

## **Avaliação de efeitos de *laser* vermelho de baixa potência em culturas de *Escherichia coli* incubadas com ampicilina**

### **Evaluation of low-level red laser effects on *Escherichia coli* cultures incubated with ampicillin**

Caroline Gonçalves de Paula<sup>1</sup>, Adenilson de Souza da Fonseca<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Serra dos Órgãos, Aluna do Curso de Ciências Biológicas; <sup>2</sup>Centro Universitário Serra dos Órgãos, Docente dos Cursos de Medicina e Fisioterapia

#### **Resumo**

*Lasers* são fontes de radiação monocromática e colimada que, em baixas intensidades, são utilizadas como recurso terapêutico para tratamento de doenças em diferentes tecidos biológicos. Entretanto, poucos estudos avaliaram efeitos destes *lasers* em sistemas biológicos em condições de estresse. O objetivo deste estudo foi avaliar efeitos do *laser* vermelho (658 nm) de baixa potência na sobrevivência de culturas de *Escherichia coli* incubadas com ampicilina. Culturas de *E. coli* AB1157 (proficiente em mecanismos de reparo do DNA) foram expostas ao *laser* vermelho (660nm) em diferentes fluências (1, 4 e 8J/cm<sup>2</sup>) e incubadas com ampicilina (1 µg/mL, 30 minutos, 37 °C). Como controles, alíquotas não expostas ao *laser* e não incubadas com ampicilina, alíquotas somente incubadas com ampicilina e alíquotas expostas somente ao *laser*. Em seguida, alíquotas foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) e semeadas em placas de *Petri*, contendo meio nutritivo sólido (agar 1,5%). Após incubação (18 horas, 37 °C), as unidades formadoras de colônias foram contadas e calculadas as frações de sobrevivência. Os valores das frações de sobrevivência obtidas foram (média±desvio padrão): 1,0±0,08 (controle); 1,0±0,10 (controle ampicilina); 1,0±0,14 (*laser* 1J/cm<sup>2</sup>); 1,2±0,15 (*laser* 4J/cm<sup>2</sup>); 1,1±0,18 (*laser* 8J/cm<sup>2</sup>); 1,3±0,16 (*laser* 1J/cm<sup>2</sup>+ampicilina); 1,5±0,20 (*laser* 4J/cm<sup>2</sup>+ampicilina) e 1,7±0,08 (*laser* 8J/cm<sup>2</sup>+ampicilina). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a exposição ao *laser* vermelho pode induzir mecanismos que aumentam a resistência de culturas de *Escherichia coli* AB1157 à ampicilina.

**Palavras-chave:** Ampicilina, DNA, *Escherichia coli*, estresse, *laser*.

#### **Abstract**

Lasers are monochromatic and collimated radiation sources, which at low intensities are used as a therapeutic tool for the treatment of diseases in different biological tissues. However, there are few studies evaluating the effects of these lasers on biological systems under stress conditions. The aim of this study was to evaluate effects of a low-level red laser (658 nm) on survival of *Escherichia coli* cultures incubated with ampicillin. Cultures of *E. coli* AB1157 (proficient on DNA repair mechanisms) were exposed to low-level red laser (660 nm) at different fluences (1, 4, and 8 J/cm<sup>2</sup>) and incubated with ampicillin (1 µg/mL, 30 minutes, 37 °C). As controls, aliquots not exposed to laser and not incubated with ampicillin, aliquots incubated with ampicillin alone and, aliquots exposed to laser alone. Then, aliquots were diluted in saline solution (0.9% NaCl) and spread onto

Petri dishes containing solid nutrient medium (agar 1.5%). After incubation (18 hours, 37 °C), the colony forming units were counted and calculated the survival fractions. Values obtained for survival fractions were (mean±standard deviation): 1.0±0.08 (control), 1.0±0.10 (ampicilin control), 1.0±0.14 (laser 1J/cm<sup>2</sup>), 1.2±0.15 (laser 4J/ cm<sup>2</sup>), 1.1±0.18 (laser 8J/cm<sup>2</sup>), 1.3±0.16 (laser 1J/cm<sup>2</sup>+ampicilin), 1.5±0.20 (laser 4J/cm<sup>2</sup>+ampicilin) e 1.7±0.08 (laser 8J/cm<sup>2</sup>+ampicilin). Results in this study suggest that exposure to low-level red laser could induce mechanisms that increase the resistance of cultures *Escherichia coli* cultures to ampicillin.

**Keywords:** Ampicilin, DNA, *Escherichia coli*, stress, laser.

## INTRODUÇÃO

*Lasers* são fontes de radiação monocromática, coerente, colimada e alta densidade de energia (NIEMZ, 2007).

Desde as observações experimentais descritas por Mester no final da década de 1960 (Mester et al., 1968), *lasers* de baixa potência são utilizados em baixas fluências para tratamento de diferentes doenças de tecidos moles e tecido ósseo (DA SILVA et al., 2010), dentro da chamada janela terapêutica, que inclui o espectro da radiação vermelha ao espectro da radiação infravermelha próxima (NIEMZ, 2007). As aplicações terapêuticas destes *lasers* são baseadas no seu efeito bioestimulativo (ou biomodulador) (GAO & XING, 2009). Para tal, a energia da radiação *laser* deve ser absorvida por um cromóforo (fotorreceptor ou fotoceptor), constituindo a fase física, que será seguida pela fase química, com alterações em ligações e reações químicas em moléculas alvo. A citocromo c oxidase, componente da cadeia respiratória, tem sido considerada como principal cromóforo intracelular responsável pela absorção da radiação *laser* de baixa potência utilizada em protocolos terapêuticos (DA SILVA et al., 2010). Como consequência destas fases, os efeitos biológicos da radiação *laser* de baixa potência podem ocorrer através de uma sequência de eventos celulares e moleculares.

Tem sido sugerido que os fatores determinantes para os efeitos biológicos dos *lasers* de baixa potência incluem o comprimento de onda, a intensidade e o estado

fisiológico do sistema biológico exposto (GAO & XING, 2009). Resultados recentes obtidos em nosso laboratório têm sugerido que células em condições de estresse apresentam respostas diferentes daquelas apresentadas por aquelas em condições fisiológicas (SANTOS et al., 2014; PINHEIRO et al., 2015).

Assim, como poucos estudos avaliaram efeitos destes *lasers* em sistemas biológicos em condições de estresse, o objetivo deste estudo foi avaliar efeitos de *laser* vermelho (658 nm) de baixa potência na sobrevivência de culturas de *Escherichia coli* incubadas com ampicilina.

## METODOLOGIA

Para tal, suspensões de *Escherichia coli* AB1157, em fase estacionária de crescimento ( $5 \times 10^9$  células/mL, 18 horas, 37 °C), foram centrifugadas (5000 rpm, c15 minutos, centrífuga clínica) e ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9%). Alíquotas destas suspensões foram expostas ao *laser* vermelho em diferentes fluências (1, 4 e 8 J/cm<sup>2</sup>), com potência de 10 mW em modo contínuo de emissão, e incubadas com ampicilina (1 µg/mL, 30 minutos, 37 °C). Como controles, alíquotas das suspensões bacterianas não expostas ao *laser* e não incubadas com ampicilina, alíquotas somente incubadas com ampicilina e alíquotas expostas somente ao *laser*. Em seguida, alíquotas foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) e semeadas em placas de *Petri*, contendo meio nutritivo sólido

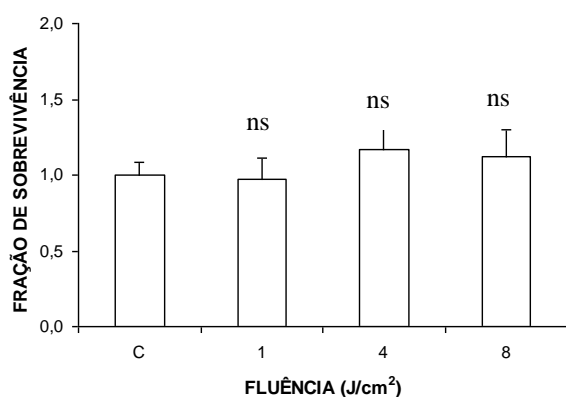
(agar 1,5%). Após incubação (18 horas, 37 °C), as unidades formadoras de colônias foram contadas e calculadas as frações de sobrevivência.

Os dados experimentais foram apresentados na forma de média e desvio padrão das frações de sobrevivência bacteriana. As comparações entre os grupos foram realizadas através de análise de variância de um critério, seguida de pós-teste de Bonferroni, com  $p < 0,05$  sendo considerado o menor nível de significância. A verificação da normalidade dos dados experimentais foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov, com  $p < 0,05$  sendo considerado o menor nível de significância. Para as análises estatísticas foi utilizado o software InStat Graphpad (GraphPad InStat for Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA).

## RESULTADOS

Na figura 1 estão apresentadas as frações de sobrevivência de culturas de *E. coli* AB1157 expostas ao *laser* vermelho (658 nm) de baixa potência em diferentes fluências.

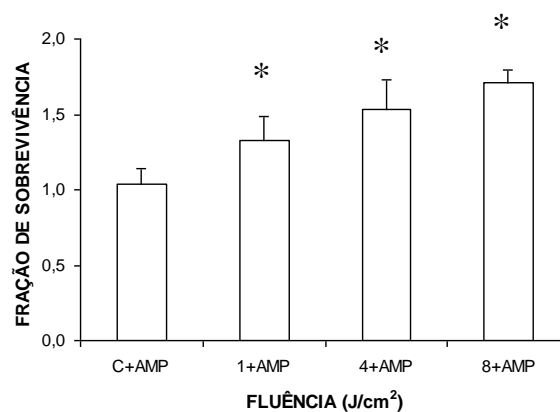
**Figura 1:** Frações de sobrevivência de culturas de *E. coli* AB1157 expostas ao *laser* 658 nm em diferentes fluências. ns: não significativo ( $p > 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle (suspensões bacterianas não expostas ao *laser* vermelho).



Os resultados sugerem que a exposição ao *laser* não altera a sobrevivência destas culturas em todas as fluências utilizadas.

Na figura 2 estão apresentadas as frações de sobrevivência de culturas de *E. coli* AB1157 expostas ao *laser* vermelho (658 nm) e incubadas com ampicilina.

**Figura 2:** Frações de sobrevivência de culturas de *E. coli* AB1157 expostas ao *laser* 658 nm em diferentes fluências e incubadas com ampicilina. (\*)  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (suspensões bacterianas não expostas ao *laser* vermelho, mas incubadas com ampicilina).



Os resultados mostram que a pré-exposição ao *laser* vermelho aumenta a sobrevivência destas culturas à ampicilina.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a exposição ao *laser* vermelho pode induzir mecanismos que aumentam a resistência de culturas de *Escherichia coli* AB1157 à ampicilina. Estes resultados estão de acordo com resultados prévios que demonstraram um maior efeito dos *lasers* de baixa potência em células e tecidos biológicos em situações de estresse ou condições fisiológicas desfavoráveis (SANTOS et al., 2014; PINHEIRO et al., 2015). Também, nossos resultados sugerem que a utilização de *lasers* de baixa potência em feridas infectadas deve ser realizada com cautela, pois a exposição de microrganismos a estas radiações

poderia induzir resistência a antibióticos utilizados em protocolos terapêuticos.

Outros estudos estão em andamento em nosso laboratório para avaliar se este efeito é dependente de mecanismos de reparo de lesões no DNA, bem como em outras espécies bacterianas.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos em nossa pesquisa sugerem que a pré-exposição ao *laser* vermelho de baixa potência, em fluências utilizadas em protocolos terapêuticos, pode aumentar a sobrevivência de culturas de *Escherichia coli* à ampicilina.

## REFERÊNCIAS

1. DA SILVA, J. P.; DA SILVA, M. A.; ALMEIDA, A. P.; LOMBARDI JUNIOR, I.; MATOS, A. P. Laser therapy in the tissue repair process: A literature review. *Photomed Laser Surg.* v.28 p:17–21, 2010.
2. GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* v.16 p:4, 2009.
3. MESTER, E.; SZENDE, B.; GARTNER, P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol Radiother.* v. 9 p:621–626, 1968.
4. NIEM, M. H. Laser-tissue interactions: Fundamentals and applications. Springer-Verlag: New York, 2007.
5. PINHEIRO, C. C., BARBOZA, L. L., PAOLI, F., FONSECA, A. S. Low-level lasers affect cultures in hyperosmotic stress. *Laser Phys.* v.25 p:085602, 2015.
6. SANTOS, J. N., ROOS, C., BARBOZA, L. L., PAOLI, F.,

FONSECA, A. S. Low intensity red laser action on *Escherichia coli* cultures submitted to stress conditions. *Laser Phys.* v.24 p:125603, 2014.

---

### Contato:

Nome: Adenilson de Souza da Fonseca  
E-mail: adnfonseca@yahoo.com.br  
e-mail: adnfonseca@ig.com.br