutância iônica através da membrana plasmática, que poderia explicar os efeitos sobre a dor, aumentando o limiar para a dor e diminuindo a transmissão dos estímulos dolorosos para centros superiores do sistema nervoso central relacionados com a nocicepção.

Para o mesmo autor, como efeitos indiretos, tem-se, o estímulo à microcirculação através de mediadores químicos, como a histamina, que promove o relaxamento de esfíncteres pré-capilares. Outro efeito indireto seria o estímulo ao tropismo celular, devido ao aumento da síntese de ATP e da velocidade da taxa de mitose, acelerando processos de reparação tecidual e indução de neoangiogênese.

1.2.4 TLPB na cicatrização de feridas

O processo de cicatrização das feridas tem atraído a atenção dos pesquisadores desde o início da sua identificação, especialmente no que diz respeito aos fatores que atrasam ou

previnam (RANJBAR *et al.*, 2016). Normalmente, a cicatrização aguda de feridas é um processo bem organizado que leva a um reparo previsível dos tecidos. O processo de reparo da ferida pode ser dividido em 4 fases de sobreposição temporária e espacial: coagulação, inflamação, formação de tecido de granulação (fase proliferativa) e fase de remodelação ou cicatrização.

Lesões crônicas são caracterizadas por serem cronicamente inflamadas e pelo atraso de cicatrização. As células inflamatórias acumuladas dentro da ferida crônica produzem vários EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que danificam os elementos estruturais da matriz extra celular (MEC) e das membranas celulares, e levam à senescência celular prematura. Além desses efeitos negativos diretos, os EROs juntamente com citocinas pró-inflamatórias induzem a produção de serina proteases e metaloproteinases, que degradam a MEC e fatores de crescimento necessários para a função celular normal. A inativação de inibidores de protease por degradação proteolítica aumenta esse processo. Assim, embora a produção de fatores de crescimento seja freqüentemente aumentada em feridas crônicas em comparação com feridas agudas, sua quantidade e bio-disponibilidade são significativamente diminuídas (DEMIDOVA-RICE *et al.*, 2012).

A TLBP é uma técnica não-invasiva e segura que tem sido amplamente utilizada para prevenir e tratar lesões crônicas (SPERANDIO *et al.*, 2015). A proliferação celular é um sinal fisiológico de importância crítica para a fotobiomodulação, sendo um dos aspectos mais importantes da cicatrização de feridas (SOLMAZ *et al.*, 2017). A ativação de NF-kB por irradiação *laser* regula respostas imunes e inflamatórias em células endoteliais, células musculares lisas vasculares e macrófagos, bem como produção de citocinas inflamatórias e fatores de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Assim, o efeito benéfico em cicatrização de feridas pode ser explicado considerando-se vários mecanismos biológicos básicos, incluindo da expressão de citocinas e fatores de crescimento, que são responsáveis por muitas fases da cicatrização (GARCEZ *et al.*, 2012).

Entretando, a irradiação com LBP induz a expressão da enzima superóxido desmutase, diminuindo a concentração de ânion superóxido e como resultado diminui a produção de peroxinitrito, assim como, foi observado, em modelo de úlcera diabética, redução de níveis ERNs, como nitrito, após exposição ao LBP e estimula mecanismos que protegem contra a degradação de lipidos de membrana (KANDOLF-SEKULOVIC *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2016).

Apesar dos inúmeros efeitos biológicos induzidos pelos *lasers* de baixa potência, muito ainda se discute se este recurso poderia ser utilizado no tratamento de lesões cutâneas infectadas, pois estudos sugerem que o potencial biomodulatório do *laser* poderia estimular o crescimento bacteriano agravando o quadro infeccioso. Entretanto, este efeito bioestimulatório do *laser* diante das bactérias ainda não está totalmente elucidado.

1.3 Pantoea agglomerans

A bactéria *Pantoea agglomerans* (*P. agglomerans*) é um bacilo aeróbico gram negativo da família *Enterobacteriaceae* (CRUZ *et al.*, 2007). O gênero *Pantoea*, atualmente inclui sete espécies: *P. agglomerans*, *P. cítrea*, *P. dispersa*, *P. punctata*, *P. stewartii* e *P. terrea* (VOLKSH *et al.*, 2009). A forma *Enterobacter agglomerans* foi a taxonomia proposta, inicialmente, por Ewing e Fife (1972) para isolados clínicos, porém as amostras *Erwinia herbícola* e *Erwinia milletiae* foram reclassificadas em *P. agglomerans* e *P. dispersa* (GAVINI *et al.*, 1989).

As espécies do gênero *Pantoea*, particularmente os isolados clínicos, são tipicamente caracterizadas com base na morfologia de suas colônias, que são caracteristicamente amarelas, e por testes fisiológicos e bioquímicos (VOLKSH *et al.*, 2009). O epíteto "*agglomerans*" remonta à descrição original de Beijerinck (1888) da espécie (como *Bacillus agglomerans*) e provavelmente se refere à habilidade das células de *P. agglomerans* para formar aglomerados multicelulares conhecidos como simplasmata, também descritos como zoogloa, formas de salsicha ou de lagarta. Houve relatos de que essas estruturas podem conferir tolerância a situações de estresse, como a exposição a ácidos, metais pesados e radiação ultravioleta, tal que em termos gerais, a formação de aglomeradospode ser uma estratégia de sobrevivência em ambientes variáveis e imprevisíveis. As células no interior de cada aglomerado possuem uma forma irregular e contato pontual de célula a célula com bactérias vizinhas (TECON *et al.*, 2016).

A bactéria *P. agglomerans* está atualmente listada como um organismo de biossegurança de nível 2, devido a isolados clínicos relatados como patógenos humanos oportunistas, principalmente em 2 situações: 1) infecção da ferida com material vegetal e 2)

infecção adquirida no hospital (VOLKSH *et al.*, 2009; DUTKIEWICZ *et al.*, 2016). Esta espécie bacteriana foi também relacionada à septicemia (SENGUPTA *et al.*, 2016; NAHA *et al.*, 2012; LIBERATO *et al.*, 2009), abcesso hepático (RODRIGUES *et al.*, 2009), endofitalmite infecciosa (VENINCASA *et al.*, 2015), artrite septica (SHARMA *et al.*, 2012) e feridas (VAIMAN *et al.*, 2013).

2 **OBJETIVOS**

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da irradiação por *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, utilizando diferentes fluências, em culturas de *Pantoea agglomerans*.

2.2 Objetivos especificos

Avaliar os efeitos da exposição aos *lasers* vermelho ($\lambda = 660$ nm) e infravermelho ($\lambda = 808$ nm) na:

- a) Sobrevivênvia bacteriana;
- b) Indução de filamentação bacteriana;
- c) Área superficial de células individuais e de aglomerados;
- d) Resistência antimicrobiana;
- e) Taxa de divisão celular;
- f) Formação de biofilme de *P. agglomerans*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta da amostra

A obtenção de material biológico foi feita a partir de tecido de granulação viável de lesão por pressão infectada de pacientes internados no Hospital Universitário Sul Fluminense, Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil. A coleta foi realizada no período de setembro de 2014 a março de 2015, utilizando-se *swab* estéril por técnica asséptica e, então, pressionando-o e girando-o em 1 cm² da área ferida por 5 segundos para formação de fluido do tecido, conforme técnica já descrita (LEVINE *et al.*, 1976). O material coletado foi armazenado em meio Stuart (Absorve®, Haimen Town, China) e imediatamente transportado para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Severino Sombra, onde o material coletado foi inoculado em tubos de ensaio estéreis contendo caldo de infusão de cérebro e coração bovino (BHI, Merck®, Kenilworth, USA) e incubado em estufa por 18 horas a $35 \pm 2^{\circ}$ C. Posteriormente, alíquotas foram semeadas em ágar sangue (Kasvi®, Curitiba, Brasil) (MARTINS *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2006). Todos os procedimentos foram conduzidos e aprovados, de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética e Pesquisa em Humanos da Universidade Severino Sombra e registrado na Plataforma Brasil com o número CEP 745.046.

Figura 1 – Representação de técnica de coleta com swab



3.2 Culturas bacterianas

Após formação das colônias bacterianas em ágar sangue (Kasvi®, Curitiba, Brasil), *Pantoea agglomerans* foi isolada e identificada através de testes bioquímicos de rotina: oxidase, fermentação de carboidratos (sacarose, lactose e glicose), produção de indol, motilidade em meio sólido, prova de vermelho de metila, utilização de citrato, prova de Voges Proskauer e produção de sulfato de hidrogênio (KONEMAN *et al.*, 2014). A partir de estoque em fase estacionária de crescimento, culturas desta espécie foram preparadas para atingir a fase exponencial de crescimento (4 horas, 35 ± 2 °C) e estacionária (18 horas, 35 ± 2 °C). Em seguida, as culturas foram centrifugadas duas vezes (3200 rpm, 10 minutos) e suspensas em solução salina (0.9% NaCl) estéril (MARCIANO *et al.*, 2012). No ensaio de sobrevivência bacteriana, ensaio de filamentação bacteriana, análise morfológica e análise de aglomerados celulares foram utilizados amostras nas fases exponencial e estacionária de crescimento. Para quantificação das áreas das colônias bacterianas, quantificação da formação de biofilme e teste de resistência antimicrobiana foram utilizadas amostras na fase exponencial de crescimento.

3.3 Laser de Baixa Potência

Foi utilizado equipamento *laser* de baixa potência vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm) (modelo Therapy XT, DMC Equipamentos Ltda®, São Paulo, Brazil). Os parâmetros utilizados estão na Tabela 1.

Parâmetros	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Dicromático
Comprimento de onda	660 nm	808 nm	660 e 808 nm
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo	Contínuo
Potência (mW)	100	100	100
Fluência (J/cm ²)	35, 70 e 140	35, 70 e 140	70 e 140
Energia (J)	1, 2 e 4	1, 2 e 4	2 e 4
Tempo de irradiação (s)	10, 20 e 40	10, 20 e 40	10 e 20

Tabela 1 - Parâmetros do laser de baixa potência
Spot size (cm ²)	0,028	0,028	0,028
------------------------------	-------	-------	-------

No ensaio de sobrevivência bacteriana, ensaio de filamentação bacteriana, análise morfológica e análise de aglomerados celulares foram utilizadas todas as fluências mencionadas na Tabela 1. Para a quantificação das áreas das colônias bacterianas, quantificação da formação de biofilme e teste de resistência antimicrobiana foram utilizadas as fluências de 35 e 140 J/cm² para os *lasers* monocromáticos e de 140 J/cm², para o dicromático.

3.4 Irradiação

Alíquotas (50 μ L, n = 4, para cada fluência) de suspensões de *P. agglomerans* foram expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, sob temperatura ambiente e luz branca (lâmpadas fluorescentes). O tempo de exposição foi automaticamente ajustado pelo equipamento *laser* de acordo com a fluência. A fonte *laser* foi posicionada de tal modo que toda a superfície da suspensão bacteriana fosse irradiada pelo feixe do *laser*. Os controles foram suspensões bacterianas não expostas aos *lasers*.





3.5 Ensaio Sobrevivência Bacteriana

Imediatamente após à irradiação, as suspensões bacterianas foram diluídas em solução salina (0.9% NaCl) estéril, para a fase estacionária as diluições chegaram a 10^{-6} e para exponencial 10^{-5} , e semeadas em placas de *Petri* contendo meio ágar BHI (Merck®, Kenilworth, USA). As colônias bacterianas formadas foram contadas após incubação em estufa bacteriológica (35 ± 2 °C, 18 horas). As frações de sobrevivência foram calculadas pela razão entre o número de células viáveis após a exposição ao *laser* (para cada fluência) e o número de células viáveis sem a exposição ao laser (controle) (FONSECA *et al.*, 2010).

3.6 Ensaio de Filamentação Bacteriana

Após a irradiação, alíquotas (20 µL) foram espalhadas em lâmina para microscopia de luz e corada pelo método de Gram (CAPUCCINO *et al.*, 1999). As células bacterianas foram visualizadas usando o microscópio (Axio Scope A1, Carl Zeiss®, Jena, Alemanha) equipado com objetiva A-plan 40/0.65 (aumento de 100x), condensador 0.90 e lâmpada halogena de 100W. As imagens foram capturas com a câmera AxioCam HRc Sony 12 megapix (Carl Zeiss®, Jena, Alemanha), usando o software AxioVision. Após, as imagens foram analisadas através do software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics®, Rockville, USA) para aferição das áreas e determinação da porcentagem de filamentação. A filamentação bacteriana foi considerada quando a área da célula bacteriana era maior que 2 vezes a média das áreas das células bacterianas (MARCIANO *et al.*, 2012).

3.7 Análise morfológica

Para análise morfológica, alíquotas (20 µL) foram espalhadas em lâminas para microscopia de luz, coradas e visualizadas em microscópio de luz (300 células por cada exposição), como descrito no item 3.6.

3.8 Análise de aglomerados celulares

A fim de avaliar os aglomerados celulares, culturas de *P. agglomerans* foram expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, espalhadas em lâminas para microscopia de luz, coradas e visualizadas em microscópio de luz como descrito no item 3.6. Para esta análise foram consideradas as áreas e a quantidade de aglomerados bacterianos.

3.9 Teste de resistência antimicrobiana

Após irradiação com os l*asers* de baixa potência, suspensões bacterianas foram inoculadas em caldo BHI (Merck®, Kenilworth, USA) e incubadas por 1 hora ($35 \pm 2^{\circ}$ C). Em seguida, foram realizados testes de disco-difusão para análise de resistência antimicrobiana. Os antibióticos utilizados foram ampicilina (10 µg) e piperaciclina + tazobactam (10 µg) (Cefar®, São Paulo, Brasil). Para tal, alíquotas de suspensões bacterianas (100 µL) foram espalhadas por toda a superfície de placas de *Petri* contendo meio ágar Müller Hinton (HiMedia®, Mumbai, India) com o auxílio de alça de Drigalski. Em seguida, os discos de antibióticos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura. As placas de *Petri* foram fotografadas após o período de incubação em estufa bacteriana ($35 \pm 2^{\circ}$ C, 18 horas). As imagens foram capturadas com uma câmera digital (Samsung DV100, São Paulo, Brasil). Em seguida, as imagens foram analisadas com o software Image J (Media Cybernetics®, Rockville, USA) para aferição dos diâmetros das zonas de inibição, ao redor dos discos de antibióticos, em centímetros. Os resultados do antibiograma foram avaliados conforme recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2016).

3.10 Quantificação das áreas das colônias bacterianas

Em outros experimentos, a capacidade de divisão celular em culturas bacterianas irradiadas com *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência foi avaliada através das áreas das colônias bacterianas formadas em placas de *Petri*. Para tal, as placas de *Petri*,

contendo as colônias bacterianas, foram fotografadas após o período de incubação em estufa bacteriana ($35 \pm 2^{\circ}$ C, 18 horas). As imagens foram capturadas com uma câmera digital (Samsung DV100, São Paulo, Brasil). Em seguida, as imagens foram analisadas com o software Image J (Media Cybernetics®, Rockville, USA) para aferição da área de cada colônia bacteriana.

3.11 Quantificação de biofilme

Para avaliação da formação de biofilme por culturas de P. agglomerans irradiadas com lasers vermelho e infravermalho de baixa potência, suspensões bacterianas foram inoculados em caldo soja tripticaseína (TSI) (Merck®, Kenilworth, USA) e incubadas em estufa bacteriológica (35 ± 2 °C, 18 horas). A quantificação da produção de biofilme em cubetas de plástico foi baseada em métodos descritos anteriormente com microplacas (STEPANOVIC et al., 2000). Inicialmente, as cubetas foram preenchidas com 3 mL de TSI, 30 µL de cultura bacteriana em fase estacionária de crescimento foram adicionados e as cubetas foram incubadas aerobiamente em estufa bacteriológica (35 ± 2 °C, 18 horas). Após o período de incubação, o conteúdo das cubetas foram dispensados e as cubetas lavadas três vezes com 3 mL de água destilada. As células bacterianas aderidas foram fixadas com 3 mL de metanol por cubeta e, após 15 minutos, as cubetas foram esvaziadas. Após secarem, foram coradas com 3 ml de cristal violeta por 5 minutos e o excesso de corante foi desprezado. O corante ligado às células aderentes foi solubilizado em 3 mL de solução de ácido acético a 33% por cubeta. A densidade óptica (DO) de cada cubeta foi aferida em espectrofotômetro UV-VIS a 570 nm (Femto® 800XI, São Paulo, Brasil). Cubetas contendo apenas meio de cultura foram usadas como controle negativo.

3.12 Análise estatística

Os dados foram apresentados na forma de media e desvio padrão. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para determinar possíveis diferenças estatísticas, seguido de pós-teste de Dunn, com p<0,05, para o

ensaio de sobrevivência bacteriana, ensaio de filamentação bacteriana, análise morfológica, análise de aglomerados celulares e quantificação da formação de biofilme. O teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar possíveis diferenças estatísticas, seguido de pós-teste de Tukey, com p<0,05, para a quantificação das áreas das colônias e teste de resistência antimicrobiana. InStat software 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) foi utilizado para realizar as análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 Sobrevivência de culturas de *P. agglomerans* expostos ao *laser* vermelho e infravermelho de baixa potência

As frações de sobrevivência em culturas de *P. agglomerans* em fase exponencial de crescimento expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência são mostradas na Tabela 2. Os dados nesta tabela mostram que a exposição ao *laser* dicromático vermelho e infravermelho a 140 J/cm² reduziu significativamente (p<0,05) a fração de sobrevivência, enquanto os *lasers* monocromáticos vermelhos e infravermelhos a 140 J/cm² aumentaram a fração de sobrevivência.

Fluência (J/cm ²)	Fração de Sobrevivência			
	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Dicromático	
0	$1,0\pm0,18$	1.0 ± 0.18	1.0±0.18	
35	1.1 ± 0.20	0.9 ± 0.17	-	
70	0.9 ± 0.15	0.9±0.19	1.2 ± 0.21	
140	$1.4\pm0.18*$	1.4±0.31*	$0.8 \pm 0.26*$	

 Tabela 2 - Fração de Sobrevivência de culturas de P. agglomerans expostas aos lasers

 vermelho e infravermelho de baixa potência na fase exponencial de crescimento

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. (*) p<0,05

Comparando ao grupo controle (amostras de bactérias não expostas aos *lasers*), as frações de sobrevivência na fase estacionária de *P. agglomerans* foram avaliados para verificar se os efeitos dos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência são dependentes das condições fisiológicas das células (Tabela 3). Em contraste aos resultados obtidos na fase exponencial de *P. agglomerans* expostas aos *lasers* monocromático e dicromático, a fração de sobrevivência nas culturas de fase estacionária não obteve diferença significativa (p>0,05).

Fluência (J/cm ²)	Fração de sobrevivência		
× / <u>–</u>	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Dicromático
0	1.0 ± 0.22	1.0±0.22	1.0±0.22
35	1.0±0.39	1.3±0.46	-
70	1.1±0.31	1.1 ± 0.42	1.0 ± 0.41
140	1.1 ± 0.38	1.0 ± 0.40	1.1 ± 0.46

Tabela 3 - Fração de Sobrevivência de culturas de P. agglomerans expostas aos lasersvermelho e infravermelho de baixa potência na fase estacionária de crescimento

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

4.2 Indução de filamentação de culturas de *P. agglomerans* expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência

As porcentagens de filamentação bacteriana na fase exponencial de crescimento de culturas de *P. agglomerans* estão apresentadas na Figura 3 e Tabela 4. Os dados na tabela mostram que os *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência não induzem significativamente (p>0,05) filamentação nestas culturas bacterianas.

Figura 3 - Fotografia de células de *P. agglomerans* na fase exponencial, expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, indicando filamentos bacterianos



Legenda: (a) controle, (b) 140 J/cm² *laser* vermelho, (c) 140 J/cm² *laser* infravermelho, (d) 140 J/cm² *laser* dicromático. As setas indicam filamentos bacterianos (objetiva de aumento de 40×).

Tabela 4 - Porcentagens de filamentação bacteriana em culturas de *P. agglomerans* expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência na fase exponencial de crescimento

Fluência (J/cm ²)	Porcentagens de filamentação bacteriana			
	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Dicromático	
0	5.2 ± 0.32	5.2 ± 0.32	5.2 ± 0.32	
35	5.3 ± 1.63	4.8 ± 0.53	-	
70	3.4 ± 0.89	6.0 ± 1.21	5.9 ± 2.30	
140	5.9 ± 2.75	4.1 ± 1.18	6.6 ± 2.26	

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

Culturas na fase estacionária de *P. agglomerans* foram expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência para avaliar a indução de filamentação (Figura 4 e Tabela 5). Similar aos resultados obtidos nas culturas na fase exponencial, a exposição aos *lasers* dicromático e monocromático não induziu significativamente a filamentação (p>0,05) em culturas de *P. agglomerans*.

Figura 4 - Fotografia de células de *P. agglomerans* na fase estacionária, expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, indicando filamentos celulares bacterianos



Legenda: (a) controle, (b) 140 J/cm² *laser* vermelho, (c) 140 J/cm² *laser* infravermelho, (d) 140 J/cm² *laser* dicromático. As setas indicam filamentos bacterianos (objetiva de aumento de 40×).

Tabela 5 - Porcentagens de filamentação bacteriana em culturas de *P. agglomerans* expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência na fase estacionária de crescimento

Fluência (J/cm ²) _	Porcentagens de filamentação bacteriana			
	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Dicromático	
0	5.8 ± 1.03	5.8 ± 1.03	5.8 ± 1.03	
35	4.5 ± 1.30	5.7 ± 0.50	-	
70	4.6 ± 1.64	4.4 ± 1.35	6.8 ± 3.88	
140	5.4 ± 1.46	5.70 ± 0.60	4.9 ± 1.07	

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

4.3 Efeito dos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência na área superficial de células de *P. agglomerans*

As áreas superficiais de células individuais de *P. agglomerans* foram avaliadas depois da exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, dicromático e monocromáticos. Os dados na Tabela 6 e 7 mostram que as exposições aos *lasers* não induzem significativamente (p>0,05) alterações nas áreas superficiais de células na fase exponencial e estacionária.

Tabela 6 - Áreas superficiais de células individuais de P. agglomerans expostas aos lasersvermelho e infravermelho de baixa potência na fase exponencial de crescimento

Fluência (J/cm ²)	Áreas superficiais de células individuais			
-	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Dicromático	
0	6.2 ± 0.59	6.2 ± 0.59	6.2 ± 0.59	
35	5.9 ± 0.26	5.5 ± 0.61	-	
70	6.0 ± 0.44	5.5 ± 1.00	$5.2\ \pm 1.13$	
140	6.3 ± 0.47	6.4 ± 0.81	$5.8\ \pm 0.75$	

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

Fluência (J/cm ²)	Áreas superficiais de células individuais			
-	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Vermelho	
0	6.3 ± 0.97	6.3 ± 0.97	6.3 ± 0.97	
35	6.1 ± 0.40	6.3 ± 0.15	-	
70	6.2 ± 0.78	$\boldsymbol{6.2\pm0.49}$	7.0 ± 0.86	
140	6.7 ± 0.11	6.3 ± 0.31	6.3 ± 0.59	

Tabela 7 - Áreas superficiais de células individuais de P. agglomerans expostas aos lasersvermelho e infravermelho de baixa potência na fase estacionária de crescimento

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

4.4 Efeito de *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência na área superficial e quantidade de aglomerados celulares de *P. agglomerans*

A quantidade de aglomerados celulares de *P. agglomerans* foi avaliada depois da exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, dicromático e monocromáticos, nas fases exponencial e estacionária (Figuras 5 e 6; Tabelas 8 e 9, respectivamente). Os dados indicam que não houve alteração significativa (p>0,05) da quantidade de aglomerados após a exposição aos *lasers* na fase exponencial e estacionária, quando comparado ao grupo controle.

Figura 5 - Fotografia de células de *P. agglomerans* na fase exponencial, expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, indicando aglomerados celulares bacterianos



Legenda: (a) controle, (b) 140 J/cm² *laser* vermelho, (c) 140 J/cm² *laser* infravermelho, (d) 140 J/cm² *laser* dicromático. As setas indicam aglomerados celulares (objetiva de aumento de 40×).

Fluância (I/cm ²)	Quantidade de aglomerados celulares		
Thenena (s/eni) _	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Dicromático
0	8.0 ± 1.00	8.0 ± 1.00	8.0 ± 1.00
35	16.0 ± 6.08	10.3 ± 1.53	-
70	10.0 ± 5.29	10.3 ± 1.15	12.3 ± 9.29
140	14.3 ± 10.12	14.7 ± 1.15	14.3 ± 7.02

Tabela 8 - Quantidade de aglomerados celulares de P. agglomerans expostos aos lasersvermelho e infravermelho na fase exponencial de crescimento

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

Figura 6 - Fotografia de células de *P. agglomerans* na fase estacionária, expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, indicando aglomerados celulares bacterianos



Legenda: (a) controle, (b) 140 J/cm² *laser* vermelho, (c) 140 J/cm² *laser* infravermelho, (d) 140 J/cm² *laser* dicromático. As setas indicam aglomerados celulares (objetiva de aumento de 40×).

Fluência (J/cm ²)	Quantidade de aglomerados celulares		
	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Dicromático
0	7.00 ± 4.36	7.00 ± 4.36	7.00 ± 4.36
35	7.00 ± 1.73	5.67 ± 2.08	-
70	6.00 ± 4.63	$4.67\ \pm 0.58$	7.00 ± 2.65
140	11.33 ± 6.03	9.67 ± 1.53	6.33 ± 1.53

Tabela 9 - Quantidade de aglomerados celulares de P. agglomerans expostos aos lasersvermelho e infravermelho de baixa potência na fase estacionária de crescimento

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

As tabelas 10 e 11 mostram os valores das áreas superficiais dos aglomerados celulares de *P. agglomerans* após exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, dicromático e monocromáticos, na fase exponencial e estacionária, respectivamente. Os dados mostram que os *lasers* não induzem significativamente (p >0,05) alterações na área de superfície de *P. agglomerans* em ambas fases de crescimento.

Tabela 10 - Áreas superficiais dos aglomerados celulares de *P. agglomerans* expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência na fase exponencial de crescimento

Fluência (J/cm ²) _	Áreas superficiais dos aglomerados celulares		
	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Dicromático
0	18.7 ± 3.63	18.7 ± 3.63	18.7 ± 3.63
35	19.9 ± 1.98	15.6 ± 3.83	-
70	16.7 ± 3.14	18.4 ± 4.94	17.6 ± 7.64
140	24.7 ± 1.79	23.7 ± 2.27	25.6 ± 4.53

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

Tabela 11 - Áreas superficiais dos aglomerados celulares de *P. agglomerans* expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência na fase estacionária de crescimento

Fluência (J/cm ²)	Áreas superficiais dos aglomerados celulares		
	Laser Vermelho	Laser Infravermelho	Laser Vermelho

0	23.9 ± 5.12	23.9 ± 5.12	23.9 ± 5.12
35	22.7 ± 3.44	22.2 ± 5.01	-
70	20.9 ± 5.05	22.4 ± 1.64	$25.3\ \pm 6.93$
140	23.7 ± 5.75	25.4 ± 3.27	$23.1\ \pm 1.34$

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

4.5 Resistência antimicrobiana em culturas na fase exponencial de *P*. *agglomerans* expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência

Os diâmetros das zonas de inibição formados ao redor dos discos de antibióticos estão apresentados nas figuras 7 e 8. Os dados na Figura 7 mostram que a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência de 140 J/cm² aumenta significativamente (p<0,05) os diâmetros das zonas de inibição dos discos de ampicilina, enquanto não existe alteração significativa (p>0,05) nos diâmetros das zonas de inibição dos discos de piperacilina + tazobactam (Figura 8).

Figura 7 - Diâmetros das zonas de inibição formados ao redor dos discos de ampicilina de P. agglomerans na fase exponencial, expostas aos lasers vermelho e infravermelho de baixa potência



- Legenda: C: controle, V1: 35 J/cm² *laser* vermelho, IV1: 35 J/cm² *laser* infravermelho, V4: 140 J/cm² *laser* vermelho, IV4: 140 J/cm² *laser* infravermelho e D: 140 J/cm² *laser* dicromático. (*) p<0,05 quando comparado ao grupo controle.
- Figura 8 Diâmetros das zonas de inibição formados ao redor dos discos de piperacilina + tazobactam de *P. agglomerans* na fase exponencial, expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência



Legenda: C: controle, V1: 35 J/cm² *laser* vermelho, IV1: 35 J/cm² *laser* infravermelho, V4: 140 J/cm² *laser* vermelho, IV4: 140 J/cm² *laser* infravermelho e D: 140 J/cm² *laser* dicromático.

4.6 Quantificação das áreas das colônias de culturas na fase exponencial de *P. agglomerans* expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência

As áreas das colônias bacterianas da *P. agglomerans* estão apresentadas na Figura 9. Os dados na figura mostram que os *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, dicromático e monocromáticos, não induzem alteração significativa (p>0,05) nas áreas das colônias bacteriana.

Figura 9 - Áreas das colônias bacterianas de *P. agglomerans* na fase exponencial, expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência



Legenda: C: controle, V1: 35 J/cm² *laser* vermelho, IV1: 35 J/cm² *laser* infravermelho, V4: 140 J/cm² *laser* vermelho, IV4: 140 J/cm² *laser* infravermelho e D: 140 J/cm² *laser* dicromático.

4.7 Quantificação da formação de biofilme de culturas na fase exponencial de *P*. *agglomerans* expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência

A quantificação da formação de biofilme foi avaliada após a exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência (Figura 10). Os dados nesta figura mostram que a exposição ao *laser* dicromático na fluência de 140 J/cm² reduz significativamente (p<0,01) a formação de biofilme, enquanto o *laser* monocromático vermelho na fluência de 35 J/cm² aumenta significativamente (p<0,001) a formação de biofilme.

Figura 10 - Quantificação de formação de biofilme de culturas de *P. agglomerans* na fase exponencial, expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência



Legenda: C: controle, V1: 35 J/cm² *laser* vermelho, IV1: 35 J/cm² *laser* infravermelho, V4: 140 J/cm² *laser* vermelho, IV4: 140 J/cm² *laser* infravermelho e D: 140 J/cm² *laser* dicromático. (**) p<0,01 e (***) p<0,01, quando comparado ao grupo controle.

5 DISCUSSÃO

Vários estudos têm sido conduzidos para compreender o processo de reparo dos tecidos e os efeitos do *laser* de baixa potência na cicatrização de feridas (COSTA *et al*, 2012; NUSSBAUM *et al*, 2014). Porém, sabe-se que a descontinuidade da pele permite que microrganismos patogênicos acessem os tecidos internos, pois as rupturas na pele expõem o tecido subcutâneo. Essas rupturas proporcionam umidade adequada, condições nutritivas e temperatura para colonização microbiana, e a colonização de bactérias patogênicas no local da ferida está associada à cronicidade da mesma, em decorrência, por exemplo, da produção de toxinas bacterianas, que causam degradação do colágeno, estresse e desnutrição, impedindo a cicatrização normal de feridas (RAHIM *et al.*, 2017).

No entanto, não há consenso em relação aos efeitos induzidos pelo *laser* de baixa potência sobre o crescimento bacteriano e se estas bactérias, expostas aos *lasers*, poderiam afetar o processo de cicatrização de feridas (COSTA *et al*, 2012; NUSSBAUM *et al*, 2014).

5.1 Sobrevivênvia Bacteriana

Nossos resultados mostram que a sobrevivência bacteriana em fase exponencial de crescimento é diminuída pela exposição ao *laser* de baixa potência dicromático simultâneo e aumentada pela exposição ao *laser* monocromático na mesma fluência (Tabela 2). Estes resultados podem ser explicados pelo fato da bactéria *P. agglomerans* possuir um metabolismo aeróbico e os cromóforos primários mais prováveis para estas respostas pela expossição a irradiação em bactérias serem alguns dos componentes da cadeia respiratória (como desidrogenases e citocromo). Logo, o estresse oxidativo poderia estar envolvido neste efeito, pois a absorção da luz *laser* induz a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio envolvidas em subsequentes reações de radicais livres com modificações de biomoléculas e funções celulares (DUTKIEWICZ *et al.*, 2015; KARU *et al.*, 1994).

Com base em estudos anteriores com irradiação com *laser* dicromático, é possível sugerir que há uma conexão íntima entre os cromóforos para irradiações vermelha e infravermelha, com os componentes de cadeia respiratória desempenhando um papel fundamental para a absorção de ambas as irradiações e transdução fotossensorial. Então, os

efeitos das irradiações com *laser* infravermelho e vermelho podem ser aditivos, causando inativação bacteriana. Por outro lado, a radiação monocromática aumenta a sobrevivência bacteriana na maior fluência (140 J/cm²). É possível que, em ambos os casos, as mesmas moléculas possam servir como cromóforos, mas a pré-exposição ao *laser* pode diminuir a ação letal do peróxido de hidrogênio, este efeito é dose dependente (FONSECA *et al.*, 2010), porém como foi visto neste modelo experimental, além da fluência, sugerimos que o modo de exposição, dicromático ou monocromático e o tempo de exposição possa determinar a resposta também, sendo esta letal ou adaptiva (KARU *et al.*, 1994; KARU, 1989; TIPHLOVA *et al.*, 1987).

Outros autores realizaram estudos sobre os efeitos do laser dicromático consecutivo (laser infravermelho imediatamente após laser vermelho), mas com parâmetros e tipos de bactérias diferentes. Martins et al. (2015) mostraram que a irradiação com laser dicromático consecutivo de baixa potência, com fluências usadas na prática clínica, reduz a viabilidade celular em culturas de E. coli selvagem, em fase de crescimento exponencial, mas a viabilidade celular é maior em culturas expostas à irradiação dicromática do que naquelas expostos ao laser infravermelho monocromático. Apesar desta discrepância, ambos resultados demonstram que a radiação de *laser* de baixa potência induz efeitos biológicos que diferem daqueles induzidos pela irradiação de laser monocromático, sugerindo que outros efeitos terapêuticos poderiam ser obtidos usando a irradiação dicromatica (NUSSBAUM et al., 2002; MARTINS et al., 2015). A sobrevivência bacteriana em fase estacionária de crescimento foi avaliada para verificar se esse fenômeno é dependente da fase de crescimento bacteriano (Tabela 3). Curiosamente, tanto o laser vermelho, como o infravermelho, não altera a sobrevivência celular em culturas estacionárias de P. agglomerans. Estes resultados reforçam que os efeitos dos lasers vermelho e infravermelho de baixa potência na sobrevivência bacteriana são dependentes das condições fisiológicas ou metabólicas das células (CANUTO et al., 2013; MARTINS et al., 2015; FONSECA et al., 2012).

5.2 Alterações morfológicas

Células bacterianas apresentam algumas respostas morfológicas como estratégias para a sobrevivência a agentes estressantes, físicos e químicos, no ambiente (SANTOS *et al.*, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2015). A filamentação ocorre quando o crescimento celular continua na ausência de divisão celular, resultando em células alongadas que têm múltiplas cópias cromossômicas (CANUTO *et al.*, 2013). Embora o *laser* dicromático diminua a sobrevivência celular em culturas de *P. agglomerans* (Tabela 2) na fase exponencial, o fenótipo de filamentação (Tabela 4) não é induzido e as áreas celulares (Tabela 6) não são aumentadas nestas culturas.

Resultados similares foram obtidos em culturas estacionárias (Tabelas 5 e 7). Esses resultados discordam daqueles obtidos em estudos com culturas de *E. coli* expostas ao *laser* infravermelho de baixa potência e *laser* dicromático com fluências semelhantes, sugerindo que a filamentação induzida pela exposição aos *lasers* de baixa potência é dependente da espécie bacteriana (CANUTO *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2015). Por outro lado, a exposição ao *laser* monocromático aumenta a sobrevivência celular em culturas exponenciais de *P. agglomerans* (Tabela 2), fato também relatado para culturas de *E. coli* expostas ao *laser* infravermelho, mas o fenótipo de filamentação e as áreas celulares não são aumentadas (Tabela 4 e 6, respectivamente) (CANUTO *et al.*, 2013).

5.3 Aglomerados celulares

Outra possível estratégia de sobrevivência de bactérias é a formação de aglomerados celulares, não somente quando estas estão na forma suspensa livre (KLEBENSBERGER *et al.*, 2009). Apesar dos fatores que promovem a aglomeração não são completamente compreendidos, sabe-se que a aglomeração celular é uma resposta de estresse induzido por produtos químicos tóxicos, sendo, assim, uma estratégia de sobrevivência. Em uma parte destes aglomerados, as bactérias podem persistir em decorrência ao potencial aumento da resistência a antibióticos e agentes desinfetantes, quando comparados a bactérias livres (KLEBENSBERGER *et al.*, 2006). Não foram encontrados outros dados sobre a formação de aglomerados celulares induzidos pela exposição ao *laser* de baixa potência. Entretanto, nossos dados mostram que o *laser* de baixa potência não aumenta a formação de aglomerados celulares em culturas exponenciais e estacionárias de *P. agglomerans* (Tabela 8 e 9, respectivamente).

5.4 Resistência antimicrobiana

Como a filamentação e aglomerados celulares são estratégias de sobrevivência usadas pelas bactérias para se proteger e intensificar a resistência a agentes estressantes, a cicatrização de feridas pode ser afetada, uma vez que a infecção prolongada é um problema comum em feridas crônicas, resultando frequentemente em atraso na cicatrização e significativa morbidade/mortalidade do paciente, caso não seja tratada de forma correta (PEREIRA *et al.*, 2014). Porém, o tratamento de infecções bacterianas é cada vez mais complicado, pois os microrganismos podem desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos (MARTÍNEZ *et al.*, 2007).

Os resultados de nossa pesquisa indicam que a exposição aos *lasers* monocromáticos e dicromáticos de baixa potência em diferentes fluências não aumenta a resistência aos antibióticos em culturas de *P. agglomerans* para ampicilina (Figura 5) e piperacilina + tazobactam (Figura 6). Entre os β -lactâmicos, a ampicilina é amplamente prescrita, mas sua eficácia é cada vez mais reduzida pela resistência das bactéricas. Existem mecanismos primários pelos quais as bactérias podem resistir aos antibióticos β -lactâmicos como a inativação enzimática através da clivagem do anel β -lactâmico pelas β -lactamases em bactérias gram-negativas (DRAWZ *et al.*, 2010).

Muitas diferentes β -lactamases e genes de resistência β -lactâmicos (bla) foram descritos (BRIÑAS *et al.*, 2002). Alguns autores relataram que a exposição a irradiações nãoionizantes, como a ultravioleta, causam ruptura do gene bla_{TEM} e alteram a resistência das bactérias (PANG *et al.*, 2016). Nosso estudo sugere que a exposição ao laser infravermelho de baixa potência na maior fluência avaliada (140 J/cm²) diminui a resistência à ampicilina em culturas de *P. agglomerans* (Figura 4). Esta é uma descoberta importante, pois a disseminação da resistência aos antibióticos entre as bactérias patogênicas é um desafio global na saúde pública, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de estratégias contra a resistência aos antibióticos (FRIERI *et al.*, 2016). Além disso, resultados anteriores demonstraram que a exposição ao *laser* vermelho de baixa potência diminui a sobrevivência de *E. coli* e as células deficientes em proteína fpg/mutM, mas aumenta a sobrevivência de células de *E. coli* com deficiência de xthA, que possuem resistência à ampicilina (SERGIO *et al.*, 2013). Por outro lado, a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência em baixas fluências aumenta a sobrevivência dessas células bacterianas mutantes em meio de cultura contendo ampicilina (FONSECA *et al.*, 2012).

Porém nossos resultados em relação a sobrevivência bacteriana de *P. agglomerans* ao *laser* infravermelho com a maior fluência avaliada (140 J/cm²), demonstra que existe uma diminuição da resistência com aumento da sobrevivênvia bacteriana, em contra partida sugere-se que estas bactérias estão se adaptando a custo de mutações, visto que estudos anteriores também sugerem este efeito protetor de forma dose-depende relacionado com a exposição ao *laser* vermelho (FONSECA *et al.*, 2010), enquanto o *laser* dicromático na mesma fluência diminui a sobrevivênvia sem alterar a resistência antimicrobiana na fase exponencial de crescimento. No entanto, os efeitos dos *lasers* de baixa potência sobre a resistência antimicrobiana não foi claramente avaliada e nossa hipótese é que o *laser* de baixa potência potência poderia ter mecanismos semelhantes ao UV para diminuir a resistência à ampicilina.

5.5 Taxa de divisão celular

Para verificar se a diminuição da resistência à ampicilina induzida pelo *laser* estaria relacionada à alteração da taxa de divisão celular, foram mensuradas as áreas de colônias de culturas de *P. agglomerans* expostas a estes *lasers*. Nossos achados mostram que os *lasers* dicromáticos e monocromáticos não induzem alterações nas áreas de colônias de *P. agglomerans*, indicando que esses *lasers* não afetam a taxa de divisão celular em culturas de *P. agglomerans* e que a diminuição da resistência à ampicilina induzida pelo *laser* não está relacionada à divisão celular. As taxas de crescimento celular foram medidas com base no aumento das áreas de colônias formadas por células em crescimento (YAMADA et al., 2010).

Alguns autores relataram que em culturas bacterianas, tais como as de *E. coli*, as células se dividem mais rapidamente após a exposição aos *lasers* de baixa potência. Esse fenômeno é o chamado efeito de biostimulação (ou biomodulação), que resulta de alterações dos processos intracelulares, principalmente pelo aumento do metabolismo (TIPHLOVA *et al.*, 1988; BARBOZA *et al.*, 2015). No entanto, nosso estudo não obteve esse efeito nas culturas de *P. agglomerans*, o que poderia reforçar que o efeito de biostimulação induzido pelo *laser* é dependente da espécie bacteriana.

5.6 Formação de biofilme

Existe uma relação entre a formação de biofilme e a resistência antimicrobiana, pois os biofilmes maduros produzem microambientes de proteção para bactérias, fazendo com que as bactérias fiquem com tolerância máxima (resistência) aos antibióticos (GUO *et al.*, 2010; HOBY *et al.*, 2010). Células em biofilmes são consideradas de 100 a 1.000 vezes mais resistentes a antibióticos e desinfetantes do que as células planctônicas (livres) (FENG *et al.*, 2015). Bactérias em biofilmes crescem mais lentamente, o que diminui a absorção de drogas e outras alterações fisiológicas, prejudicando a eficácia dos antibióticos (GUO *et al.*, 2010; DONLAN *et al.*, 2002). Em nosso estudo, a formação de biofilme foi avaliada em culturas de *P. agglomerans* expostas aos *lasers* monocromáticos e dicromáticos de baixa potência.

Curiosamente, o *laser* infravermelho monocromático não alterou a formação de biofilmes em culturas de *P. Agglomerans* na maior fluência (140 J/cm²), mas o *laser* vermelho aumentou a formação de biofilme na fluência mais baixa (35 J/cm²) (Figura 8). Estes resultados sugerem que a diminuição da resistência a antibióticos induzida por *lasers* de baixa potência não está relacionada com a formação de biofilme. As feridas crônicas apresentam populações bacterianas persistentes tipicamente organizadas em biofilmes altamente organizados. Estas comunidades complexas de bactérias são incorporadas em uma matriz de polissacarídeos extracelulares e que, por sua vez, tornam-se um impedimento primário para cicatrização de feridas (GUO *et al.*, 2010; LATIFA et al., 2016).

Alguns autores relataram que o *laser* de baixa potência tem efeitos inibitórios no biofilme microbiano oral, como em culturas de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* (BASSO *et al.*, 2011). Apesar do *laser* vermelho em baixa fluência aumentar a formação de biofilmes, o *laser* de baixa potência dicromático simultâneo diminui a formação de biofilme em culturas de *P. agglomerans* na maior fluência (Figura 8), sugerindo que o *laser* dicromático de baixa potência poderia auxiliar na redução dos fatores associados à cronicidade da ferida.

Nossos resultados sugerem ainda que o *laser* dicromático, em alta fluência, tem efeito bactericida relevante sobre *P. agglomerans* e não induz respostas ao estresse, como a filamentação e aglomerado celular. Além disso, a exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho monocromáticos e dicromáticos não alteram a sobrevivência, a filamentação e

aglomeração celular bacteriana em culturas estacionárias de *P. agglomerans*, pelo menos nas fluências avaliadas.

CONCLUSÃO



Figura 11 - Esquema ilustrativo com o resumo dos dados

Legenda: O *laser* monocromático vermelho aumentou a sobrevivência bacteriana e formação de biofilme sem alterar significativamente os demais resultados; o *laser* monocromático infravermelho aumentou a sobrevivência bacteriana e diminuiu a resistência antimicrobriana sem alterar significativamente os demais resultados; o *laser* dicromático diminuiu a sobrevivência bacteriana e formação de biofilme sem alterar significativamente os demais resultados.

Em conclusão, nosso trabalho sugere que a inibição e a estimulação do crescimento bacteriano depende de parâmetros de irradiação a *laser*, uma vez que a radiação laser dicromática induz efeitos biológicos que diferem da induzida pela radiação laser monocromática. Porém, o *laser* dicromático de baixa potência pode ser uma nova opção para o tratamento de feridas infectadas, pois induz a redução da sobrevivência bacteriana e formação de biofilmes, não alterando a resistência aos antibióticos e a taxa de divisão nas culturas de *Pantoea agglomerans*.

REFERÊNCIAS

AMMONS, M. C. B. *et al.* Biochemical Association of Metabolic Profile and Microbiome in Chronic Pressure Ulcer Wounds. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, e0126735. 2015.

ANDRADE, F. S. S. D.; CLARK R. M. O.; FERREIRA M. L. Effects of low-level laser therapy on wound healing. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 41, n. 2. 2014.

BAGNATO, V. S. Laser e suas aplicações em Ciência e Tecnologia. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2008.

BAGNATOa, V.S. **Novas técnicas ópticas para as áreas de saúde**. São Paulo: Editora Livraria da Física. 2008.

BARBOZA, L.L. *et al.* Low-intensity red and infrared laser effects at high fluences on Escherichia coli cultures. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 10, p.945-52. 2015.

BASSO, F. G. *et al.* In Vitro effect of low level laser therapy on typical oral microbial biofilms. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n. 6, p.502-10. 2011.

BEIJERINCK, M. W. Die bakterien der papilionaceenknöllchen. **Botanische Zeitung**, v. 46, p.740-750. 1888.

BRINÃS, L. *et al.* Beta-lactamases in ampicillin resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 10, p. 3156-63. 2002.

BRITO, P. A.; DE VASCONCELOS, G. S.; CORREIA M. I. Prevalence of pressure ulcers in hospitals in Brazil and association with nutritional status - a multicenter, cross-sectional study. **Nutrition**. v. 29, n. 4, p.646-649. 2013.

BLANES, L. *et al.* Avaliação clínica e epidemiológica das úlceras por pressão em pacientes internados no Hospital São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 2. 2004.

BLUESTEIN, D.; JAVAHERI, A. Pressure ulcers: prevention, evaluation, and management. **American Family Physician**, v. 78, n. 10, p.1186-1194. 2008.

CANO, A. *et al.* Improving Outcomes by Implementing a Pressure Ulcer Prevention Program (PUPP): Going beyond the Basics. **Healthcare**, v. 3, n. 3, p.574–585. 2015.

CANUTO, K. S. *et al.* Low-level red laser therapy alters effects of ultraviolet C radiation on *Escherichia coli* cells. Laser Physics Letters, v. 48, n. 10, p.939–944. 2013.

CAPPUCCINO, J. G. ; SHERMAN N. Microbiology: A Laboratory Manual. Menlo Park: Benjamin Cummings. 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S26E. Wayne, Pennsylvania. 2016.

CHEN, A. C. *et al.* Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **PLoS One**. v. 6, n. 7, p.e22453. 2011.

CONVISSAR, R. A. **Princípios e práticas do laser na Odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

COSTA, A. F.; ASSIS J. C. In vitro assessment of the bactericidal effect of low-power arsenium-gallium (AsGa) laser treatment. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 87, n. 4, p.654-656. 2012.

CHENG, A. *et al.* Bacteremia caused by Pantoea agglomerans at a medical center in Taiwan, 2000 e 2010. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 3, p.187-194. 2013.

CHUNG, H. *et al.* The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 2, p.516–533. 2012.

COSTA, M. P. *et al.* Epidemiologia e tratamento das úlceras de pressão: experiência de 77 casos. Acta Ortopédica Brasileira, v. 13, n. 3, p.124-133. 2005.

CRUZ, A. T.; CAZACU, A. C.; ALLEN C. H. *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p.1989–1992. 2007.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; HAMBLIN, M. R.; HEMARN, I. M. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. Advances in skin & wound care, v. 25, n. 7, p.304–314. 2012.

DIXIT, S. *et al.* Closure of non-healing chronic ulcer in Klippel–Trenaunay syndrome using low-level laser therapy. **British Medical Journal Case Reports**, pii: bcr2012006226. 2012.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p.167–193. 2002.

DRAWZ, S. M.; BONOMO R. A. Three decades of β-lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p.160-201. 2010.

DUTKIEWICZ, J. *et al. Pantoea agglomerans:* a marvelous bacterium of evil and good.Part I. Deleterious effects: Dust-borne endotoxins and allergens - focus on cotton dust. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 22, n. 4, p.576-588. 2015.

DUTKIEWICZ, J. *et al. Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 23, n. 2, p.197–205. 2016.

EDSBERG L. E. *et al.* Revised National Pressure Ulcer Advisory Panel Pressure Injury Staging System: Revised Pressure Injury Staging System. Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing, v. 43, n. 6, p.1-13. 2016.

EWING, W. H.; FIFE M. A. *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) comb. nov. (the Herbicola-Lathyri bacteria). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 22, n. 1, p.4–11. 1972.

FENG, G. *et al.* Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduces by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough? **npj Biofilm and Microbiomes**, 15022. 2015.

FERREIRA, A. M.; ANDRADE D. *Swab* de feridas: recomendável? **Revista enfermagem UERJ**. v. 14, n. 3 p.440-446. 2006.

FREITAS, L. F.; HAMBLIN M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3. 2016.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. Journal of Infection and Public Health, pii: S1876-0341, n. 16, p.30127-7. 2016.

FONSECA, A. S. *et al.* Low Intensity Infrared Laser Induces Filamentation in *Escherichia coli* Cells. Laser Physics, v. 21, n. 10, p. 1829-1837. 2011.

FONSECA, A. S. *et al.* Low Level Infrared Laser Effect on Plasmid DNA. Lasers in Medical Science, v. 27, n. 1, p.121-130. 2012.

GARCEZ, A. S., NUNES, S. C., RIBEIRO, M. S. Aplicações clínicas do laser em baixa intensidade para a biomodulação e terapia fotodinâmica. São Paulo: Artes Médicas. 2008.

GARCEZ, A. S., NUNES, S. C., RIBEIRO, M. S. Laser de Baixa Potência: Princípios Básicos e Aplicações Clínicas na Odontologia. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012.

GAVINI, F. *et al.* Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing & Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of Pantoea dispersa sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 337–345. 1989.

GENOVESE, W. J. Efeitos terapêuticos do laser de baixa intensidade: Laser de baixa intensidade – aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Livraria Santos. 2000.

GUO, S. *et al.* Factors Affecting Wound Healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p.219-229. 2010.

HAMBLIN, M. R.; SOUSA, M. V. P.; AGRAWAL, T. Handbook of Low-Level Laser Therapy. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. 2017.

HOBY, N. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p.322-32. 2010.

HU, W. P. *et al.* Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 8, p.2048–2057. 2007.

HUANG, Y. *et al.* Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v. 7, n. 4, p.358–383. 2009.

KANDOLF-SEKULOVIC, L. ; KATARANOVSKI, M. ; PAVLOVIC, M. D. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 19, n. 4, p. 203-212. 2003.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p.691-704. 1989.

KARU, T. *et al.* Two different mechanisms of low intensity laser photobiological effects on *Escherichia coli*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 24, n. 3, p.155-161. 1994.

KARU, T. Primay and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 49, n. 1, p.1-17. 1999.

KARU, T. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Science**, v. 2, n. 1, p.53-74. 1988.

KARU, T. Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy). **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 20, n. 2. 2014.

KARU, T. Multiple Roles of Cytochrome *c* Oxidase in Mammalian Cells Under Action of Red and IR-A Radiation. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology for Life Scientists**, v. 62, n. 8, p.607-610. 2010.

KLEBENSBERGER, J. *et al.* SiaA and SiaD Are Essential for Inducing Autoaggregation as a Specific Response to Detergent Stress in *Pseudomonas Aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 12, p.3073-3086. 2009.

KLEBENSBERGER, J. *et al.* Cell Aggregation of Pseudomonas Aeruginosa Strain PAO1 as an Energy-Dependent Stress Response During Growth With Sodium Dodecyl Sulfate. **Archives of Microbiology**, v. 185, n. 6, p.417-427. 2006.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** Rio de Janeiro: MEDSI, 2014.

KUJAWA, J. *et al.* Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm2) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 22, n. 2, p.111-117. 2004.

LATIFA, K. *et al.* Evaluation of physiological risk factors, oxidant-antioxidant imbalance, proteolytic and genetic variations of matrix metalloproteinase-9 in patients with pressure ulcer. **Scientific Reports**, v. 6, n. 29371. 2016.

LEVINE, N. S. *et al.* The quantitative swab culture and smear: A quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wounds. **The Journal of trauma**, v. 16, n. 2, p.89-94. 1976.

LIBERATO, M. C. *et al.* Six cases of sepsis caused by *Pantoea agglomerans* in a teaching hospital. **New Microbiologica**, v. 32, n. 1, p.119-123. 2009.

LUCAS, C.; van GEMERT, M. J.; de HAAN, R. J. Efficacy of low-level laser therapy in the management of stage III decubitus ulcers: a prospective, observer-blinded multicentre randomised clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 2, p.72-77. 2003.

LYDER, C. H; AYELLO, E. A. **Pressure Ulcers: A Patient Safety Issue.** Rockville: AHRQ. 2008.

MARCIANO, R. S. *et al.* Laser for treatment of aphthous ulcers on bacteria cultures and DNA. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, n. 9, p.1476-1483. 2012.

MARTÍNEZ, J. L. ; BAGUERO, F. ; ANDERSSON D. I. Predicting antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p.958-965. 2007.

MARTINS M. A. *et al.* Úlcera crônica de perna de pacientes em tratamento ambulatorial: análise microbiológica e de suscetibilidade antimicrobiana. **Ciência**, **Cuidado e Saúde**, v. 9, n. 3, p.464-470. 2010.

MARTINS, W. A. *et al.* Dichromatic laser radiation effects on DNA of *Escherichia coli* and plasmids. Laser Physics, v. 25, n. 4, 045603. 2015.

MOSKVIN, S. V. Low-Level Laser Therapy in Russia: History, Science and Practice. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 8, n. 2, p.56-65. 2017.

NAHA, K.; RAMAMOORTHI; PRABHU, M. Spontaneous septicaemia with multi-organ dysfunction - a new face for Pantoe agglomerans? **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 1, p.83-84. 2012.

NELSON, D. L; COX, M. Lehninger - Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier, 2002.

NIEMZ, M. H. Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and applications. New York: Springer. 2007.

NUSSBAUM, E. L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of 810 nm Laser Irradiation on in Vitro Growth of Bacteria: Comparison of Continuous Wave and Frequency Modulated Light. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 31, n. 5, p.343-351. 2002.

NUSSBAUM, E. L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of low-level laser therapy (LLLT) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 21, n. 5, p.283-290. 2003.

NUSSBAUM, E. L. *et al.* Effects of low intensity laser irradiation during healing of infected skin wounds in the rat. **Photonics & Lasers in Medicine**, v. 3, n. 1, p.23-36. 2014.

ORTÍZ, M. C. S. *et al.* Effects of low level laser therapy and high voltage stimulation on diabetic wound healing. **Revista Universidad Industrial de Santander Salud**, v. 46, n. 2, p.107-117. 2014.

PANG, Y. *et al.* Effect of ultraviolet irradiation and chlorination on ampicillinresistant *Escherichia coli* and its ampicillin resistance gene. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 10, n. 3, p.522-530. 2016.

PEREIRA, P. R. *et al.* Effects of low intensity laser in vitro bacterial culture and in vivo infected wounds. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 41, n. 1, p.49-55. 2014.

PINHEIRO, C. C. *et al.* Low-level lasers affect *Escherichia coli* cultures in hyperosmotic stress. **Laser Physics**, v. 25, n. 8, 085602. 2015.

RAHIM, K. *et al.* Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 3, p.710-721. 2017

RANJBAR, R.; TAKHTFOOLADI, M. A. The effects of photobiomodulation therapy on *Staphylococcus aureus* infected surgical wounds in diabetic rats. A microbiological, histopathological, and biomechanical study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, n. 8. 2016.

ROCHA, J. C. *et al.* Low-Level Laser Therapy (904nm) Can Increase Collagen and Reduce Oxidative and Nitrosative Stress in Diabetic Wounded Mouse Skin. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 164, p.96-102. 2016.

RODRIGUES, A. L. S. et al. Pantoea agglomerans liver abscess in a resident of

Brazilian Amazonia. Tropical Gastroenterology, v. 30, n. 3, p.154–155. 2009.

SANTOS, N. *et al.* Low intensity red laser action on *Escherichia coli* cultures submitted to stress conditions. **Laser Physics**, v. 24, n. 12, 125603. 2014.

SERGIO, L. P. S. *et al.* Therapeutic low-intensity red laser for herpes labialis on plasmid survival and bacterial transformation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 12, n. 5, p.930–935. 2013.

SEN, C. K. *et al.* Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair** Regen, v. 17, n. 6, 763-771. 2009.

SENGUPTA, M. *et al.* Early Onset Neonatal Septicaemia caused by *Pantoea agglomerans*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 5, p.DD01-DD02. 2016.

SILVEIRA, P. C. *et al.* Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, n. 2, p.89-92. 2009.

SHARMA M et al. Multidrug resistant *Pantoea agglomerans* in a patient with septic arthritisa rare report from India. **International Journal of Microbiology Research**, v. 4, p.263-265, n. 6. 2012.

SOLMAZ, H. *et al.* Photobiomodulation of Wound Healing via Visible and Infrared Laser Irradiation. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 4, p.903-910. 2017.

SPERANDIO, F. F. *et al.* Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. **Journal of Biophotonics**. v. 8, n. 10, p.795–803. 2015.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p.175-179. 2000.

TECON, R. *et al.* Symplasmata are a clonal, conditional, and reversible type of bacterial multicellularity. **Scientific Reports**, v. 6, 31914. 2016.

TIPHLOVA, O. A.; KARU, T. Effect of low-intensity monochromatic visible light on the growth of Escherichia coli. **Microbiology**, v. 56, n. 4, p.492-496. 1987.

TIPHLOVA, O. A.; KARU, T. Stimulation of Escherichia coli division by low-intensity monochromatic visible light. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 48, n. 4, p.467-71. 1988.

THOMAS, D. R.; COMPTON, G. **Pressure Ulcers in the Aging Population: A Guide for Clinicians**. New York: Humana Press. 2014.

TSAI, S; HAMBLIN, M. R. Biological effects and medical applications of infrared radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 170, p.197-207. 2017.

VAIMAN, M.; LAZAROVICH, T; LOTAN, G. *Pantoea agglomerans* as an indicator of a foreign body of plant origin in cases of wound infection. **Journal of Wound Care**, v. 22, n. 4 , p.182, 184-5.

VENINCASA, V. D. *et al.* Endophthalmitis caused by *Pantoea agglomerans*: clinical features, antibiotic sensitivities, and outcomes. **Clinical Ophthalmology**, v. 9, p.1203-1207. 2015.

VOLKSCH, B. *et al.* Polyphasic study of plant- and clinic-associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p.1381–1391. 2009.

WADA, A.; NETO, N. T.; FERREIRA, M. C. Úlceras por pressão. **Revista de Medicina** (São Paulo), v. 89, n. 3/4, p.170-177. 2010.

WALKER, J. Fundamentals of physics. Hoboken: Wiley. 2011.

WORLD UNION OF WOUND HEALING SOCIETIES. **Principles of best practice: Wound infection in clinical practice**. London: MEP Ltd. 2008.

YAMADA, H. *et al.* Direct observation and analysis of bacterial growth on an antimicrobial surface. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 16, p.5409-5414. 2010.

ZHANG, Y. *et al.* cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 5, p.849–857. 2003.

APENDICE A – Artigo publicado

THOME, A. M. C.; SOUZA, B. P.; MENDES, J. P. M.; SOARES, L. C.; TRAJANO, E.T.L.; FONSECA, A S. Dichromatic and monochromatic laser radiation effects on survival and morphology of. Laser Physics, v. 27, p. 055602, 2017.

IOP Publishing | Astro Ltd Laser Phys. 27 (2017) 055602 (Rpp) Laser Physics https://doi.org/10.1080/1525-0011/as037c

Dichromatic and monochromatic laser radiation effects on survival and morphology of *Pantoea agglomerans*

A M C Thom⁴¹, B P Souza², J P M Mendes², L C Soares², E T L Trajano² and A S Fonseca^{1,3,4}

¹ Departamento de Biofísica e Biometría, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Boulevard Vinte e Otto de Seiembro, 87, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551030, Brazil

² Pró-Relioría de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Severito Sombra, Avenida Expedicionário Oswaldo de Almeida Ramos, 280, Centro, Vassouras 27700000, Brazil

³ Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rua Frei Caneca, 94, Rio de Janeiro 2021 1040, Brazil

⁴ Centro de Ciências da Saúde, Centro Universitário Serra dos Órgãos, Avenida Alberio Torres, 111, Teresôpolis, Rio de Janeiro 25964004, Brazil

E-mail: adaforseca@yahoo.com.br

Received 24 October 2016 Accepted for publication 24 February 2017 Published 28 March 2017



Abstract

Despite the beneficial effects of low-level lasers on wound healing, their application for treatment of infected injuries is controversial because low-level lasers could stimulate bacterial growth exacerbating the infectious process. Thus, the aim of this work was to evaluate *in vitro* effects of low-level lasers on survival, morphology and cell aggregation of *Pantoea agglomerans*. *P. agglomerans* samples were isolated from human pressure injuries and cultures were exposed to low-level monochromatic and simultaneous dichromatic laser radiation to study the survival, cell aggregation, filamentation and morphology of bacterial cells in exponential and stationary growth phases. Fluence, wavelength and emission mode were those used in therapeutic protocols for wound healing. Data show no changes in morphology and cell aggregation, but dichromatic laser radiation decreased bacterial survival in exponential growth phase and monochromatic red and infrared lasers increased bacterial survival at the same fluence. Simultaneous dichromatic laser radiation induces biological effects that differ from those induced by monochromatic laser radiation induces biological effects that differ could be the option for treatment of infected pressure injuries by *Pantoea agglomerans*.

Keywords: low-level laser, pressure injury, Pantoea agglomerans, dichromatic radiation

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

Pressure injuries (PI), called also decubitus ulcer, bedsore, pressure sore or pressure ulcer, are lesions on skin and/or underlying soft tissue usually over a bony prominence, related to a medical device, as result of pressure, pressure in combination with shear and/or friction [1–3].

PI could lead to devastating consequences for patients, significantly reducing the quality of life and increasing mortality,

1555-0011/17/055602+0522.00

besides widespread, painful and expensive health care problem [4-6]. It is estimated that there are over 7.4 million in the world and the prevalence in Brazil is 16.9% [3, 6, 7]. In United States of America, PI affect 2.5 million patients and the cost for treatment has been estimated at \$11 billion per year, with cost of US\$70.000 per patient [3, 5].

Low-level lasers (LLL) have been successfully used for tissue repair based on their biostimulation and biomodulation effects [8]. These effects would be explained by laser-induced

© 2017 Astro Ltd Printed in the UK

increase of ATP, DNA, RNA and protein synthesis, which led to increase of collagen synthesis and fibroblast proliferation improving the wound healing process. Also, there are evidences that LLL increase local blood flow, thereby increasing oxygen saturation and epithelization [9]. LLL have also biostimulation effect on bacterial cells, increasing their cell division rate and inducing some responses to stressful agents, as filamentation phenotype [10, 11].

Microorganisms, as mainly bacteria, could infect and damage the injured tissues, delaying healing and occasionally causing systemic illness [12]. In fact, PI can be targets for infections and lead to complications, such as septicemia, osteomyelitis and death, as one that caused the untimely death of the actor Christopher Reeve [3].

Despite some biological effects induced by LLL are reported, treatment of infected injuries based on LLL is controversial. Some studies have showed that LLL could stimulate bacterial growth, exacerbating the infectious process, but this hypothesis is not fully elucidated and the findings in the literature are disputed [10, 13]. Thus, studies are necessary to understand the effects of LLL on bacteria commonly found in infected injuries. Also, the fact of the lesion is infected or not, in most of the cases, is neglected at the time of irradiation. In this study were evaluated effects of LLL on survival, induction of filamentation and cell aggregation of Pantoea appiomerans.

2 Material and methods

2.1 Restorie sulture

P aggiomerans was obtained from PI by swab sterile from patients of Hospital Universitário Severino Sombra, Vassouras, Rio de Janeiro, Brazil, by standard procedure [14]. Collected materials were stored in Stuart's medium and immediately transported to the microbiology laboratory, where these materials were inoculated into Brain Heart Infusion Broth (Merck, USA) and incubated for 18h at 35 ± 2 °C.

2.2. Low-level laser

Therapeutic low-level red (660nm) and infrared (808nm) lasers were purchased from DMC Equipamentos Ltda (Brazil). Laser parameters are showed in table 1.

2.3. P aggiomerans cell survival

P. aggiomerans cultures were exposed to low-level red and infrared lasers and their survival was evaluated. From stocks in stationary growth phase, cultures of these strains were prepared to attain the exponential growth phase (108 cells m1-1, 4h, 37 °C). Other experiments were carried out with P applomerans cultures in stationary growth phase (1010cells mI-1, 18h, 37 °C). Bacterial cells were centrifuged twice (3200 rpm, 10min) and suspended in saline solution (0.9% NaCl) [15]. Aliquois (50 μ l, n = 4, for each fluence) of bacterial suspen-

			M C Thorné-er af	
Table 1. Low-level laser parameters.				
Parameter	Red later	Infrared laser	Dichromatic laser	
Wavelength (nm)	660	808	660 and 808	
Emission	Continuous	Continuous	Continuous	
mode	Wang	WENC	WSNG .	
Power (mW)	100	100	100	
Ruence	35, 70 and 140	35, 70 and 140	70 and 140	
(I cm ⁻²)				
Energy (I)	1, 2 and 4	1, 2 and 4	2 and 4	
Irradiation	10, 20 and 40	10, 20 and 40	10 and 20	
time (a)				
Spot size (cm²)	0.028	0.028	0.028	

light (fluorescent lamps), to low-level red and infrared lasers. The exposure time of the cells was automatically adjusted by the laser device as a function of the fluence. Laser device was positioned such that almost all the surface of the bacterial aliquot suspension was covered by the laser beam. Controls were hacterial suspensions not exposed to lasers. Immediately after exposure to laser, the bacierial suspensions were diluted in saline solution and spread onto Petri dishes containing soliditied rich medium (1.5% agar). Bacterial colonies were counted after incubation (37 °C, 18h) and the survival fractions were calculated [15]. Experiments were carried out in quadruplicate and the results represent the mean of four independent assays.

2.4. Bacterial filamentation assay

To evaluate filamentation induction, exponential and stationary P applomerate cultures were obtained and exposed to low-level red and infrared lasers as described in the bacterial survival assay. Bacterial suspensions not exposed to lasers were used as controls. Immediately after exposure, aliquots (20 µl) were withdrawn, spread onto microscopic slides and stained by the Gram method [16]. Bacterial cells were visualized using a Carl Zeiss Axio Scope A1 microscope (Germany) equipped with an A-plan 40/0.65 objective, a 0.90 condenser and a 100 W halogen lamp. The images were captured with an AxioCam HIRc Sony 12M color microscopy camera (Carl Zeiss), using AxioVision software. Thereafter, the images were analyzed by Image-Pro Plus 6.0 software for Windows XP (Media Cybernetics, Inc., USA) to measure the cell areas and determine the bacterial filamentation percentages. A bacterial filament was considered to be 2 times the mean area of bacterial cell [15].

2.5. Bacterial morphological measurements

Bacterial suspensions of exponential and stationary P applomerans cultures were exposed to low-level red and infrared lasers, aliquots were spread onto microscopic slides immediately after laser exposure, stained and bacterial cells were visualized by light microscopy (300 cells for each laser exposions were exposed, at room temperature and under while sure), as described in the bacterial filamentation assay method.

2

Lasar Phys. 27 (2017) 055002

Table 2. Survival fractions of *P* agglomerane cultures exposed to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers in exponential growth phase.

		Survival fraction		
Fluence (1 cm ⁻³)	Red laser	Infrated laser	Dichtomatic laser	
0	1.0 ± 0.18	1.0 ± 0.18	1.0 ± 0.18	
35	1.1 ± 0.20	0.9 ± 0.17		
70	0.9 ± 0.15	0.9 ± 0.19	1.2 ± 0.21	
140	$1.4 \pm 0.18^{\bullet}$	1.4 ± 0.31^{4}	$0.8\pm0.26^{\rm s}$	

 $^{1}p<0.05$ compared to control group (bacterial samples not exposed to lawrra).

Note: data are reported as mean and standard deviation.

2.6. Bactorial coll-aggregation measurements

To evaluate bacterial cell aggregation, exponential and stationary of *P* aggiomenant cultures were exposed to lowlevel red and infrared lasers as described in the bacterial survival and visualized by light microscopy, as in filamentation assay. For bacterial cell aggregations were evaluated cell areas and quantity. Experiments were carried out in triplicate and the results represent the mean of three independent assays.

2.7. Statistical analysis

Data are reported as means and standard deviation of bacterial survival fractions, bacterial filament percentages, area of the bacterial cells, area and quantity of cell aggregation. Data normality was verified by Shapiro–Wilk test, Kruskal–Wallis test was performed to determine possible statistical differences, followed by post hoc Dunn's tests, with p < 0.05 as the less significant level. InStat software for Windows XP (GraphPad Software, USA) was used to perform the statistical analyses.

3. Results

3.1. Survival of P. aggiomerans cultures exposed to low-level red and infrared lasers

Survival fractions in exponentially grown P. aggiomerans cultures exposed to low-level red and infrared lasers are showed in table 2. Data in this table show that exposure to dichromatic red and infrared LLL at 140 J cm⁻² significantly (p < 0.05) decreased the survival fraction, while monochromatic red and infrared lasers at the same fluence increased the survival fraction.

Survival fractions in stationary cultures of *P* agglomerants were evaluated to verify whether effects of low-level red and infrared laser are dependent on physiological conditions of the cells (table 3). In contrast to obtained in exponential *P* agglomerants cultures, survival fractions in stationary cultures were not significantly (p > 0.05) modified by exposure to both dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers. Table 3. Survival Fractions of *P* applorements cultures exposed to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers in stationary growth phase.

	Survival fraction		
Huence (1 cm ⁻²)	Red laser	Infrared laser	Dichromatic laser
0	1.0 ± 0.22	1.0 ± 0.22	1.0 ± 0.22
35	1.0 ± 0.39	1.3 ± 0.46	_
70	1.1 ± 0.31	1.1 ± 0.42	1.0 ± 0.41
140	1.1 ± 0.38	1.0 ± 0.40	1.1 ± 0.46

Note: data are reported as mean and standard deviation.

3.2. Filamentation induction in P agglomenans cultures exposed to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers

Bacierial filaments and bacierial filament percentages in exponentially grown P aggiomerans cultures are showed in figure 1 and table 4, respectively. Data in this table show that dichromatic and monochromatic red and infrared lasers did not significantly (p > 0.05) induce filamentation phenotype in these bacterial cultures.

Stationary P. aggiomerana cultures were also exposed to red and infrared lasers to evaluate filamentation induction (figure 2 and table 5). Similar to the results obtained in exponential cultures, exposure to dichromatic and monochromatic red and infrared lasers did not induce significant (p > 0.05) filamentation in stationary P. aggiomerana cultures.

3.3. Effect of dichromatic and monochromatic low-level red and intrared lasers on the surface area of P aggiomerans cells

Surface areas of individual *P. aggiomerons* cells were evaluated after exposure to dichromatic and monochromatic lowlevel red and infrared lasers. Data in tables 6 and 7 show that these lasers did not induce significant (p > 0.05) alterations on surface areas of exponential and stationary *P. aggiomerons* cells.

3.4. Effect of dichromatic and monochromatic low-level red and intrared lasers on quantity and surface area of P.aggiomerans bacterial cell-aggregation

Quantity P aggiomerant bacterial cell-aggregation was evaluated after exposure to dichromatic and monochromatic lowlevel red and infrared lasers in exponential and stationary growth phases (figures 3 and 4; tables 8 and 9, respectively). Data indicate that there was no significant (p > 0.05) alteration on quantity of bacterial cell-aggregation after exposure to these lasers in exponential and stationary P aggiomerant cultures, when compared with control group.

Tables 10 and 11 show values of surface areas of *P. agglomerans* bacterial cell-aggregation after exposure to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers in exponential and stationary growth phases, respectively. Data show that these lasers did not induce significant (p > 0.05)

AMC Thornther all

70





Figure 1. Photographs of *P. applomenars* cells, in exponential growth phase, exposed to monochromatic and dichromatic lasers. Bacterial cultures were centrifuged (3200 pm, 10 min) and suspended in saline solution (0.9% NaCl). Samples of these bacterial suspensions were exposed to laser at different fluences and wavelengths in continuous wave. Aliquots were spread onto microscopic alidea and stained by Gram method and photographed (40x magnification), (a) control, (b) 140 J cm⁻² red laser, (c) 140 J cm⁻² infrared laser, (d) 140 J cm⁻² dichromatic laser. Arrown indicate bacterial filaments.

Table 4. Bacterial filament percentages in *P. agglomenars* cultures exposed to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers in exponential growth phase.

	Ba	Bacterial filament percentage		
Fluence (] cm ⁻³)	Red laser	Infrated laser	Dichromatic laset	
0	52 ± 0.32	5.2 ± 0.32	52 ± 0.32	
35	53 ± 1.63	4.8 ± 0.53		
70 140	3.4 ± 0.89 5.9 ± 2.75	6.0 ± 1.21 4.1 ± 1.18	5.9 ± 2.30 6.6 ± 2.26	

Note: data are reported as mean and standard deviation.

alterations on surface areas of *P. aggiomerans* bacterial cellaggregation in both growth phases.

4. Discussion

Several studies have been conducted to understand the tissue repair process and the effects of LLL on wound healing. However, there is no consensus in the literature with respect to these coherent radiation-induced effects at low fluences on bacterial growth and whether bacteria in PI can affect the wound-healing process [17, 18]. Moreover, low and highly coherent radiations affect differently the state of host-parasite depending on cell size, which is considered the discrimination threshold of the radiation coherence property [19].

Our research shows that bacterial survival in exponential growth phase is decreased by dichromatic low-level laser exposure and increased by monochromatic laser exposure at the same fluence (table 2). These results could be explained by P. appiomerans is aerobic bacterial cell and the most probable primary photoacceptors for light-growth responses in bacteria are some of the respiratory chain components (as dehydrogenases and terminal oxidases, as cytochrome o and d) and oxidative stress could be involved [20, 21]. Based on previous studies with dichromatic laser irradiation, it is possible to suggest that there is an intimate connection between the photoacceptors for red and infrared radiations, with respiratory chain components playing a key role for absorption of both radiations and photosignal transduction. Then, effects of infrared and red radiations could be additive causing bacterial inactivation. On the other hand, monochromatic radiation increases bacterial survival at the higher fluence (140 J cm-2). It is possible that, in both cases, the same molecules can serve as photoacceptors, but the laser fluence determines the response [21-23]. Some authors have reported data about consecutive dichromatic laser (infrared laser immediately after red laser) radiation with other parameters and bacterial specie. Martins and co-workers show that low-level consecutive dichromatic laser radiation at fluences used in low-level laser therapy reduces cell viability in wild type Excherichia coll cultures in exponential growth phase, but cell viability is higher in cultures exposed to dichromatic radiation than in those exposed to monochromatic infrared laser [24]. Despite of this discrepancy, both reported that low-level dichromatic laser radiation induces biological effects, which differ from those induced by monochromatic laser radiation, suggesting that other therapeutic effects could be obtained using dichromatic radiation [11, 24]. Bacterial survival in stationary growth phase was
Laser Phys. 27 (2017) 055602





Figure 2. Photographs of *P. applomerars* cells, in stationary growth phase, exposed to monochromatic and dichromatic lasers. Bacterial cultures were contributed (320 pm, 10 min) and suspended in saline solution (0.9% NaCl). Samples of these bacterial suspansions were exposed to laser at different fluences and wavelengths in continuous wave. Aliquets were spread onto microscopic alides and stained by Gram method and photographed (40x magnification), (a) control, (b) 140 J cm⁻¹ red laser, (c) 140 J cm⁻² infrared laser, (d) 140 J cm⁻² dichromatic laser. Arrows indicate bacterial fluences.

Huence (I cm⁻²)

0

35

70

140

Table 5. Bacterial filament percentages in *P. applomware* cultures exposed to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers in stationary growth phase.

Table 7. Surface areas of individual P. apploratous cells exposed
to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared laser
in stationary growth phase.

Surface area of individual cells

Infrated laser

 63 ± 0.97

 63 ± 0.15

 62 ± 0.49

 63 ± 0.31

Dichromatic

 63 ± 0.97

 7.0 ± 0.86

 63 ± 0.59

lanet.

	Ba	Bacterial filament percentage		
Plastice (J cm ⁻³)	Red laser	Infrared laser	Dichromatic laser	
0	5.8 ± 1.03	5.8 ± 1.03	5.8 ± 1.03	
35	4.5 ± 1.30	5.7 ± 0.50		
70	4.6 ± 1.64	4.4 ± 1.35	6.8 ± 3.88	
140	5.4 ± 1.46	5.7 ± 0.60	4.9 ± 1.07	

Note: data are reported as mean and standard deviation.

Red laser

 6.3 ± 0.97

 6.1 ± 0.40

 6.2 ± 0.78

 6.7 ± 0.11

Table 6. Surface areas of individual *P. applomenane* cells expresed to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers in exponential growth phase.

	Surface area of individual cells		
Fluence (1 cm ⁻²)	Red laser	Infrated laser	Dichromatic laser
0	6.2 ± 0.59	6.2 ± 0.59	6.2 ± 0.59
35	5.9 ± 0.26	5.5 ± 0.61	
70	6.0 ± 0.44	5.5 ± 1.00	5.2 ± 1.13
140	6.3 ± 0.47	6.4 ± 0.81	$\textbf{5.8} \pm \textbf{0.75}$

Note: data are reported as mean and standard deviation.

Note: data are reported as mean and standard deviation.

evaluated to verify whether this effect is dependent on bacterial growth phase (table 3). Interestingly, both infrared and red laser does not alter cell survival in stationary *P. aggiomeraus* cultures. These results reinforce that effects on bacterial •

survival by low-level red and infrared laser are dependent on physiological or metabolic conditions of the cells [25].

Bacterial cells present some morphological responses as strategies to survival to physical and chemical stressful agents and environment [26, 27]. Filamentation occurs when cell growth continues in absence of cell division resulting in clongated cells, which have multiple chromosomal copies [28]. Although dichromatic laser decreases cell survival in exponential *P. aggiomerani* cultures (table 2), filamentation phenotype (table 4) is not induced and cell areas (table 6) are not increased in these cultures. Similarly, in stationary cultures (tables 5 and 7). These results do not agree with results from *E. coll* exposed to low-level infrared laser and dichromatic red and infrared laser at similar fluences, suggesting that filamentation induced by exposure to LLL is dependent on bacterial specie [24, 25]. On the other hand, expose to monochromatic laser increases the cell survival in exponential *P. aggiomerany*

5

Laser Phys. 27 (2017) 055602





Figure 3. Photographs of *P. applomerane* bacterial cell-aggraphice, in exponential growth phase, exposed to monochromatic and dichromatic lasers. Bacterial colores were contributed (3200 pm, 10 min) and scopended in values obtion (0.9% NaCO. Samples of these bacterial supervisors were exposed to laser at different fleeness and wavelengths in continuous wave. Aliquots were spread onto microscopic slides and stained by Gram method and photographed (40x 'magnification), (a) control, (b) 140 J cm⁻² red laser, (c) 140 J cm⁻² infrared laser, (d) 140 J cm⁻² dichromatic laser. Arrows indicate cell aggregation.



Figure 4. Photographs of *P. applomerans* bacterial cell-aggregation, in stationary growth phase, exposed to monochrientatic and dichromatic lasers. Bacterial cultures were contributed (3200 pm, 10 min) and suspended in saline solution (0.9% NaCl). Samples of these bacterial suspensives were exposed to laser at different flaences and wavelengths in continuous wave. Aliquots were special onto microscopic slides and staised by Gram method and photographed (40x magnification), (a) control, (b) 140 J cm⁻³ rad laser, (c) 140 J cm⁻² infrared laser, (d) 140 J cm⁻² dichromatic laser. Arrows indicate cell-aggregation.

¢

Table 8. Quantity of *P. agglomorans* hasterial cell-aggregation exposed to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers in exponential growth phase.

	Quantity	Quantity of bacterial cell-aggregation		
Fluence (1 cm ⁻²)	Red laser	Infrared laser	Dichromatic laser	
0	8.0 ± 1.00	8.0 ± 1.00	8.0 ± 1.00	
35	16.0 ± 6.08	103 ± 1.53		
70	10.1 ± 5.23	10.4 ± 1.26	10.9 ± 6.80	
140	10.5 ± 3.50	14.7 ± 1.15	11.5 ± 6.40	

Note: data are reported as mean and standard deviation.

Table 9. Quantity of *P. applorments* bacterial cell-appropriation exposed to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers in stationary growth phase.

	Quantity	Quantity of hacterial cell-aggregation		
Fluence (J cm ⁻²)	Red laser	Infrared laser	Dichromatic laser	
0	7.0 ± 4.36	7.0 ± 4.36	7.0 ± 4.36	
35	7.0 ± 1.73	5.7 ± 2.08		
70	6.0 ± 4.63	4.7 ± 0.58	7.0 ± 2.65	
140	11.3 ± 6.03	9.7 ± 1.53	6.3 ± 1.53	

Nois: data are recorded as mean and standard deviation.

cultures (table 2), according to reported for *E. coll* cultures exposed to infrared laser, but filamentation phenotype and cell areas are not increased (table 4) [25].

Individual cells within bacierial populations can occur as freely suspended single cells or in cell aggregates [29]. Factors that promote aggregation are not completely understood, but it is known that cell-aggregation is a response to stressful conditions, as toxic chemicals, and a survival strategy. In a part of an aggregate, bacteria can persist due to potential increase of resistance to antibiotics and disinfectants when compared to individual bacteria [30]. Data were not found about cellaggregation induced by exposure to LLL at therapeutic fluences. However, our data show that LLL does not increase cell aggregates formation in exponential and stationary *P. aggiomerans* cultures (tables 8 and 9), respectively.

As filamentation and cell aggregation are survival strategies used by bacteria to protect themselves and to intensify resistance to stressful agents, wound healing could be affected, since prolonged infection is a common problem in chronic wounds, frequently resulting in nonhealing and significant patient morbidity and mortality [31, 32]. On the other hand, results demonstrated that LLL are effective to modulate tissue repair significantly contributing to a faster and more organized healing process, but infectious conditions are commonly identified as contraindications for LLL because some results showed that bacterial culture growth is stimulated by I.I.I. [23, 33–35]. However, our results show that dichromatic laser at high fluence has relevant bactericidal effect on P. agglomerans and did not induce stress responses, filamentation and cell aggregation. In addition, exposure to monochromatic and dichromatic red and infrared lasers does not alter the survival, filamentation and bacterial cell-aggregation A M C Thomé et al

Table 10. Surface area of P. agglowerare bacterial cell-aggregation exposed to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared bases in stationary growth phase.

	Surface area of bacterial cell-aggregation		
Fluence (J cm ⁻³)	Red laser	Infrared lawor	Dichromatic laser
0	18.7 ± 3.63	18.7 ± 3.63	18.7 ± 3.63
35	19.9 ± 1.98	15.6 ± 3.83	
70	16.7 ± 3.14	18.4 ± 4.94	17.6 ± 7.64
140	24.7 ± 1.79	23.7 ± 2.27	25.6 ± 4.53

Note: data are reported as mean and standard deviation

Table 11. Surface area of P. applowerare bacterial cell appropriot exposed to dichromatic and monochromatic low-level red and infrared lasers in stationary growth phase.

	Quantity of bacterial cell-aggregation		
Fluence (J cm ⁻²)	Red laser	Infræed læer	Dichromatic laser
0	23.9 ± 5.12	23.9 ± 5.12	23.9 ± 5.12
35	22.7 ± 3.44	22.2 ± 5.01	
70	20.9 ± 5.05	22.4 ± 1.64	25.3 ± 6.93
140	23.7 ± 5.75	25.4 ± 3.27	23.1 ± 1.34

Note: data are reported as mean and standard deviation.

in stationary P. aggiomerans cultures, at least at the fluences evaluated.

5. Conclusion

In conclusion, our research suggests that inhibition and stimulation of bacterial growth depend on laser irradiation parameters, since dichromatic laser radiation induces biological effects that differ from those induced by monochromatic laser radiation and simultaneous dichromatic laser could be the option for treatment of infected pressure injuries by Pantoea aggiomerans.

Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) and Universidade Severino Sombra.

Compliance with ethical standards

Ethics statement

All experiments were conducted and approved in accordance with the guidelines of the Comilë de Etica e Pesquisa of Universidade Severino Sombra and adhered to the principles of the CNS Resolution 146/12 and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All participants provided their written consent to participate in