

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

CAROLINA SUPINO

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS
INTESTINAIS**

São José dos Campos, SP
2020

CAROLINA SUPINO

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS
INTESTINAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como requisito necessário para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva

São José dos Campos, SP
2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Supino, Carolina
Efeitos da fotobiomodulação no crescimento de bactérias
intestinais / Carolina Supino; orientador, Newton Soares da
Silva. - São José dos Campos, SP, 2020.
1 CD-ROM, 62 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica.

Inclui referências

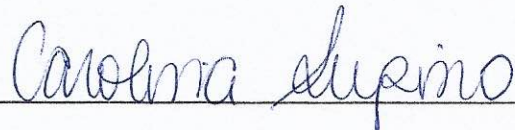
1. Engenharia Biomédica. 2. Fotobiomodulação. 3.
Enterocolite-necrotizante. 4. Microbiota intestinal. I. Silva,
Newton Soares da, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Carolina Supino, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 18 de Fevereiro de 2021.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 02 / 10 / 20

CAROLINA SUPINO

**“EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS
INTESTINAIS”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^a DR.^a JULIANA FERREIRA STRIXINO

PROF. DR. NEWTON SOARES DA SILVA _____

PROF.^a DR.^a JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA - UNESP

Prof.^a Dr.^a Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 02 de outubro de 2020.

DEDICATÓRIA

Ao Senhor que criou o universo e tudo que nele existe e à minha família pelo apoio e incentivo constantes.

AGRADECIMENTO

A Deus, que me capacitou para enfrentar este desafio e colocou ao meu redor pessoas competentes e generosas que compartilharam dessa caminhada.

Ao Professor Newton Soares da Silva, orientador deste trabalho, por ter acreditado em mim, pela paciência diante de tantas dificuldades, pelos valiosos ensinamentos e cuidadosas sugestões durante toda a elaboração deste projeto.

A Antonieta, que abriu todas as portas e as manteve abertas. Uma amiga que Deus me deu durante um período de dificuldade.

A Professora Cristina Pacheco Soares, que com tanta paciência e sabedoria me ajudou e me ensinou diante dos desafios.

Aos colegas do laboratório, que tornaram essa caminhada mais fácil.

A minha família, por me ter feito acreditar que conseguiria terminar a elaboração deste projeto, e terem tornado possível as horas de dedicação a ele.

“E tudo quanto fizerdes, fazei de coração, como se fizésseis ao Senhor, e não aos homens” (Colossenses 3:23)

RESUMO

Introdução: A enterocolite necrotizante é uma doença inflamatória intestinal que ocorre no recém-nascido, mais comumente no prematuro. É a principal causa de morte por doenças gastrointestinais em neonatos, e caracterizada pelo desenvolvimento de necrose intestinal difusa no prematuro submetido a estresse. A alta incidência e a falta de estratégias de tratamentos efetivas sugerem que novas abordagens para o tratamento da doença são necessárias. É neste contexto que surge a possibilidade do uso da fotobiomodulação como modalidade terapêutica. Porém, os estudos sobre a utilização da fotobiomodulação em bactérias intestinais são escassos. **Objetivo:** Estudar o efeito da fotobiomodulação utilizado em parâmetros clínicos no crescimento de bactérias comumente presentes na microbiota do recém nascido. **Metodologia:** Foram escolhidos 4 cepas de bactérias para serem estudadas, sendo duas pertencentes a microbiota intestinal saudável, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus reuteri* e duas bacterias patogênicas, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Essas bactérias foram cultivadas em crescimento planctônico e irradiadas com LED em comprimento de onda 660 nm e uma densidade de potência de 0,025 W/cm², em fluências de 1, 5 e 10 J/cm². A avaliação do crescimento celular foi realizada através de leituras por absorvância nos períodos de 4h, 24h e 48h após irradiação. **Resultados:** O crescimento de *L. acidophilus*, *L. reuteri* e *S. aureus* não sofreu biomodulação em nenhuma das fluências. O crescimento de *E. coli* foi estimulado em 1 J/cm² quando comparado ao grupo Controle, com significância estatística (p<0,005). Nas demais fluências não houve bioestimulação para a bactéria *E.coli*. **Conclusão:** O uso do comprimento de onda de 660 nm nas fluências de 5 J/cm² e 10 J/cm² nas bactérias estudadas não levou a uma alteração na velocidade de crescimento significativo.

Palavras-chave: Fotobiomodulação. Enterocolite-necrotizante. Microbiota intestinal.

EFFECTS OF PHOTOBIO-MODULATION ON THE GROWTH OF INTESTINAL BACTERIA

Introduction: Necrotizing enterocolitis is an inflammatory bowel disease that occurs in the newborn, more commonly in the premature. It is the main cause of death from gastrointestinal diseases in neonates, and is characterized by the development of diffuse intestinal necrosis in premature infants submitted to stress. The high incidence and the lack of effective treatment strategies suggest that new approaches to the treatment of the disease are needed. It is in this context that the possibility of using photobiomodulation as a therapeutic modality arises. However, studies on the use of photobiomodulation in intestinal bacteria are scarce. **Objective:** To study the effect of photobiomodulation used in clinical parameters on the growth of bacteria commonly present in the newborn's microbiota. **Methodology:** Four strains of bacteria were chosen to be studied, two belonging to a healthy intestinal microbiota, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* and two pathogenic bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. These bacteria were grown in planktonic growth and irradiated with LED at a wavelength of 660 nm and a power density of 0.025 W/cm², in fluencies of 1, 5 and 10 J/cm². The evaluation of cell growth was performed through readings by absorbance in the periods of 4h, 24h and 48h after irradiation. **Results:** The growth of *L. acidophilus*, *L. reuteri* and *S. aureus* did not undergo biomodulation in any of the fluencies. The growth of *E. coli* was stimulated at 1 J/cm² when compared to the Control group, with statistical significance ($p < 0.005$). In the other fluencies, there was no biostimulation for the *E. coli* bacteria. **Conclusion:** The use of the 660 nm wavelength in the fluencies of 5 J/cm² and 10 J/cm² in the studied bacteria did not lead to a significant change in the speed of growth.

Keywords: Photobiomodulation. Necrotizing enterocolitis. Intestinal bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. O papel da barreira intestinal na patogênese da Enterocolite Necrotizante	23
Figura 2. A propagação da luz nos tecidos em diferentes comprimentos de onda. .	30
Figura 3. Modelo da placa com distribuição das espécies utilizadas.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlação clínica e biológica na patogênese da Enterocolite Necrotizante	18
Tabela 2. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia x 10 ⁸ (UFC x10 ⁸) de <i>Lactobacillus acidophilus</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ²	42
Tabela 3. Análise estatística de <i>Lactobacillus acidophilus</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ² em 48 horas	44
Tabela 4. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia x 10 ⁸ (UFC) de <i>Lactobacillus reuteri</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ²	45
Tabela 5. Análise estatística de <i>Lactobacillus reuteri</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ² em 48 horas	47
Tabela 6. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia x 10 ⁸ (UFC) de <i>Escherichia coli</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ²	48
Tabela 7. Análise estatística de <i>Escherichia coli</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ² em 48 horas	50
Tabela 8. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia x 10 ⁸ (UFC) de <i>Staphylococcus aureus</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ²	51
Tabela 9. Análise estatística de <i>Staphylococcus aureus</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ² em 48 horas.	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. UFC x 10 ⁸ de <i>Lactobacillus acidophilus</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ²	30
Gráfico 2. UFC x 10 ⁸ de <i>Lactobacillus reuteri</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ²	33
Gráfico 3. UFC x 10 ⁸ de <i>Escherichia coli</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ²	36
Gráfico 4. UFC x 10 ⁸ de <i>Staphylococcus aureus</i> nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm ²	39

LISTA DE ABREVIações

COX-2	Ciclooxigenase 2
ECN	Enterocolite Necrotizante
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
Laser	Amplificação de luz por emissão estimulada de radiação
LED	Diodos emissores de luz
LPS	Lipopolissacarideo
NO	Oxido Nítrico
Rho-A-GTPase	Ras homolog gene family member A
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Enterocolite necrotizante	16
2.1.1 Patofisiologia da Enterocolite Necrotizante	17
2.1.1.1 Respostas imunológicas do trato gastrointestinal	18
2.1.2 Enterocolite e translocação bacteriana	22
2.1.3 Uso de antibióticos na Enterocolite Necrotizante	23
2.2 Bactérias	24
2.2.1 Lactobacillus spp.	24
2.2.2 Escherichia coli	25
2.2.3 Staphylococcus aureus	25
2.3 Fotobiomodulação	26
2.4 A fotobiomodulação e o crescimento bacteriano	31
2.5 Efeitos do laser na microbiota intestinal	36
3 OBJETIVO	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Cepas utilizadas no estudo	39
4.2 Obtenção das amostras	39
4.3 Diluição e irradiação das células bacterianas	39
4.4 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Lactobacillus acidophilus	42
5.2 Lactobacillus reuteri	45
5.3 Escherichia coli	47
5.4 Staphylococcus aureus	51
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A enterocolite necrotizante (ECN) é uma doença que ocorre no recém-nascido, mais comumente no prematuro, com alta taxa de mortalidade e morbidade. É uma doença inflamatória intestinal de prematuros. A ECN está entre as doenças mais comuns e devastadoras em neonatos. Tem sido umas das mais difíceis para erradicar, e, portanto, se tornou uma prioridade para a pesquisa. A taxa de mortalidade da doença varia de 20 a 30%. O intenso processo inflamatório que se inicia no intestino altamente imunorreativo estende os efeitos da doença sistemicamente, afetando outros órgãos, como o cérebro. Apesar do grande número de pesquisas, as estratégias de prevenção não apresentam resultado satisfatório, evidenciando a falta de definições claras no que se constitui o diagnóstico de ECN clássica (OBLADEN, 2009).

A patofisiologia da doença não é completamente compreendida. Observações epidemiológicas sugerem ser uma doença multifatorial. A combinação de predisposição genética, imaturidade intestinal e um desbalanço no tônus microvascular, acompanhado por uma microbiota intestinal anormal e uma mucosa intestinal altamente imunorreativa, leva a uma confluência de fatores que levam a doença. A doença provavelmente está relacionada a imaturidade do trato gastrointestinal do recém-nascido, que facilita a multiplicação de bactérias patogênicas e sua translocação. Acontece por uma colonização mista do intestino da criança, e patógenos frequentemente encontrados são *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O tratamento consiste em antibioticoterapia e jejum. O quadro está associado a um intenso processo inflamatório e vasoconstrição mesentérica, levando a um quadro de isquemia e necrose intestinal com sequelas a curto e longo prazo gravíssimas (HSUEH *et al.*, 2002; SAMUELS *et al.*, 2017).

Os avanços na utilização clínica da fotobiomodulação e seus efeitos anti-inflamatórios, de neovascularização e regeneração celular, transforma essa modalidade terapêutica em uma ótima opção para o tratamento dessa patologia, sendo não invasiva e de fácil aplicação (DESMET *et al.*, 2006). Essa possibilidade de uma nova modalidade terapêutica, sem efeitos colaterais, diminuindo o tempo de antibioticoterapia, necessidade de intervenção cirúrgica, diminuição do uso de antibioticoterapia, nutrição parenteral e menor tempo de internação é algo muito positivo no tratamento dessas crianças. A perspectiva de uma resposta satisfatória da

biomodulação nessa enfermidade poderá revolucionar o tratamento e sobrevivência de prematuros, além da qualidade de vida dessas crianças no futuro.

O fator limitante no momento para a utilização da fotobiomodulação em patologias intestinais é o potencial efeito bioestimulador nas bactérias intestinais, o que tornaria o seu uso inviável. Tanto o aumento de bactérias patogênicas, como um aumento grande de bactérias da microbiota em pacientes imunocomprometidos, não é tolerável. A diminuição de bactérias da microbiota intestinal como ocorre na antibioticoterapia não é desejável, mas não contra-indicaria o tratamento. O número de estudos de fotobiomodulação em patologias intestinais é escasso, mas com um potencial de aplicação clínica promissor.

Visando estudar o efeito da fotobiomodulação no crescimento de algumas bactérias que colonizam o intestino do recém-nascido realizamos este estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enterocolite necrotizante

A enterocolite necrotizante (ECN) é uma doença antiga. Existem registros de uma doença que se encaixa nas características da ECN da década de 1820 na França (OBLADEN, 2009).

Muitos pesquisadores dedicaram toda a carreira para melhor definir esta doença desafiadora e desenvolver estratégias para o tratamento e prevenção desta patologia. No entanto, a ECN permanece uma doença de difícil tratamento e ainda pouco entendida. Permanece incerto quais prematuros estão correndo maior risco e quais as melhores estratégias para prevenção e tratamento. Sequelas a longo prazo são menosprezadas durante o tratamento agudo da doença, mas contribuem substancialmente para a morbidade e mortalidade subsequentes (OBLADEN, 2009).

A ECN é uma doença multifatorial que atinge o trato gastrointestinal do recém-nascido, provocando necrose parcial ou completa da parede intestinal com ou sem perfuração franca. Possui um quadro clínico inespecífico, quadro radiológico patognomônico e alterações histológicas características (necrose de coagulação, inflamação, pneumatose intestinal, áreas reparativas/fibróticas alternadas com áreas de coagulação e/ou inflamação em campos histológicos adjacentes) (SOUZA, 2007; HSUEH *et al.*, 2002; SAMUELS *et al.*, 2017).

Estudos populacionais encontraram uma incidência da ECN de aproximadamente 1:1000 nascidos vivos. Em populações selecionadas, como recém-nascidos pesando menos que 1500g, esta incidência aumenta para 2,3-11%. Tanto a incidência, como a gravidade da doença estão inversamente associados ao peso de nascimento. Ou seja, quanto menor o peso, maior a incidência e a gravidade da doença (LLANOS *et al.*, 2002; GUTHRIE *et al.*, 2003; STOLL *et al.*, 2010). Nos pacientes com ECN, 27% precisarão de intervenção cirúrgica, com uma mortalidade chegando a 50%, e infelizmente esta taxa não mudou significativamente nos últimos 30 anos. As sequelas a longo prazo dos pacientes que necessitam de cirurgia são mais graves, com atraso no desenvolvimento neurológico, atraso no crescimento e problemas gastrointestinais crônicos (BLAKELY *et al.*, 2005; HUNTER *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2017).

Apesar de 90% dos casos se desenvolverem em prematuros, há relatos ocasionais de recém-nascidos a termo com a doença. Mesmo com quadro clínico e patológico semelhantes, os fatores predisponentes são diferentes. Essas crianças geralmente possuem fatores de risco como doença cardíaca congênita ou eventos hipóxico-isquêmicos relatados, que levam a uma diminuição da perfusão mesentérica (LAMBERT *et al.*, 2007).

A morbidade associada a ECN se traduz em um gasto econômico considerável. A ECN pode chegar a aumentar em 1.4 o custo hospitalar em prematuros. O estudo de Bisquera *et al.* (2002) mostra que a média de gasto hospitalar nesses pacientes foi \$73.700 dólares americanos maior em pacientes tratados clinicamente e \$186.200 dólares americanos mais caro nos que precisaram de cirurgia. Ainda precisamos considerar os custos associados as sequelas a longo prazo, que mostrou uma média de \$5000 dólares americanos mensais a mais (BISQUERA *et al.*, 2002; NEU; WALKER, 2011; MOWITZ *et al.*, 2018).

2.1.1 Patofisiologia da Enterocolite Necrotizante

Apesar de décadas de estudo, a patogênese da ECN ainda não está totalmente esclarecida. A etiologia é considerada multifatorial e dependente de eventos hipóxico-isquêmicos sustentados ou intermitentes e episódios de reperfusão-oxigenação, colonização e invasão bacteriana e suas toxinas, e ainda alimentação por fórmula. A contribuição de cada um desses fatores, como eles interagem e por que a ECN não se desenvolve em todos pacientes com os três desses fatores sugerem que a etiologia é extremamente complexa. Parece ser uma resposta inflamatória exagerada a um insulto ainda não bem definido (HSUEH *et al.*, 2002; SAMUELS *et al.*, 2017).

A pneumatose intestinal, que é a presença de ar na parede intestinal, ocorre provavelmente pelo gás produzido pelas bactérias entéricas que se multiplicam. A progressão desse ar para o sistema venoso portal e linfático sugere extensão deste processo pelas veias que drenam o intestino. O pneumoperitônio indica necrose total da parede intestinal com perfuração (HSUEH *et al.*, 2002).

Além desses fatores tradicionais, tem-se estudado muito a função de barreira intestinal, como ela pode ser rompida, o papel das endotoxinas e do ácido nítrico, a ativação de cascata pró-inflamatória e fatores genéticos relacionados. A imaturidade da motilidade, digestão, absorção, defesas imunes, função de barreira e regulação da

circulação predispõem o prematuro a um risco aumentando de injúria intestinal (HACKAM *et al.*, 2005).

Tabela 1. Correlação clínica e biológica na patogênese da Enterocolite Necrotizante

Observação Clínica	Relevância Biológica
Récem-nascido prematuro →	Hospedeiro suscetível
Estresse sistêmico →	Dano da barreira intestinal
Pneumatose →	Translocação bacteriana
Inflamação sistêmica →	Liberação de citocinas

Fonte: Extraído e modificado de Hackam *et al.*, 2005

2.1.1.1 Respostas imunológicas do trato gastrointestinal

Os fatores mecânicos da barreira mucosa intestinal incluem a peristalse intestinal, a produção de muco e as junções entre as células do epitélio intestinal. Os fatores não mecânicos incluem celular e componentes do sistema imunológico e regeneração celular (HACKAM *et al.*, 2005).

- Peristaltismo intestinal e digestão: a motilidade imatura causa maior estase e subsequente hiper crescimento bacteriano. A peristalse ativa limita o tempo de exposição dos antígenos à mucosa intestinal, inibe a adesão de bactérias e promove expulsão dos complexos antígeno-anticorpos. Ainda, a imaturidade intestinal leva a uma digestão e absorção diminuídas, o que pode levar a lesão epitelial direta por uma diminuição no pH (HACKAM *et al.*, 2005; HUNTER *et al.*, 2008; NINO *et al.*, 2016).
- Muco intestinal: as células caliciformes são aquelas que secretam muco/mucina, que é um protetor não específico do intestino. O muco é um gel complexo que cobre a superfície vilosa do epitélio. É secretado no lúmen intestinal pelos vacúolos de armazenamento das células caliciformes que se encontram dispersas entre os enterócitos ao longo do eixo vilosidades/cripta. O muco é composto de água, eletrólitos, mucina, glicoproteínas, glicopeptídeos, imunoglobulinas, albumina e peptídeos trefoil. A função do muco é limitar a adesão de antígenos patogênicos e micróbios no epitélio intestinal (HACKAM *et al.*, 2005; HUNTER *et al.*, 2008).

- Secreções intestinais: Os recém-nascidos possuem uma diminuição de produção de secreções ácidas gástricas e pancreatobiliares, que atuam na redução do número de microorganismos viáveis e de antígenos, além de contribuírem para a digestão de macromoléculas (HACKAM *et al.*, 2005; HUNTER *et al.*, 2008; NINO *et al.*, 2016).
- Epitélio intestinal: as células epiteliais mantêm-se interligadas por firmes junções impermeáveis à difusão de macromoléculas. Constituem uma camada simples, mas dinâmica, servindo como barreira física ao transporte microbiano e de antígenos. A imaturidade nas junções intercelulares provavelmente participa na permeabilidade intestinal aumentada no intestino do recém-nascido (HACKAM *et al.*, 2005; HUNTER *et al.*, 2008; NINO *et al.*, 2016).

O trato gastrointestinal contém a maior quantidade de tecido linfóide do corpo e coordena os mecanismos imunológicos do sistema adaptativo e inato. O tecido linfóide associado ao intestino consiste em diversos tipos celulares que trabalham na apresentação e processamento de antígenos. Em neonatos este mecanismo é menos eficiente, reduzindo a habilidade do sistema imune em responder a organismos patogênicos. As placas de Peyer são menores, em menor quantidade e não possuem centros germinativos. A ativação das placas de Peyer por bactérias ou componentes da parede bacteriana leva à secreção de diversas substâncias antibacterianas, incluindo α -defensinas e lisozimas. A produção destes peptídeos está diminuída em prematuros, e pode predispor ao crescimento bacteriano, permitindo que a ECN se desenvolva. Durante a recuperação por ECN, ocorre hiperplasia de células de Peyer, sugerindo que estas células possuem um papel importante no combate à doença (HUNTER *et al.*, 2008).

Na ECN encontramos alterações relacionadas à perda da integridade da barreira intestinal, mas também a sua habilidade de se regenerar se encontra deficiente. Normalmente, os defeitos da mucosa intestinal são reparados por um processo de restituição intestinal, que envolve a migração de enterócitos de áreas saudáveis adjacentes para as margens de áreas lesadas, com o intuito de cobrir as áreas desnudadas e restabelecer a continuidade epitelial. O reparo ocorre em duas fases. Primeiramente ocorre a restituição epitelial que se caracteriza pela migração de enterócitos viáveis de uma área sem doença para o sítio da lesão. Após ocorre a regeneração formada pela proliferação e diferenciação epitelial, em que novos

enterócitos crescem de células-tronco situadas nas criptas intestinais (HACKAM *et al.*, 2005; NINO *et al.*, 2016).

A adesão e migração celular são processos dinâmicos que requerem componentes integrados e precisamente regulados. Para uma célula migrar, ela deve, inicialmente desprender-se de suas ligações com a matriz extra-celular subjacente. As ligações da célula com a matriz fazem-se por meio da formação de fibras de estresse de actina e são mediadas por adesões focais. A migração celular é regulada pela Rho-A-GTPase (*Ras homolog gene family, member A*), uma proteína de baixo peso molecular. RhoA é necessária para a formação de fibras de estresse nos enterócitos. A migração celular requer uma baixa regulação da RhoA, que facilita a ruptura das fibras de estresse e a perda de adesões focais. Lipopolissacarideo (LPS) é uma endotoxina na parede celular de bactérias Gram-negativas. A endotoxina LPS, assim como outras citocinas pró-inflamatórias, parece ter a capacidade de impedir a migração do enterócito pelo aumento da atividade da Rho-A-GTPase. A endotoxina também aumenta a expressão de interinas nos enterócitos, que servem para aumentar diretamente a integração do enterócito com a matriz subjacente, ocasionando uma inibição da migração desta célula e da restituição epitelial (HACKAM *et al.*, 2005; NINO *et al.*, 2016).

A endotoxina LPS é encontrada em altos níveis na ECN. A LPS lesa a barreira intestinal inibindo o reparo e promovendo a liberação de moléculas sinalizadoras e mediadores pro-inflamatórias, como NO (óxido nítrico), COX-2 (Cicloxygenase 2) e RhoA pelos enterócitos, promovendo a lesão celular. LPS causa aumento na expressão e função das integrinas na superfície celular, resultando em adesões celulares a membrana aumentadas e do fator ativador de plaquetas (PAF) (HACKAM, 2005 *et al.*; NINO *et al.*, 2016).

Existem numerosos fatores humorais que são secretados pelas glândulas exócrinas na superfície da mucosa intestinal. Correspondem aquelas proteínas capazes de realizar funções protetoras na ausência de anticorpos específicos. Protegem a mucosa contra agentes patogênicos e outros ataques antes do sistema imunológico ter tempo de organizar respostas específicas. Há uma hiper-regulação de sua expressão nos estágios iniciais de reparo da mucosa em uma variedade de doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, inclusive na ECN (HUNTER *et al.*, 2008).

A função normal de um enterócito necessita do controle quase absoluto do pH intracelular (pHi), pois sua alteração causa distúrbios na atividade celular. Em prematuros, a hipoperfusão sistêmica causa acidose metabólica e difusão passiva de prótons para o interior do enterócito, causando acidificação citoplasmática. Para contrabalancear a situação, mecanismos reguladores do pH celular começam a agir, transportando prótons para fora da célula. O mecanismo regulador mais conhecido está relacionado ao trocador Na^+/H^+ (NHE), que é expresso no epitélio. A endotoxina costuma impedir esses mecanismos reguladores (HACKAM *et al.*, 2005; NINO *et al.*, 2016).

A cicloxigenase 2 (COX-2) é uma enzima que catalisa o metabolismo do ácido araquidônico em prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano. A forma induzível COX-2 normalmente é indetectável na maioria dos tecidos; entretanto maior expressão dessa isoforma tem sido encontrada em condições inflamatórias do trato gastrointestinal, como a ECN. A expressão COX-2 é aumentada pelas citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A prostaglandina E1 é um vasodilatador potente do leito esplâncnico e estimula a proliferação das células da criptas dos enterócitos. Em contraste, o tromboxano, outro bioproduto da cicloxigenase, é um potente vasoconstritor e medeia muitas respostas prejudiciais associadas a inflamação (HACKAM *et al.*, 2005; NINO *et al.*, 2016).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre de vida curta que reage a uma grande variedade de substâncias biologicamente ativas. A indução da expressão iNOS (forma induzível do NO) por mediadores inflamatórios sugere que o NO participe da patogênese da ECN. Enquanto níveis mínimos de NO têm papel homeostático no trato gastrointestinal, a liberação continuada de NO, como resultado da hiper-regulação de iNOS pode causar dano celular e falha na barreira mucosa. O NO pode lesar a barreira mucosa diretamente, levando a apoptose dos enterócitos e proliferação deficiente (HACKAM *et al.*, 2005; SOUZA, 2007; UPPERMAN *et al.*, 2005; NINO *et al.*, 2016)

A circulação vascular intestinal do neonato é caracterizada por uma baixa resistência de repouso. Isso resulta em um fluxo sanguíneo e de oxigênio alto. Possui um balanço dinâmico entre constrição (ET-1) e dilatação (NO) estimulando a resistência vascular basal. A interrupção neste balanço favorece a vasoconstrição,

levando a isquemia intestinal e lesão tecidual (HOLCOMB; MURPHY; OSTLIE, 2014; HSUEH *et al.*, 2002).

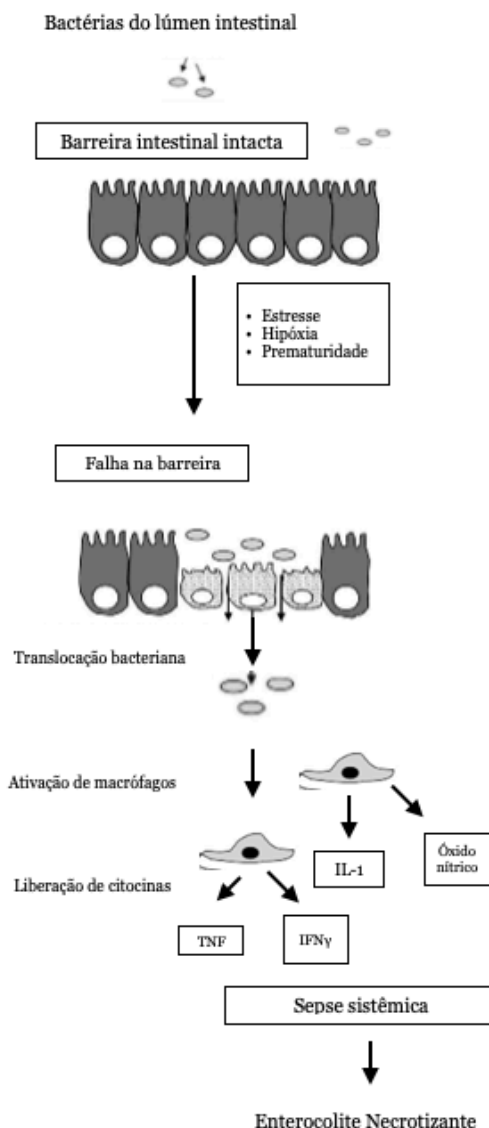
2.1.2 Enterocolite e translocação bacteriana

O ecossistema intestinal é composto pela interação de três componentes: células do hospedeiro, nutrientes e microbiota. A redução do número de bactérias comensais no contexto da infecção ou após o tratamento com antibióticos pode interferir na resposta imunológica gastrointestinal e selecionar esta microbiota. A microbiota do bebê alimentado por fórmula láctea é rica em enterobactérias e organismos Gram-negativos devido ao meio mais alcalino e a ausência dos fatores prebióticos e probióticos do leite materno. No recém-nascido, as bactérias endógenas colonizam a superfície da mucosa intestinal. Nas primeiras semanas predominam as bactérias Gram-positivas e anaeróbios não formadores de esporos (bifidobactérias e lactobacilos). Após esse período até o consumo de alimentos sólidos as bactérias Gram-negativas aumentam progressivamente até que a microbiota fique semelhante a do adulto. Devido à escassez de anaeróbios nas primeiras semanas, bactérias patogênicas podem colonizar o intestino neonatal e contribuir para a patogênese da ECN (HACKAM *et al.*, 2005).

ECN é mais comumente diagnosticada na segunda semana de vida, após a colonização bacteriana ter sido estabelecida. As bactérias provavelmente possuem um papel na patogênese da ECN, apesar de estudos não terem identificado um único agente. A ECN provavelmente surge por um balanço desfavorável entre bactérias comensais e patogênicas. O sistema imune imaturo de recém nascidos pode não ser capaz de responder apropriadamente a colonização normal do intestino, quanto mais microbiotas anormais (HUNTER *et al.*, 2008).

O estresse sistêmico leva a perda do equilíbrio na barreira intestinal de recém-nascido, o que leva a translocação de bactérias e endotoxinas para a corrente sanguínea, e o início da sinalização da resposta inflamatória no enterócito (HACKAM *et al.*, 2005; HACKAM; CAPLAN, 2018).

Figura 1. O papel da barreira intestinal na patogênese da Enterocolite Necrotizante



Fonte: Extraído e modificado de Hackam *et al.* (2005).

2.1.3 Uso de antibióticos na Enterocolite Necrotizante

O uso de antibióticos de amplo espectro no tratamento de prematuros pode selecionar bactérias multi-resistentes, esgotando as opções terapêuticas desses pacientes e aumentando o risco de infecções hospitalares graves. Neonatos, particularmente os prematuros, possuem um maior risco a infecções bacterianas. Tratamentos empíricos com antimicrobianos ocorrem frequentemente nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal. Usos repetidos e prolongados de antibióticos resultaram no aumento de infecções hospitalares a organismos resistentes, como *S.*

aureus metilina-resistente, *Enterococcus* vancomicina-resistente, e Gram-negativos multi-resistentes. Ao passo que bactérias se tornam mais resistentes aos antimicrobianos existentes, medidas para controlar e prevenir o problema são essenciais (BIZARRO *et al.*, 2007; VERGNANO *et al.*, 2005).

Uma das medidas de tratamento atual da ECN envolve o uso de antibióticos de amplo espectro (HACKAM *et al.*, 2005). ALEXANDER *et al.* (2011) encontraram uma relação entre a duração no uso de antibióticos em prematuros e o aumento da incidência de ECN (ALEXANDER *et al.*, 2011).

2.2 Bactérias

2.2.1 *Lactobacillus* spp.

São bacilos gram positivos anaeróbios facultativos ou estritamente anaeróbios, o principal produto metabólico é o ácido lático. São encontradas como parte da microbiota normal da cavidade oral, do estômago, do intestino e do trato genitourinário. Pode causar infecção em pacientes imunocomprometidos (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

Lactobacillus acidophilus é um bastonete Gram-positivo, não formador de esporo, homofermentativo de catalase negativa, que é um habitante comum do trato intestinal humano. Esta espécie tem a particularidade de ser pouco tolerante à salinidade do meio, e ser microaerófilo, com o crescimento em meio sólido favorecido por anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio. Através da produção de ácido lático, cria um ambiente desfavorável, para o crescimento de fungos e outras bactérias, potencialmente patogênicas, e favorece uma microbiota de característica ácida (VILELA, 2013).

Lactobacillus reuteri é uma espécie heterofermentativa que reside no trato gastrointestinal, vaginal e oral do ser humano e outros animais de sangue quente. A ação probiótica de *L. reuteri* é atribuída a sua capacidade de exercer um efeito inibitório sobre micro-organismos patogênicos com uma combinação de diversos mecanismos, incluindo a produção de ácido lático, peróxido de hidrogênio e produção de bacteriocinas. Um composto primário produzido por *L. reuteri*, reuterina, é produzido durante a fermentação do glicerol. Reuterina, β -hydroxypropionaldeído, é produzida em condições de anaerobiose e apresenta efeitos de amplo espectro contra

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos, leveduras e protozoários. A reuterina é um composto neutro, de baixo peso molecular, é solúvel em água, ativa em uma larga faixa de pH e resistente a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas (SILVA *et al.*, 2010).

2.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, pertence à família das *Enterobacteriaceae*, possui motilidade por meio de flagelos ou é imóvel, apresenta cerca de 2 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro. Essas bactérias utilizam D-glicose e outros carboidratos para obter energia e formam ácido e gás como produtos metabólicos. A espécie, presente na microbiota intestinal de animais de sangue quente, está inserida no grupo dos coliformes fecais. Sua habilidade na produção de doenças está associada à diversidade antigênica relacionada a elementos estruturais (Lipopolissacarídeo – LPS, cápsula), à adesão (adesinas) e à invasão (exotoxinas). A espécie está associada a infecções no trato urinário, sepse, meningites neonatais e gastroenterites e pode ser subdividida em cinco grupos patogênicos principais: *E. coli* enteropatogênica *E. coli* enterotoxigênica, *E. coli* entero-hemorrágica, *E. coli* enteroinvasiva e *E. coli* enteroagregativa (ARAUJO *et al.*, 2016; CROXEN *et al.*, 2013).

2.2.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus apresenta-se como um coco Gram-positivo, que pertence à família *Micrococaceae*, imóvel, medindo de 0,5 a 1,0 µm e agrupando-se em massas irregulares que lembram cachos de uvas. São anaeróbios facultativos, mesófilos, com temperatura ótima de crescimento em torno de 30° a 37°C. Algumas fontes de infecções podem ser endógenas, providas do próprio indivíduo, como em casos de infecções em pacientes imunocomprometidos, ou de fontes exógenas, sendo esta segunda caracterizada por fatores associados ao meio, tais como agressões, contato físico direto, objetos contaminados, fluidos contaminados e vias aéreas (ARAUJO *et al.*, 2016).

Algumas cepas de *S. aureus* produzem uma série de fatores de virulência que contribuem para a sua patogenicidade, garantindo assim êxito em sua instalação e

manutenção nos tecidos do hospedeiro. Isso ocorre devido a sua capacidade de adesão celular, na captação de nutrientes e evasão na resposta imunológica, produzindo uma série de enzimas e toxinas extracelulares (JØRGENSEN *et al.*, 2005).

Dentre as enzimas produzidas, a coagulase é a mais conhecida por transformar a protrombina em trombina que, por sua vez, ativa a formação da fibrina, a partir do fibrinogênio, coagulando o plasma, com conseqüente acúmulo de fibrina ao redor da célula bacteriana, isolando a área infectada e dificultando a ação dos mecanismos de defesa. Fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, são referentes a toxina da síndrome do choque tóxico, a proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares. Bem como, fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão nas superfícies de cateteres e próteses, são relacionados com proteínas toxinas (hemolisinas – α , β , γ e δ) (HEIRMAN *et al.*, 2005).

2.3 Fotobiomodulação

A fotobiomodulação é um processo que causa alterações biológicas nos organismos devido a interação de fótons com átomos ou moléculas. Lasers (Light amplification by stimulated emission of radiativo - amplificação de luz por emissão estimulada de radiação) são dispositivos que tipicamente geram radiação eletromagnética coerente, monocromática e colimada, originalmente descrita por Theodore Maiman em 1960 na forma de um laser de rubi. O laser é descrito como uma fonte de energia luminosa ou de radiação. A fotobiomodulação é um tipo especial de luz que interage com os sistemas biológicos por meios não térmicos. Essa área de investigação começou com o trabalho de Mester *et al.* em 1967. Eles relataram efeitos não térmicos dos lasers no crescimento de pêlos de camundongos (FARIVAR *et al.*, 2014).

De acordo com Willam Posten *et al.* (2005) as propriedades das fontes de luz para fotobiomodulação são:

- a) Potência de saída dos lasers sendo 0,001- 0,1 Watts.
- b) Comprimento de onda na faixa de 300-10.600 nm.
- c) Taxa de pulso de 0, contínua a 5000 Hertz (ciclos por segundo).
- d) Irradiância de 0,01-10 W/cm² e fluência de 0,01 a 100 J/cm² (POSTEN *et al.*, 2005).

Diodos emissores de luz (LEDs) são fontes de luz baseadas no fenômeno de eletroluminescência de materiais semicondutores, na maioria das vezes InGaN (60%) e AlInGaP (38%). Os primeiros relatos históricos de LEDs foram escritos por Henry Round e Oleg Losev em 1907 e 1927, respectivamente. Esses cientistas mostraram que os cristais de um material semicondutor, o carboneto de silício (SiC), brilhavam quando uma corrente elétrica passava por eles. Nick Holonyak, Jr. inventou o primeiro LED visível em 1962 enquanto trabalhava como cientista consultor em um laboratório da General Electric Company em Syracuse, Nova York, e foi chamado de "o pai dos emissores de luz diodo". Algumas décadas depois, as propriedades de eletroluminescência de outros semicondutores foram estudadas especialmente nos Estados Unidos, o que levou à invenção de LEDs laranja, amarelos e verdes nas décadas de 1960 e 1970. Desde então, a tecnologia LED passou por muitas melhorias e os LEDs representam uma parcela crescente das vendas de iluminação interna e externa. Atualmente, um dos desafios mais importantes da indústria é melhorar a eficácia luminosa dos LEDs. Deve-se notar que o princípio básico de operação é o mesmo em LEDs e lasers de diodo e é denominado diodo semicondutor PIN. Um potencial elétrico aplicado ao semicondutor causa a separação de elétrons na seção N (negativa) e orifícios na seção P (positiva). Quando os elétrons e os orifícios se recombinam na seção I (intrínseca), é produzida luz cujo comprimento de onda depende da energia dos elétrons. Para produzir um diodo laser, um guia de ondas é aplicado à parte externa do diodo PIN, que age da mesma maneira que os espelhos na cavidade tradicional do laser (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

Diferentemente das lâmpadas incandescentes e halógenas, que são baseadas no aquecimento resistivo elétrico e na radiação térmica subsequente, incluindo comprimentos de onda visíveis e radiação infravermelha, a emissão de luz do LED é baseada na emissão não térmica de luz. Uma diferença importante entre a luz laser e a luz LED, além da coerência, é a largura da banda. Lasers podem ter uma largura de banda muito estreita; por exemplo, nos lasers a gás, pode ser uma fração de nanômetro, enquanto nos lasers de diodo a largura de banda é tipicamente de 1 a 2 nm (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

A fotobiomodulação por diodos emissores de luz é um fenômeno relativamente novo. Com exceção de alguns artigos publicados no final do século XX, a fotobiomodulação com o LED começou a aparecer regularmente na literatura apenas desde 2001. Nesses primeiros anos, algumas das pesquisas básicas com LEDs foram

conduzidas pelo grupo de Harry Whelan localizado em Wisconsin-Milwaukee. Como o desenvolvimento desses LEDs foi financiado pela Administração Nacional Aeronáutica e Espacial dos EUA (NASA) como fonte de luz para experimentos de crescimento de plantas no espaço, eles eram frequentemente chamados de LEDs da NASA. Atualmente, o uso de LEDs em fotobiomodulação e outras aplicações na área da saúde tem sido bastante estabelecido e sua eficácia foi demonstrada em muitos relatórios (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

Os LEDs em média são muito mais baratos que os dispositivos a laser. Como regra geral, o custo por mW de energia óptica é aproximadamente cem vezes menor para os LEDs em comparação com os lasers. No passado, as fontes de luz laser eram comercializadas predominantemente para os médicos, que podiam cobrir os altos custos de seus dispositivos tratando um grande número de pacientes. No entanto, nos últimos anos, os próprios pacientes ou mesmo indivíduos saudáveis conseguiram comprar seus próprios dispositivos de LED para uso pessoal em casa. Atualmente, vários dispositivos domésticos policromáticos com banda estreita baseados em LED estão amplamente disponíveis e os preços parecem estar caindo constantemente devido ao aumento da demanda e da concorrência entre as empresas. Um dos fatores mais importantes que dificultam a aceitação da fotobiomodulação na área da saúde é a relação custo-benefício. Além dos altos preços dos dispositivos, surgem custos adicionais quando a sessão terapêutica é realizada por profissionais da saúde, como fisioterapeutas, quiropráticos, enfermeiros ou médicos. Somente em alguns casos isso é econômico quando os lasers são usados. Nesse sentido, a adoção de luzes LED nas práticas de tratamento com fotobiomodulação poderia apoiar a aceitação mais ampla deste tratamento pela comunidade médica (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

O mecanismo pela qual a luz no comprimento de onda do vermelho ao infravermelho produz seus efeitos biológicos ainda precisa ser elucidado. A primeira lei da fotobiologia afirma que, para que a luz visível de baixa potência tenha qualquer efeito em um sistema biológico vivo, os fótons devem ser absorvidos por bandas de absorção eletrônica pertencentes a alguns fotoacceptores moleculares, ou cromóforos. Um cromóforo é uma molécula (ou parte de uma molécula) que confere alguma cor definitiva ao composto do qual é um ingrediente. Os cromóforos quase sempre ocorrem em uma de duas formas: sistemas de elétrons pi conjugados e complexos metálicos. Exemplos de tais cromóforos podem ser vistos na clorofila

(usada pelas plantas para fotossíntese), hemoglobina, citocromo c oxidase, mioglobina, flavinas, flavoproteínas e porfirinas. Há um crescente corpo de evidências que sugere que um efeito primário da fotobiomodulação nos comprimentos de onda vermelho ao infravermelho é a estimulação de citocromos mitocondriais, que por sua vez iniciam vias secundárias de sinalização celular. O resultado geral da fotobiomodulação é o aumento do metabolismo energético e viabilidade celular melhorada. Nos tecidos de mamíferos, existem três principais moléculas fotoreceptoras: hemoglobina, mioglobina e citocromo c oxidase. Dessas três, a citocromo c oxidase é a única envolvida no metabolismo e produção de energia, pois compreende o complexo IV da cadeia de transporte de elétrons localizada nas mitocôndrias. Assim, o citocromo c oxidase foi postulado como molécula fotoceptora pelos efeitos biológicos da fotobiomodulação (DESMET *et al.*, 2006; HAMBLIN, 2017; HUANG *et al.*, 2009).

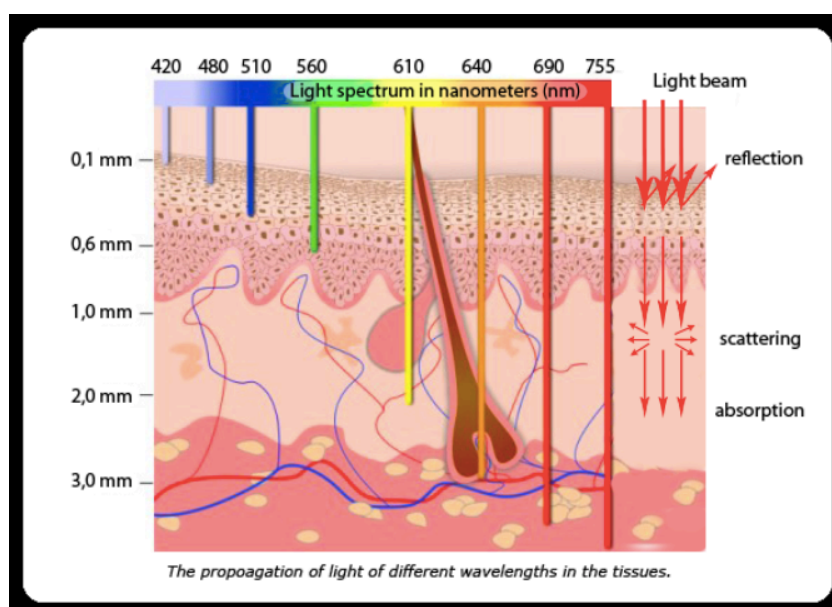
As evidências para apoiar o citocromo c oxidase como o fotoceptor primário têm crescido constantemente. Estudos de proliferação celular comparando o espectro de ação após irradiação com laser em comparação com os espectros de absorção de possíveis moléculas fotoceptoras sugeriram o citocromo c oxidase como o fotoceptor primário. Além disso, foi demonstrado que até 50% da luz infravermelha é absorvida pelos cromóforos mitocôndricos, incluindo o citocromo c oxidase (DESMET *et al.*, 2006; HAMBLIN, 2017).

Resultados experimentais demonstram que o tratamento com luz infravermelha por LED estimula o metabolismo oxidativo mitocondrial *in vitro* e acelera o reparo de células e tecidos *in vivo*. Esta luz representa uma nova intervenção terapêutica não invasiva para o tratamento de inúmeras doenças ligadas à disfunção mitocondrial, incluindo degeneração macular relacionada à idade, neuropatia óptica hereditária de Leber e doença de Parkinson e Alzheimer (DESMET *et al.*, 2006; HAMBLIN, 2017).

Os comprimentos de onda ideais e as densidades de energia necessárias para intervenções terapêuticas já foram caracterizados. Uma consideração importante deve envolver as propriedades ópticas do tecido. Existe uma chamada "janela óptica" no tecido, onde o efeito da penetração da luz no tecido é maximizada. Esta janela óptica corre aproximadamente de 650 nm a 1200 nm. A absorção e o espalhamento da luz no tecido são muito maiores na região azul do espectro do que no vermelho, porque os principais cromóforos do tecido (hemoglobina e melanina) têm bandas de alta absorção em comprimentos de onda mais curtos. A principal razão para usar as

fontes que irradiam na região espectral do infravermelho e vermelho é o fato de que a hemoglobina não é absorvida nesta região e a luz pode penetrar profundamente no tecido vivo. O espalhamento da luz no tecido é maior em comprimentos de onda mais curtos e, além disso, a água absorve fortemente a luz infravermelha em comprimentos de onda superiores a 1100 nm. Portanto, o uso de LLLT em animais e pacientes envolve quase exclusivamente luz vermelha e infravermelha (600-1100 nm). Comprimentos de onda na faixa do vermelho infravermelho (630–1000 nm), juntamente com uma densidade de energia mínima de 4 J/cm², provaram ser eficazes em estimular processos biológicos. Comprimentos de onda combinados não podem ser facilmente reproduzidos com lasers, e a largura do feixe dificulta o tratamento de grandes áreas. As ponteiros de LED podem ser construídos em vários tamanhos para acomodar grandes áreas e não emitem muito calor, o que elimina o perigo de danos adicionais aos tecidos. A luz emitida pelos arranjos de LEDs nos comprimentos de onda ideais penetra na pele e nos tecidos a uma profundidade de aproximadamente 2,3 cm. Além disso, a terapia com luz no comprimento de onda vermelho ao infravermelho foi considerada um risco não significativo pelo FDA e foi aprovada para uso em seres humanos (DESMET *et al.*, 2006; HAMBLIN, 2017, HUANG *et al.*, 2009).

Figura 2. A propagação da luz nos tecidos em diferentes comprimentos de onda.



Fonte: Lauters, 2012.

A fotobiomodulação pela luz na região do vermelho ao infravermelho (NIR) do espectro (630-1000 nm) modula numerosas funções celulares. As aplicações clínicas e experimentais da fotobiomodulação se expandiram nos últimos 30 anos. Lasers e LEDs são ferramentas terapêuticas bem aceitas no tratamento de feridas infectadas, isquêmicas e hipóxicas, juntamente com outras lesões de tecidos moles. Os efeitos positivos da fotobiomodulação incluem aceleração da cicatrização, melhor recuperação de lesões isquêmicas no coração e degeneração atenuada do nervo óptico lesado. (DESMET *et al.*, 2006) No nível celular, a fotobiomodulação pode modular a proliferação de fibroblastos, a fixação e a síntese de colágeno e procolágeno, promover a angiogênese e estimular macrófagos e linfócitos, melhorando o metabolismo energético nas mitocôndrias. Além disso, a fotobiomodulação demonstrou a capacidade de aumentar a produção de fatores de crescimento, como fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento transformador (TGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (DESMET *et al.*, 2006; HAMBLIN, 2017).

KIM *et al.* (2019) estudou a enteropatia induzida por radiação, que continua sendo uma complicação importante após exposição acidental ou terapêutica à radiação ionizante. Mostraram em seu trabalho que a fotobiomodulação pode acelerar a cicatrização de feridas, especialmente estimulando a angiogênese, e as células-tronco são particularmente suscetíveis à fotobiomodulação *in vitro*, usando células mesenquimais derivadas do cordão umbilical humano. Sugerem que a fotobiomodulação aumenta o potencial angiogênico das células mesenquimais, levando a uma eficácia terapêutica aprimorada para o tratamento da enteropatia induzida por radiação (KIM *et al.*, 2019; ALEXANDRATOU *et al.*, 2002; VLADIMIROV, 2004; HENRIQUES *et al.*, 2010; LINS *et al.*, 2010; MOORE *et al.*, 2005).

2.4 A fotobiomodulação e o crescimento bacteriano

Em estudos *in vitro* sobre a influência da fotobiomodulação no crescimento bacteriano os resultados são diversos. Dependendo da dose e parâmetros utilizados, o crescimento bacteriano pode ser estimulado ou inibido, variando com a espécie de bactéria. A influência da fotobiomodulação sobre a modulação fenotípica de diferentes populações bacterianas tem sido pobremente discutida na literatura, em geral utilizando modelos *in vitro* e experimentações clínicas em odontologia e dermatologia.

Nussbaum et al examinou os efeitos da fotobiomodulação no crescimento bacteriano *in vitro*. *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* foram semeados em ágar e então irradiados com comprimentos de onda de 630, 660, 810 e 905 nm ($0,015 \text{ W/cm}^2$) e exposições radiantes de $1\text{--}50 \text{ J/cm}^2$. Além disso, *E. coli* foi irradiada com 810 nm a uma irradiância de $0,03 \text{ W/cm}^2$ ($1\text{--}50 \text{ J/cm}^2$). As células foram contadas após 20 h de incubação após a irradiação. Houve interação entre comprimento de onda e espécie ($p = 0,0001$) e entre comprimento de onda e exposição radiante ($p = 0,007$) nos efeitos gerais sobre o crescimento bacteriano. Em todos os tipos de bactérias, houve efeitos gerais de crescimento usando lasers de 810 e 630 nm, com diferenças de espécies em 630 nm. Os efeitos ocorreram em baixas exposições de radiação ($1\text{--}20 \text{ J/cm}^2$). Os efeitos gerais foram marginais usando 660 nm e negativos a 905 nm. A inibição de *P. aeruginosa* seguida de irradiação usando 810 nm a 5 J/cm^2 (223%; $p = 0,02$). A irradiação usando 630 nm a 1 J/cm^2 inibiu *P. aeruginosa* e *E. coli* (227%). A irradiação com 810 nm ($0,015 \text{ W/cm}^2$) aumentou o crescimento de *E. coli*, mas com o aumento da irradiância ($0,03 \text{ W/cm}^2$) o crescimento foi significativo ($p = 0,04$), chegando a 30% a 20 J/cm^2 ($p = 0,01$). O crescimento de *S. aureus* aumentou 27% após irradiação de 905 nm a 50 J/cm^2 (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

NUSSBAUM *et al.* (2003) ainda investigaram o efeito da fotobiomodulação no crescimento bacteriano de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* irradiadas usando um comprimento de onda de 810 nm a densidades de potência de $0,015 \text{ W/cm}^2$ ($0\text{--}50 \text{ J/cm}^2$) e $0,03 \text{ W/cm}^2$ ($0\text{--}80 \text{ J/cm}^2$). As bactérias foram contadas após 20 h de incubação. Os efeitos da fotobiomodulação variaram significativamente com as espécies. O crescimento de *P. aeruginosa* diminuiu em geral, dependendo de uma interação de irradiância e exposição radiante; a maior inibição foi produzida usando alta irradiância, fornecendo exposições radiantes na faixa de 1 a 20 J/cm^2 ($p = 0,001$ a $0,04$). Por outro lado, o crescimento de *E. coli* aumentou significativamente ($p = 0,01$), independentemente da irradiância; os maiores efeitos foram produzidos usando baixas fluências ($1\text{--}20 \text{ J/cm}^2$). Houve um efeito principal da irradiância ($p = 0,03$) no crescimento de *S. aureus*; no entanto, o crescimento não foi diferente em comparação com os controles. Análises adicionais mostraram que houve diferenças no crescimento de *P. aeruginosa* ao comparar amostras que foram comparadas com os tempos de exposição (66, 329, 658, 1316, 1974 e 2632 segundos) em vez da exposição radiante; sugerindo que a irradiância, em vez do tempo de exposição, foi o fator significativo na inibição de *P. aeruginosa* (NUSSBAUM *et al.*, 2003).

Meral em 2003 investigou o efeito bactericida do laser nos microrganismos *Bacterioides fragilis*, *Neisseria spp.*, *Streptococcus salivarius*, *S. aureus* e *Candida albicans*. As amostras foram expostas a irradiação do laser Nd:YAG em comprimento de onda de 600 nm a uma fluência de 5 a 160 J/cm². O efeito bactericida diminuiu nas suspensões, cuja população de microrganismos e a concentração de hemoglobina no caldo foi elevada. Fatores como população e espécie de bactéria na suspensão irradiada afetam o nível mínimo de energia bactericida. Houve redução no número de unidades formadoras de colônia nas cinco espécies submetidas *in vitro* à irradiação com laser Nd-YAG, sugerindo que seu efeito bactericida reduziria o risco de infecção em feridas pós-operatórias (MERAL *et al.*, 2003).

SOUSA, *et al.* (2012) analisou a morfologia bacteriana por microscopia de força atômica após a aplicação da fotobiomodulação na cultura *in vitro* de *S. aureus* ATCC 29213. Após serem cultivados e semeados, as culturas foram irradiadas usando comprimentos de onda de 660, 830 e 904 nm nas fluências de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 16 J/cm². As células viáveis da cepa de *S. aureus* foram contadas após 24 h de incubação. A fotobiomodulação reduziu o crescimento de *S. aureus* com comprimentos de onda 830 e 904 nm, particularmente com 904 nm na fluência de 3 J/cm², onde ocorreram as maiores alterações topográficas da estrutura celular. Os resultados mostraram que a inibição do crescimento dependia do espectro e da fluência da irradiação. Considerando os comprimentos de onda utilizados, ficou aparente que o espectro infravermelho foi mais eficaz quando comparado ao vermelho, principalmente para 904 nm, visto que 660 nm não promoveu inibição global, 830 nm inibiu 36,32% e 904 nm inibiu 71,75% (SOUSA *et al.*, 2012).

Em outro estudo, SOUSA *et al.* (2016) analisou o efeito da LLLT no crescimento bacteriano *in vitro*. Espécies bacterianas, incluindo *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, foram suspensas em solução salina a uma concentração de 10³ células / ml e expostas a irradiação a laser nos comprimentos de onda de 660, 830 e 904 nm nas fluências de 0 (controle), 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm². A irradiação com laser inibiu o crescimento de *S. aureus* em todos os comprimentos de onda e fluências superiores a 12 J/cm², mostrando uma forte correlação entre aumento da fluência e inibição bacteriana. No entanto, para *P. aeruginosa*, a LLLT inibiu crescimento em todos os comprimentos de onda apenas na fluência de 24 J/cm². *E. coli* teve inibição de crescimento semelhante no comprimento de onda de 830 nm nas fluências de 3, 6,

12 e 24 J/cm². Nos comprimentos de onda de 660 e 904 nm, a inibição do crescimento foi observada apenas nas fluências de 12 e 18 J/cm², respectivamente. O LLLT inibiu o crescimento bacteriano em todos os comprimentos de onda, por um período máximo de 72 h após a irradiação, indicando uma correlação entre espécies bacterianas, fluência e comprimento de onda (SOUSA *et al.*, 2016).

Coutinho *et al.* (2007) estudou o efeito do laser em parâmetros de 15W/904 nm por 200 segundos e 20W/904 nm por 230 segundos em culturas bacterianas de *Acinetobacter baumannii complex*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp*, *Serratia sp* e *S. aureus*. Foram colhidos swabs diretamente do sítio de infecção de pacientes internados com osteomielite pós-traumática crônica. As bactérias isoladas foram *Acinetobacter baumannii complex*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp*, *Serratia sp* e *S. aureus*. O material coletado foi semeado em meio ágar-sangue, através de alça estéril, utilizando-se 30 placas de Petri para cada germe. Foram utilizados dois aparelhos: *Ibramed Laser Pulse #01189*, com 15W/904 nm por 200 segundos, e *Physiolux dual Bio- set #9909001*, com 20W/904 nm por 230 segundos. Nos grupos I (n = 10) e II (n = 10), as bactérias sofreram irradiação pelo laser. O grupo III (n = 10) serviu de controle, não sendo irradiado. As bactérias dos grupos I e II foram irradiadas em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada por raio ultravioleta. O laser foi administrado de forma direta, central e perpendicularmente à superfície de cultivo das bactérias, com distância-padrão de 1cm, através de orifício confeccionado na tampa das placas. O crescimento bacteriano foi analisado após 12 e 24 horas da irradiação. Observou-se comportamento similar entre as populações bacterianas nos três grupos experimentais após 12 e 24 horas da irradiação com os dois tipos aparelho, não havendo diferença estatisticamente significativa no crescimento bacteriano entre os grupos I e II e entre estes e o grupo III (controle) (COUTINHO *et al.*, 2007).

Pereira *et al* (2014) comparou os efeitos da fotobiomodulação no crescimento bacteriano *in vitro* e em feridas infectadas *in vivo*, e analisou a efetividade da tecnologia Laser AsGa, em feridas infectadas *in vivo*. *In vitro*: cepas de *S. aureus* foram incubadas em placas de ágar-sangue e irradiadas com laser de 904 nm de comprimento de onda e fluência de 3 J/cm², diariamente durante sete dias. *In vivo*: 32 ratos machos Wistar foram distribuídos em Grupo Controle (Não Infectado) e Grupo Experimental (Infectados). Metade dos ratos tiveram suas feridas irradiadas e a outra

metade não irradiada, como realizado no estudo *in vitro*. *In vitro* não houve variação estatística significativa entre os grupos experimentais, considerando as placas matrizes e derivadas ($p > 0,05$). *In vivo* houve aumento significativo na deposição de colágeno tipo I e III na cicatriz do grupo dos animais infectados e irradiados, quando avaliados no quarto dia de experimento ($p = 0,034$). A fotobiomodulação aplicada com comprimento de onda de 904 nm e dose de 3J/cm², *in vitro*: não alterou o crescimento de *S. aureus* nos grupos experimentais. *In vivo*: mostrou aumento significativo na deposição de colágeno tipo I e III na cicatriz no grupo dos animais infectados e irradiados no quarto dia de experimento (PEREIRA *et al.*, 2014).

Ranjbar (2016) avaliou os efeitos da terapia de fotobiomodulação a 685 nm na cicatrização de feridas diabéticas em ratos com infecção bacteriana induzida por *S. aureus*. Trinta ratos diabéticos foram alocados em dois grupos: controle e irradiados. Realizou-se uma incisão linear de 4 cm de espessura total na linha média dorsal e foi contaminada com *S. aureus*. As feridas foram irradiadas diariamente por 5 dias consecutivos, iniciando 3 dias após a indução e sempre pela manhã. O resultado revelou que a fotobiomodulação resultou em uma diminuição significativa na UFC de *S. aureus* no grupo irradiado em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$). O comprimento das feridas, na 2^a e 3^a semanas, no grupo irradiado foi significativamente menor em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$). A fotobiomodulação causou um aumento significativo nos parâmetros histológicos em comparação com o grupo controle ($P < 0,05$). Além disso, a fotobiomodulação aumentou significativamente a força de ruptura das cicatrizes cirúrgicas produzidas na pele do grupo irradiado quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$) (RANJBAR; TAKHTFOOLADI, 2016).

Barboza *et al.* (2015) estudou a sobrevivência, indução de filamentos e morfologia das células de *E. coli* deficientes no reparo de lesões oxidativas de DNA quando expostas a fotobiomodulação, vermelhos e infravermelhos, em fluências anormalmente altas. Culturas de *E. coli* do tipo selvagem (AB1157), com deficiência de endonuclease III (JW1625-1) e com deficiência de endonuclease IV (JW2146-1), nas fases de crescimento exponencial e estacionária, foram expostas a lasers vermelhos e infravermelhos (0, 250, 500 e 1000 J/cm²) para avaliar suas taxas de sobrevivência, indução do fenótipo de filamentação e morfologia celular. Os resultados mostraram que lasers vermelhos e infravermelhos de baixa intensidade com altas fluências são letais, induzem um fenótipo de filamento e alteram a morfologia das células de *E. coli*. Lasers vermelhos e infravermelhos de baixa

intensidade têm potencial para induzir efeitos adversos nas células, sejam usadas em fluências muito altas ou em altas doses. Portanto, é necessário reforçar a importância da dosimetria precisa nos protocolos terapêuticos (BARBOZA *et al.*, 2015).

Nemeth *et al.* em 2020 estudou como a fotobiomodulação das glândulas salivares maiores com luz policromática ou luz LED afeta os fatores de risco de cárie em pacientes com alto risco de cárie. Trinta e seis pacientes foram designados para um dos três grupos experimentais a seguir: o primeiro, irradiado com luz policromática polarizada (40 mW /cm², comprimento de onda 480–3400 nm); o segundo, uma luz LED contínua (16 mW /cm², comprimentos de onda 625, 660, 850 nm); o terceiro, a mesma luz LED em modo pulsado. O quarto grupo foi o controle, para o qual foi utilizada luz visível não terapêutica. A luz foi administrada extra-oralmente bilateralmente acima das glândulas parótidas e submandibulares por 10 minutos e intra-oralmente acima das glândulas sublinguais por 5 minutos, 3 vezes por semana, por 4 semanas consecutivas. O risco de cárie de cada paciente foi avaliado de acordo com o cariógrama antes e após a terapia. Os fatores de risco de cárie foram determinados a partir de amostras de saliva antes da terapia, duas semanas após o início, no final da terapia e quatro semanas após o final da terapia. Ao final do tratamento, foram obtidos os seguintes achados: No grupo irradiado com luz policromática polarizada e no grupo irradiado com luz LED contínua, as contagens de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp.* diminuíram e a capacidade tampão salivar aumentou ($p < 0,05$). No grupo irradiado com luz LED pulsada, a contagem de *Streptococcus mutans* diminuiu e o fluxo salivar não estimulado e a capacidade tampão salivar aumentaram ($p < 0,05$). Em todos os três grupos experimentais, o risco de cárie foi menor ($p < 0,05$). No grupo de controle com placebo, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros antes e depois da terapia (NEMETH *et al.*, 2020)

2.5 Efeitos do laser na microbiota intestinal

Foi reconhecido nos últimos anos que a microbiota intestinal está intrinsecamente ligada a saúde e a doença. A microbiota intestinal, saudável ou não, possui um efeito profundo na inflamação e produção de citocinas, produção de metabólitos e estimulação vagal direta. A luz pode influenciar a microbiota através do ritmo circadiano. Nos últimos anos há evidência do efeito sistêmico produzido pela

fotobiomodulação. Liebert *et al* (2019) mostrou que a fotobiomodulação aplicada ao abdômen de ratos saudáveis produziu uma alteração significativa na microbiota intestinal naqueles tratados três vezes por semana (808 nm), mas não em um único tratamento com luz vermelha. Após 14 dias de tratamento com luz infravermelha em ratos houve aumento significativo de bactérias benéficas, mas não quando usado a luz vermelha. Lembramos que um aumento significativo nas bactérias da microbiota intestinal em imunodeprimidos pode ser prejudicial (LIEBERT *et al.*, 2019).

3 OBJETIVO

O objetivo foi estudar o efeito da fotobiomodulação utilizado em parâmetros clínicos no crescimento de algumas bactérias intestinais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas utilizadas no estudo

Foram selecionados 4 espécies de bactérias para serem estudadas. Duas pertencentes a microbiota intestinal saudável (*Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus reuteri*) e duas bactérias patogênicas que comumente infectam o intestino de recém nascidos (*E. coli* e *S. aureus*).

Para realização da pesquisa foram utilizadas cepas *S. aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva), *E. coli* ATCC 25922 (Gram-negativa), *Lactobacillus reuteri* DSM17938 (Gram-positiva), *Lactobacillus acidophilus* LA14 (Gram-positiva).

4.2 Obtenção das amostras

As culturas bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* foram cultivadas em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo caldo BHI (*Brain Heart Broth* - Merck), sendo incubadas por um período de 24 horas, à temperatura de 37°C. Após esse período, cada cepa foi transferida para um tubo de ensaio estéril contendo caldo BHI e armazenadas em estufa a 37°C.

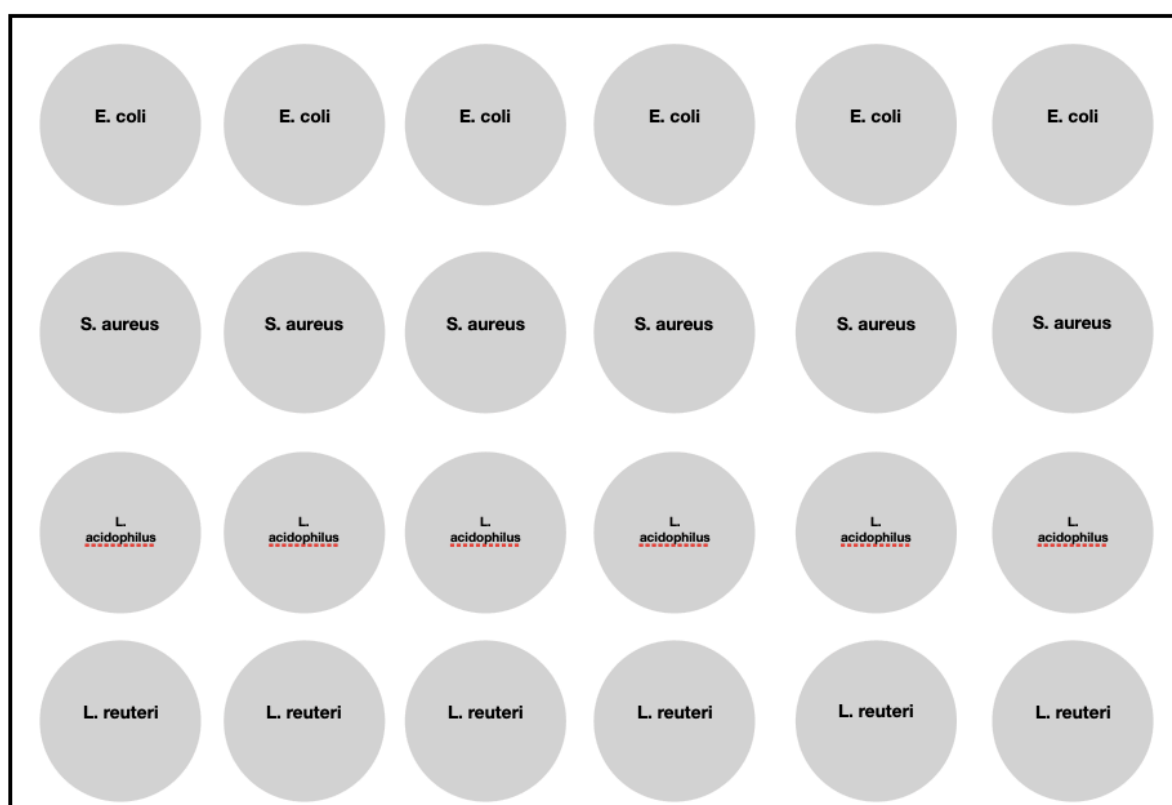
As bactérias *Lactobacillus acidophilus* LA14 e *Lactobacillus reuteri* DSM17938 foram obtidas pela diluição do comprimido em meio GranuCult™ MRS Agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE) acc. ISO 15214 e repique de 10 µl em 5ml de meio MRS novo em 4 horas. Confirmado o crescimento bacteriano, as culturas foram repicadas a cada 24 horas.

4.3 Diluição e irradiação das células bacterianas

Para a realização de cada série de experimentos, as linhagens foram repicadas e mantidas em caldo BHI e MRS, incubadas por um período de 24 horas, em estufa a 37°C. Após o crescimento bacteriano em 24 horas, as células foram adicionadas em placa de cultura de 24 poços, colocados 10µl do caldo contendo bactérias em 1ml de meio de cultura novo por poço, cada fileira contendo uma cepa bacteriana, totalizando 6 grupos de cada espécie por placa.

Em cada experimento foram preparados 4 grupos: leitura inicial, controle, 1 J/cm², 5 J/cm² e 10 J/cm², e repetidos 4 experimentos. Foi realizada leitura do número de bactérias inicial pela espectrofotometria óptica, utilizando-se o Espectrofotômetro SpectraCount® (Packard) com um filtro de 570 nm para aferição da densidade óptica das suspensões bacterianas.

Figura 3. Modelo da placa com distribuição das espécies utilizadas.



Fonte: Próprio autor, 2020

Os valores das leituras de absorvância óptica correlacionam-se com a concentração de células em unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de solução. Essa correlação é mostrada na equação $Y = -0,173 + 21,186x$, onde Y é a concentração de células UFC por mL de solução e X é a absorvância das culturas bacterianas (ARCOS *et al.*, 2004). Foram realizadas contagens iniciais do número de UFC das bactérias na Câmara de Neubauer, e comparadas com a leitura da espectrofotometria. Os resultados foram semelhantes. Todos os procedimentos experimentais foram realizados dentro de uma capela de fluxo laminar estéril.

Para a irradiação foi utilizado o equipamento Irrad LED 5 660 Biopdi (São Carlos Brasil) com 48 LEDs em 660 nm, potência elétrica individual de cada LED = 3

W, área de Irradiação: 16 cm (largura) x 11 cm (profundidade) e uma densidade de potência de 0,025 W/cm², em doses de 1, 5 e 10 J/cm² por 40 segundos, 3 minutos 20 segundos e 6 minutos e 40 segundos, respectivamente. As leituras foram realizadas em 4h, 24h e 48h.

4.4 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise estatística ANOVA Two-Way usando o programa Prism 8, versão 8.3.1 (332), November 27, 2019.

5 RESULTADOS

5.1 *Lactobacillus acidophilus*

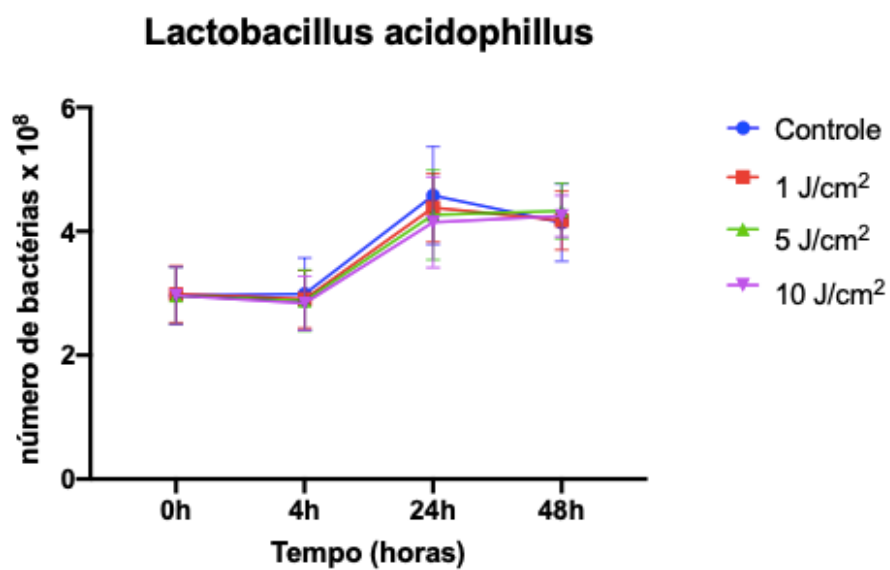
O crescimento de *Lactobacillus acidophilus* não sofreu biomodulação em nenhuma das fluências. Em 24 horas a média de unidades formadoras de colônia x 10^8 (UFCx 10^8) encontrada foi 4,578 (Grupo Controle), 4,382 (Grupo 1 J/cm²), 4,266 (Grupo 5 J/cm²), 4,145 (Grupo 10 J/cm²). Em 48h a média encontrada foi 4,141 (Grupo Controle), 4,177 (Grupo 1 J/cm²), 4,330 (Grupo 5 J/cm²), 4,246 (Grupo 10 J/cm²). A velocidade de crescimento média em 48h foi de 0,024 UFC x 10^8 /h (Grupo Controle), 0,025 UFC x 10^8 /h (Grupo 1 J/cm²), 0,028 UFC x 10^8 /h (Grupo 5 J/cm²), 0,027 UFC x 10^8 /h (Grupo 10 J/cm²). Essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Tabela 2. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia x 10^8 (UFC x 10^8) de *Lactobacillus acidophilus* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm²

	Controle n=24	1J/cm ² n=23	5J/cm ² n=24	10J/cm ² n=24
0h	2,963 (0,462)	2,986 (0,458)	2,963 (0,463)	2,963 (0,463)
4h	2,990 (0,581)	2,906 (0,467)	2,881 (0,493)	2,837 (0,442)
24h	4,578 (0,790)	4,382 (0,551)	4,266 (0,724)	4,145 (0,733)
48h	4,141 (0,627)	4,177 (0,473)	4,330 (0,450)	4,246 (0,331)

Fonte: Próprio autor, 2020

Gráfico 1. UFC x 10⁸ de *Lactobacillus acidophilus* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm²



Fonte: Próprio autor, 2020

Tabela 3. Análise estatística de *Lactobacillus acidophilus* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm² em 48 horas

Tukey's multiple comparisons test	Intervalo de Confiança	Significant?	Adjusted P Value
Controle vs. 1 J/cm ²	-0.1507 to 0.2607	No	0.9009
Controle vs. 5 J/cm ²	-0.1457 to 0.2613	No	0.8837
Controle vs. 10 J/cm ²	-0.08322 to 0.3238	No	0.4233
1 J/cm ² vs. 5 J/cm ²	-0.2029 to 0.2085	No	>0.9999
1 J/cm ² vs. 10 J/cm ²	-0.1404 to 0.2710	No	0.8454
5 J/cm ² vs. 10 J/cm ²	-0.1410 to 0.2660	No	0.8580

Fonte: Próprio autor, 2020

5.2 *Lactobacillus reuteri*

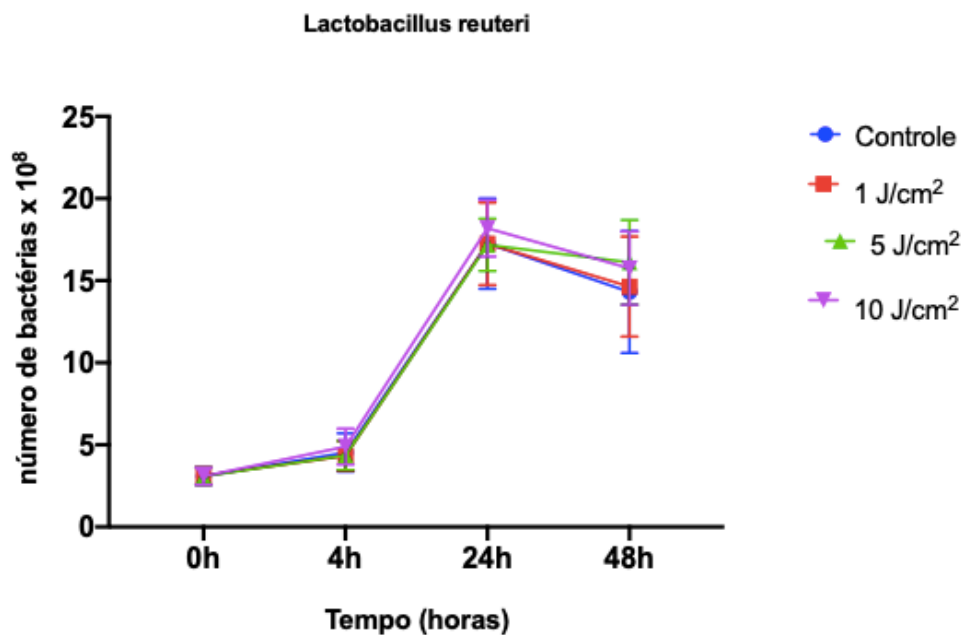
O crescimento de *Lactobacillus reuteri* não sofreu biomodulação em nenhuma das fluências. Em 24 horas a média de unidades formadoras de colônia x 10^8 (UFCx 10^8) encontrada foi 17,257 (Grupo Controle), 17,245 (Grupo 1 J/cm²), 17,181 (Grupo 5 J/cm²), 18,189 (Grupo 10 J/cm²). Em 48h a média encontrada foi 14,307 (Grupo Controle), 14,633 (Grupo 1 J/cm²), 16,114 (Grupo 5 J/cm²), 15,754 (Grupo 10 J/cm²). A velocidade de crescimento média em 48h foi de 0,240 UFC x 10^8 /h (Grupo Controle), 0,025 UFC x 10^8 /h (Grupo 1 J/cm²), 0,271 UFC x 10^8 /h (Grupo 5 J/cm²), 0,264 UFC x 10^8 /h (Grupo 10 J/cm²). Essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Tabela 4. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia x 10^8 (UFC) de *Lactobacillus reuteri* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm²

	Controle n=23	1J/cm ² n=24	5J/cm ² n=23	10J/cm ² n=23
0h	3,093 (0,518)	3,116 (0,519)	3,095 (0,520)	3,093 (0,518)
4h	4,536 (1,165)	4,328 (0,903)	4,357 (0,890)	4,897 (1,085)
24h	17,257 (2,754)	17,245 (2,515)	17,181 (1,595)	18,189 (1,718)
48h	14,307 (3,709)	14,633 (3,047)	16,114 (2,576)	15,754 (2,230)

Fonte: Próprio autor, 2020

Gráfico 2. UFC x 10⁸ de *Lactobacillus reuteri* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm²



Fonte: Próprio autor, 2020

Tabela 5. Análise estatística de *Lactobacillus reuteri* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm² em 48 horas

Tukey's multiple comparisons test	Intervalo de Confiança	Significant?	Adjusted P Value
Controle vs. 1J/cm ²	-0.7580 to 0.6928	No	0.9994
Controle vs. 5J/cm ²	-1.122 to 0.3443	No	0.5198
Controle vs. 10J/cm ²	-1.418 to 0.04797	No	0.0766
1J/cm ² vs. 5J/cm ²	-1.082 to 0.3692	No	0.5843
1J/cm ² vs. 10J/cm ²	-1.378 to 0.07286	No	0.0950
5J/cm ² vs. 10J/cm ²	-1.029 to 0.4367	No	0.7239

Fonte: Próprio autor, 2020

5.3 Escherichia coli

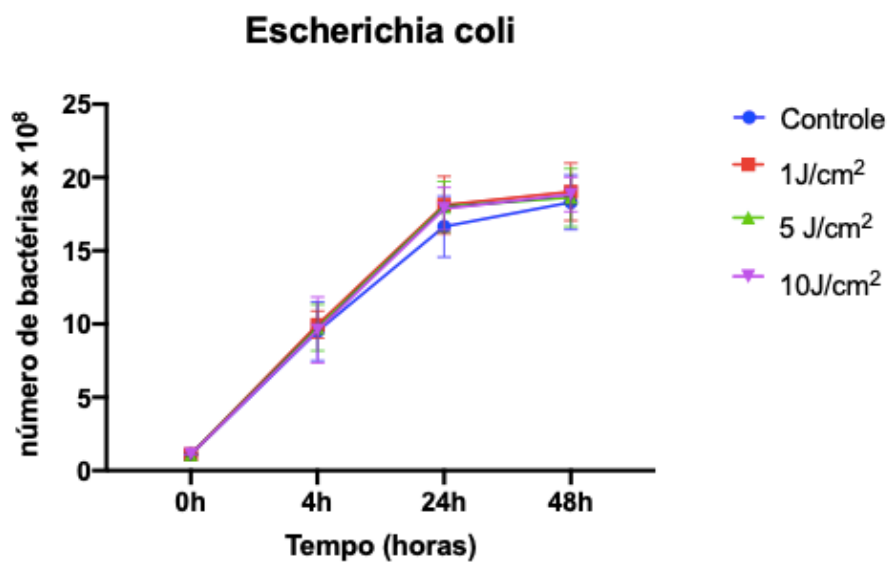
O crescimento de *E. coli* foi estimulado quando comparamos o grupo 1 J/cm² ao grupo Controle, com significância estatística ($p < 0,005$). Nas demais fluências não houve bioestimulação. Em 24 horas a média de unidades formadoras de colônia x 10⁸ (UFCx10⁸) encontrada foi 16,652 (Grupo Controle), 18,119 (Grupo 1 J/cm²), 18,006 (Grupo 5 J/cm²), 17,871 (Grupo 10 J/cm²). Em 48h a média encontrada foi 18,307 (Grupo Controle), 19,023 (Grupo 1 J/cm²), 18,632 (Grupo 5 J/cm²), 18,840 (Grupo 10 J/cm²). A velocidade de crescimento média em 48h foi de 0,358 UFC x 10⁸/h (Grupo Controle), 0,373 UFC x 10⁸/h (Grupo 1 J/cm²), 0,365 UFC x 10⁸/h (Grupo 5 J/cm²), 0,369 UFC x 10⁸/h (Grupo 10 J/cm²).

Tabela 6. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia x 10⁸ (UFC) de *Escherichia coli* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm²

	Controle n=23	1J/cm² n=24	5J/cm² n=24	10J/cm² n=23
0h	1,108 (0,014)	1,108 (0,014)	1,108 (0,014)	1,108 (0,014)
4h	9,513 (2,008)	9,950 (0,930)	9,751 (1,579)	9,589 (2,250)
24h	16,652 (2,079)	18,119 (1,954)	18,006 (1,724)	17,871 (1,457)
48h	18,307 (1,860)	19,023 (1,963)	18,632 (1,982)	18,840 (1,176)

Fonte: Próprio autor, 2020

Gráfico 3. UFC x 10⁸ de *Escherichia coli* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm²



Fonte: Próprio autor, 2020

Tabela 7. Análise estatística de *Escherichia coli* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm² em 48 horas

Tukey's multiple comparisons test	Intervalo de Confiança	Significant?	Adjusted P Value
Controle vs. 1J/cm ²	-1.237 to -0.07269	Yes	0.0204
Controle vs. 5 J/cm ²	-1.062 to 0.1029	No	0.1472
Controle vs. 10J/cm ²	-1.045 to 0.1316	No	0.1884
1J/cm ² vs. 5 J/cm ²	-0.4005 to 0.7517	No	0.8604
1J/cm ² vs. 10J/cm ²	-0.3842 to 0.7804	No	0.8162
5 J/cm ² vs. 10J/cm ²	-0.5599 to 0.6048	No	0.9996

Fonte: Próprio autor, 2020

5.4 Staphylococcus aureus

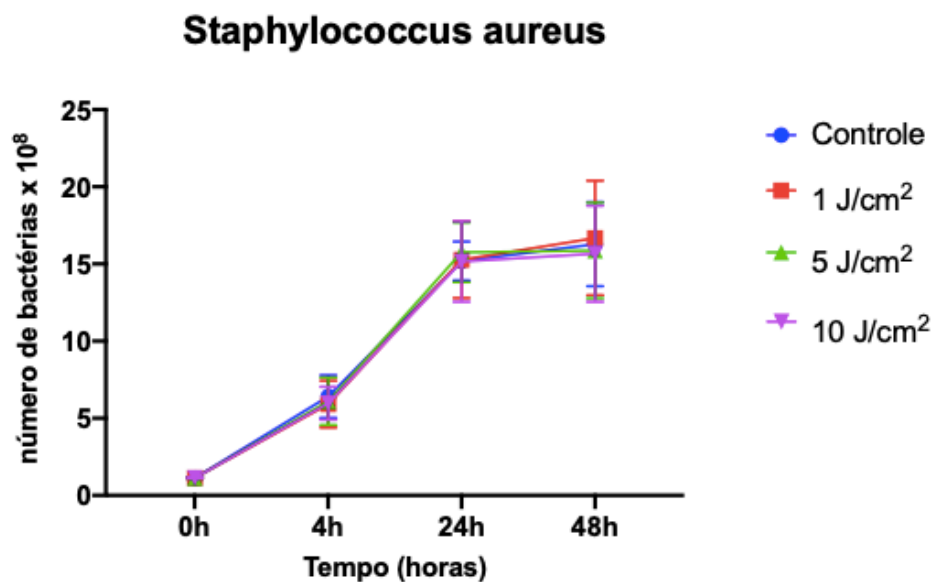
O crescimento de *S. aureus* não sofreu bioestimulação em nenhuma das fluências. Em 24 horas a média de unidades formadoras de colônia x 10⁸ (UFCx10⁸) encontrada foi 15,189 (Grupo Controle), 15,265 (Grupo 1 J/cm²), 15,748 (Grupo 5 J/cm²), 15,160 (Grupo 10 J/cm²). Em 48h a média encontrada foi 16,286 (Grupo Controle), 16,682 (Grupo 1 J/cm²), 15,871 (Grupo 5 J/cm²), 15,664 (Grupo 10 J/cm²). A velocidade de crescimento média em 48h foi de 0,316 UFC x 10⁸/h (Grupo Controle), 0,324 UFC x 10⁸/h (Grupo 1 J/cm²), 0,307 UFC x 10⁸/h (Grupo 5 J/cm²), 0,307 UFC x 10⁸/h (Grupo 10 J/cm²). Essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Tabela 8. Média e desvio padrão das unidades formadoras de colônia x 10⁸ (UFC) de *Staphylococcus aureus* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm²

	Controle n=22	1J/cm ² n=24	5J/cm ² n=23	10J/cm ² n=23
0h	1,137 (0,049)	1,137 (0,049)	1,137 (0,049)	1,137 (0,049)
4h	6,420 (1,382)	5,916 (1,526)	6,100 (1,540)	5,976 (1,071)
24h	15,189 (1,260)	15,265 (2,471)	15,748 (1,935)	15,160 (2,608)
48h	16,286 (2,730)	16,682 (3,712)	15,871 (3,097)	15,664 (3,111)

Fonte: Próprio autor, 2020

Gráfico 4. UFC x 10^8 de *Staphylococcus aureus* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm²



Fonte: Próprio autor, 2020

Tabela 9. Análise estatística de *Staphylococcus aureus* nos grupos controle e irradiados no comprimento de onda 660 nm, nas fluências 1, 5 e 10 J/cm² em 48 horas.

Tukey's multiple comparisons test	Intervalo de Confiança	Significant?	Adjusted P Value
Controle vs. 1 J/cm ²	-0.7717 to 0.7871	No	>0.9999
Controle vs. 5 J/cm ²	-0.7357 to 0.8231	No	0.9989
Controle vs. 10 J/cm ²	-0.5134 to 1.061	No	0.8058
1 J/cm ² vs. 5 J/cm ²	-0.7263 to 0.7982	No	0.9994
1 J/cm ² vs. 10 J/cm ²	-0.5042 to 1.037	No	0.8089
5 J/cm ² vs. 10 J/cm ²	-0.5402 to 1.001	No	0.8672

Fonte: Próprio autor, 2020

6 DISCUSSÃO

A Enterocolite Necrotizante é a principal causa de morte por doenças gastrointestinais em neonatos, e é caracterizada pelo desenvolvimento de necrose intestinal difusa no prematuro submetido a estresse. Ainda, é a principal causa de insuficiência intestinal em prematuros, que leva a Síndrome do Intestino Curto. A alta incidência de ECN, e a falta de estratégias de tratamentos efetivas sugerem que novas abordagens para o tratamento da doença são necessárias (HACKAM *et al.*, 2005). É neste contexto que surge a possibilidade do uso da fotobiomodulação como modalidade terapêutica.

O tratamento atual da ECN envolve o uso de antibióticos, repouso do intestino com jejum, nutrição parenteral total e ressecção cirúrgica ou drenagem peritoneal, quando indicados. Cada uma dessas modalidades são utilizadas para impedir que o quadro séptico do paciente se agrave. Entretanto, nenhuma dessas modalidades trata efetivamente o processo biológico envolvido na ECN. Isto talvez explique porque a taxa de mortalidade da ECN mudou tão pouco nos últimos 35 anos (HACKAM *et al.*, 2005).

Possíveis frentes de tratamento seriam neutralizar os níveis de Oxido Nítrico (NO) intestinal, minimizando a apoptose dos enterócitos e restaurar a restituição e proliferação epitelial. A fotobiomodulação já se mostrou eficaz nesta função, protegendo as células contra a apoptose induzida pelo NO (HACKAM *et al.*, 2005; FARIVAR *et al.*, 2014; RIZZI *et al.*, 2018). Foi proposto que a fotobiomodulação pode funcionar fotodissociando o NO do citocromo C oxidase, revertendo assim a inibição mitocondrial da respiração devido à ligação excessiva de NO (HUANG *et al.*, 2009).

Ainda, agentes terapêuticos que agissem no RhoA-GTPase no intestino, ou restaurassem a troca basal de Sódio-próton no enterócito, poderiam amenizar os efeitos das endotoxinas na função de barreira intestinal. A fotobiomodulação se mostrou eficaz na ativação da RhoA-GTPase, estimulando a proliferação de células do epitélio da córnea. Estimulando a ativação da RhoA-GTPase, a fotobiomodulação estimula a migração celular, o que facilita a ruptura das fibras de estresse e a perda de adesões focais (HACKAM *et al.*, 2005; RHEE *et al.*, 2017). Nossa hipótese é de que a fotobiomodulação age diminuindo a ativação dos Toll-like receptors, levando a um aumento da atividade da RhoA-GTPase. Os Toll-like receptors são proteínas de superfície celular e intracelulares presentes nas células da resposta inata do

organismo, que desencadeiam as cascatas de proteínas quinase e outras respostas que resultam na ativação da célula para produção de citocinas específicas, entre eles a RhoA (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

O fato dos enterócitos expostos as endotoxinas das bactérias expressarem altos níveis de cicloxigenase-2 nos levam a possibilidade intrigante de que agentes que modifiquem a atividade da COX-2 ou sua expressão possam reduzir a extensão e gravidade da ECN nesses pacientes. Tatmatsu-Rocha *et al.* (2018) mostraram em seu trabalho que o uso da fotobiomodulação em lesões de pele de ratos diabéticos diminui a expressão de COX-2. Interessante neste trabalho, que comparando a irradiação com o Laser e o LED, o último mostrou melhor resultado na inibição da expressão da COX-2 (HACKAM *et al.*, 2005; TATMATSU-ROCHA *et al.*, 2018). A expressão da COX-2 aumenta na presença de citocinas. Com a fotobiomodulação temos diminuição na expressão de citocinas inflamatórias, levando a diminuição da expressão de COX-2 (DESMET *et al.*, 2006; HAMBLIN, 2017).

A escolha dos parâmetros utilizados de irradiação foi baseada em dados prévios da literatura, mostrando proliferação de células endoteliais e fibroblastos no comprimento de onda vermelho (MOORE *et al.*, 2005). Outro aspecto importante é o comportamento dos diferentes comprimentos de onda nas bactérias. Enquanto a irradiação infravermelha altera a velocidade de crescimento das bactérias, em alguns casos estimulando-as, a irradiação na faixa vermelha tem pouco efeito no crescimento bacteriano (LIEBERT *et al.*, 2019; NUSSBAUM *et al.*, 2002). Isto pode ser explicado pelo motivo da fotobiomodulação liberar energia na forma de fótons, que são absorvidos pelos cromóforos, principalmente quando as células estão sob estresse (BENVINDO *et al.*, 2008). Esses fótons têm sua energia luminosa convertida em energia química, aumentando a troca iônica. Nos comprimentos de onda do vermelho essa reação ocorre nas mitocôndrias e lisossomos, e nos comprimentos de onda do infravermelho ela começa na membrana citoplasmática, mas ambas ocorrem para aumentar a produção de ATP no ambiente intracelular, permitindo a abertura dos canais de cálcio na membrana citoplasmática e mitocondrial com estímulo de energia gerados pela citocromo C oxidase, possibilitando um aumento na produção de RNA pelo DNA que também sofre aumento, todos esses eventos são essenciais para a reparação tecidual, como síntese de colágeno, liberação de histamina e mitose celular. Comprimentos de onda vermelhos mostram eficácia na proliferação de fibroblastos e comprimentos de onda infravermelhos mostram melhores resultados

para angiogênese (LIMA; BARBOSA; SOUSA-RODRIGUES, 2014). Comprimentos de onda de 500-700 nm são eficazes em tecidos mais superficiais, enquanto comprimentos de onda de 800 a 1000 nm são indicados para tecidos mais profundos, devido a profundidade de penetração nos tecidos (KUFFLER, 2016). Para o tratamento de patologias abdominais em recém-nascidos, comprimentos de onda na faixa do vermelho parecem ser os mais adequados.

Com relação a escolha das bactérias, *E. coli* e *S. aureus* estão entre as bactérias mais comumente associadas a ECN, sendo uma delas Gram-negativa e a outra Gram-positiva, possibilitando o estudo da resposta de diferentes tipos bacterianos ao mesmo tratamento com a fotobiomodulação. Ainda, os lactobacilos são encontrados no leite materno e na microbiota do neonato, porém quando suplementados por comprimidos de probióticos, podem levar a sepse, mostrando que o aumento destes durante a fotobiomodulação também seria prejudicial (HUNTER *et al.*, 2008).

Observamos em estudos prévios que fluências muito altas inibem o crescimento bacteriano. Apesar do resultado positivo para bactérias patogênicas, a irradiação provavelmente inibiria o crescimento das bactérias comensais (SOUSA *et al.*, 2016; BARBOZA *et al.*, 2015).

O crescimento de *L. acidophilus* foi mais lento comparado ao crescimento de *L. reuteri*. Ribeiro em 2012 mostrou que a cepa LA14 possui um crescimento mais lento quando comparada a outras cepas de *Lactobacillus spp.*. Nosso estudo demonstrou não haver influência da fotobiomodulação no crescimento de *Lactobacillus*. Nemeth em seu estudo publicado em 2020 demonstrou a diminuição no número de UFC de *Lactobacillus spp.* irradiados com LED nos comprimentos de onda 625, 660, and 850 nm e uma densidade de potência 16 mW/cm². A diferença encontrada pode ser explicada pelo estudo de Nemeth ser *in vivo* e as glândulas salivares irradiadas por via extra-oral (RIBEIRO *et al.*, 2012; NEMETH *et al.*, 2020).

Na bactéria *E. coli* em nosso estudo a irradiação com fluência de 1 J/cm² estimulou o crescimento bacteriano em relação ao grupo controle. Nas demais fluências houve estimulação do crescimento, mas sem significância estatística. Nussbaum em 2002 mostrou não haver efeito geral no crescimento de *E. coli* após a irradiação com os comprimentos de onda 630, 660, 810 e 905 nm. A maior inibição ocorreu com irradiação de 630 nm em uma exposição radiante de 1 J/cm² (NUSSBAUM *et al.*, 2002). Sousa *et al.* em 2016 mostrou que *E. coli* teve inibição de

crescimento semelhante no comprimento de onda de 830 nm nas fluências de 3, 6, 12 e 24 J/cm². Nos comprimentos de onda de 660 e 904 nm, a inibição do crescimento foi observada apenas nas fluências de 12 e 18 J/cm², respectivamente (SOUSA *et al.*, 2016).

Em nosso estudo a 660 nm 0,025 W/cm², em doses de 5 e 10 J/cm² houve diminuição do crescimento de *S. aureus*, mas sem significância estatística. RANJBAR (2016) em seu estudo *in vivo* usando fotobiomodulação nos parâmetros 685 nm

²
InGaAlP 15 mW, 3 J/cm², obteve inibição do crescimento bacteriano de *S. aureus* (RANJBAR, 2016). Sousa *et al.* em 2012 mostrou que o espectro infravermelho foi mais eficaz quando comparado ao vermelho, principalmente para 904 nm, visto que 660 nm não promoveu inibição global (SOUSA *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos foram otimistas. Não havendo alteração importante na microbiota intestinal, o potencial de uso da fotobiomodulação em patologias intestinais, inclusive na enterocolite necrotizante, começa a aparecer promissor. O uso do comprimento de onda de 660 nm nas fluências de 5 J/cm² e 10 J/cm² nas bactérias patogênicas não levou a uma alteração na velocidade de crescimento significativo, assim como nos *Lactobacillus*.

7 CONCLUSÃO

Culturas de bactérias *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *S. aureus* irradiadas no comprimento de onda 660 nm e uma densidade de potência de 0,025 W/cm², em fluências de 1, 5 e 10 J/cm² não sofreram bioestimulação. O crescimento de *E. coli* foi estimulado quando comparamos o grupo 1J/cm² ao grupo Controle, com significância estatística (p<0,005). Nas demais fluências não houve bioestimulação.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, V. N. *et al.* Antibiotic Exposure in the Newborn Intensive Care Unit and the Risk of Necrotizing Enterocolitis. **The Journal of Pediatrics**, v. 159, n. 3, p. 392-397, 2011.
- ALEXANDRATOU, E. *et al.* Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 1, p. 547–552, 2002.
- ARAUJO, M. M. *et al.* Teste da ação antibacteriana *in vitro* de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 83, p. 1-7, 2014, 2016.
- ARCOS, M. L. *et al.* Criopreservacion de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. **Revista Corpoica**, v. 5, p. 60-63, 2004.
- BARBOZA, L. L. *et al.* Low-intensity red and infrared laser effects at high fluences on *Escherichia coli* cultures. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 48, n. 10, p. 945-952, 2015.
- BENVINDO, R. G. *et al.* Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de baixa potência em bactérias *in vitro*. **Fisioter. Pesqui.**, v. 15, n. 1, p. 53-77, 2008.
- BISQUERA, J. A. *et al.* Impact of Necrotizing Enterocolitis on Length of Stay and Hospital Charges in Very Low Birth Weight Infants. **Pediatrics.**, v. 109, n. 3, p. 423-428, 2002.
- BIZARRO, M. J. *et al.* Antibiotic-Resistant Organisms in the Neonatal Intensive Care Unit. **Seminars in Perinatology**, v. 31, p. 26-32, 2007.
- BLAKELY, M. L. *et al.* Postoperative Outcomes of Extremely Low Birth-Weight Infants With Necrotizing Enterocolitis or Isolated Intestinal Perforation: A Prospective Cohort Study by the NICHD Neonatal Research Network. **Ann. Surg.**, v. 241, n. 6, p. 989-994, 2005.
- COUTINHO, F. *et al.* O efeito do laser de baixa energia no crescimento bacteriano “*in vitro*”. **Rev Bras Ortop**, v. 42, n. 8, p. 248-253, 2007
- CROXEN, M. A. *et al.* Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, 2013.
- DESMET, K. D. *et al.* Clinical and Experimental Applications of NIR-LED. Photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Surgery.**, v. 24, n. 2, p. 121–128, 2006.
- FARIVAR, S. *et al.* Biological Effects of Low Level Laser Therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 5, n. 2, 2014.

GUTHRIE, S. O. *et al.* Necrotizing Enterocolitis Among Neonates in the United States. **J. Perinatol.**, v. 23, n. 4, p. 278-285, 2003.

HACKAM, D. J. *et al.* Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. **Seminars in Pediatric Surgery.**, v. 14, n. 1, p. 49-57, 2005.

HACKAM, D.; CAPLAN, M. Necrotizing enterocolitis: Pathophysiology from a historical context. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 27, p. 11–18, 2018.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophys.**, v. 2017, n. 3, p. 337–361, 2017.

HEISKANEN, V.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation: Lasers vs Light Emitting Diodes? **Photochem Photobiol Sci.** v. 17, n. 8, p. 1003–1017, 2018.

HENRIQUES, A. C. G. *et al.* Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. Revisão da literatura. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 37, n. 4, p. 295-302, 2010.

HEIRMAN, H. F. L. *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, 2005.

HOLCOMB III, G. W.; MURPHY, J. P.; OSTLIE, D. J. **Ashcrat's Pediatric Surgery.** Elsevier, 2014.

HUANG, Y. *et al.* Biphasic Dose Response in Low Level Therapy. **Dose-Response (Prepress)**, v. 7, n.4, p. 358-383, 2009.

HUNTER, C. J. *et al.* Understanding the Susceptibility of the Premature Infant to Necrotizing Enterocolitis (NEC). **Pediatric Research.**, v. 63, n. 2, p. 117-123, 2008.

HSUEH, W. *et al.* Neonatal Necrotizing Enterocolitis: Clinical Considerations and Pathogenetic Concepts. **Pediatric and Developmental Pathology.**, v. 6, p. 6 –23, 2002.

JØRGENSEN, H. J. *et al.* Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, n. 99, p. 158–166, 2005.

KIM, K. *et al.* Photobiomodulation Enhances the Angiogenic Effect of Mesenchymal Stem Cells to Mitigate Radiation-Induced Enteropathy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, p. 1131-1150, 2019.

KUFFLER, D. P. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. **Regen. Med.**, v. 11, n. 1, p. 107–122, 2016.

LAMBERT, D. K. *et al.* Necrotizing enterocolitis in term neonates: data from a multihospital health-care system. **Journal of Perinatology.**, v.27, p. 437-443, 2007.

- LAUTERS, G. **Light against cancer**. 2012. Disponível em: http://www.reflexions.uliege.be/cms/c_41432/en/light-against-cancer?part=2. Acesso em: 17 out. 2020.
- LIEBERT, A. *et al.* "Photobiomics": Can Light, Including Photobiomodulation, Alter the Microbiome? **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v.37, n. 11, p. 681-693, 2019.
- LIMA, F. J. C.; BARBOSA F. T.; SOUSA-RODRIGUES C. F. Use alone or in Combination of Red and Infrared Laser in Skin Wounds. **J Lasers Med.**, v. 5, n. 2, p. 51-57, 2014.
- LINS, R. D. A. *et al.* Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An Bras Dermatol.**, v. 85, n. 6, p. 849-55. 2010.
- LLANOS, A. R. *et al.* Epidemiology of neonatal necrotising enterocolitis: a population-based study. **Paediatric and Perinatal Epidemiology.**, v. 16, n. 4, p. 342-349, 2002.
- MERAL G, T. F. *et al.* Factors affecting the antibacterial effects of Nd:YAG laser *in vivo*. **Lasers Surg Med.**, v. 32, n. 3, p. 197-202, 2003.
- MOORE, P. *et al.* Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation *in vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 36, p. 8 – 12, 2005.
- MOWITZ, E. M. *et al.* The cost of necrotizing enterocolitis in premature infants . **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.**, v. 23, p. 416–419, 2018.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL; K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 8. ed. Elsevier, 2017.
- NEMETH, L. *et al.* The impact of photobiomodulation of major salivary glands on caries risk. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 1, p. 193–203, 2020.
- NEU, J.; WALKER, A. Necrotizing Enterocolitis. **N Engl J Med.**, v. 364, n. 3, p. 255-264, 2011.
- NINO, D. F. *et al.* Necrotizing enterocolitis: new insights into pathogenesis and mechanisms. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology.**, v. 13; p. 590-600, 2016.
- NUSSBAUM, E. L. *et al.* Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) of 810 nm upon *in vivo* Growth of Bacteria: Relevance of Irradiance and Radiant Exposure. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 21, n. 5, p. 283-290, 2003.
- NUSSBAUM, E. L. *et al.* Effects of 630-,660-,810-, and 905-nm Laser Irradiation Delivering Radiant Exposure of 1-50 J/cm² on Three Species of Bacteria *in Vitro*. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 20, n. 6, p. 325-333, 2002.
- OBLADEN, M. Necrotizing Enterocolitis -- 150 Years of Fruitless Search for the Cause. **Neonatology**. v. 96, n. 4, p. 203-210, 2009.

- PEREIRA, P. R. *et al.* Efeitos do laser de baixa intensidade em cultura bacteriana *in vitro* e ferida infectada *in vivo*. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 41, n.1, p. 049-055, 2014.
- POSTEN, W. *et al.* Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol Surg.**, v. 31, n. 3, p. 334-40, 2005.
- 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.
- RHEE, Y. *et al.* Effect of Photobiomodulation on Wound Healing of the Corneal Epithelium through Rho-GTPase. **Med Laser**, v. 6, n. 2, p.67-76, 2017.
- RIBEIRO, K. M. *et al.* Comportamento de cepas distintas de *Lactobacillus acidophilus* em queijo petit-suisse. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 62, n. 4, 2012.
- RIZZI, M. *et al.* Photobiomodulation induces *in vitro* re-epithelialization via nitric oxide production. **Lasers in Medical Science**, v. 33, p. 1003–1008, 2018.
- ROBINSON, J. R. *et al.* Surgical necrotizing enterocolitis. **Seminars in Perinatology.**, n. 41, p. 70–79, 2017.
- SAMUELS, N. *et al.* Risk factors for necrotizing enterocolitis in neonates: a systematic review of prognostic studies. **BMC Pediatrics.**, v. 17, n. 05, p. 01-09, 2017.
- SILVA, H. S. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus reuteri* contra bactérias de interesse alimentar. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p.584-587, 2010.
- SOUZA, J.C.K. **Cirurgia pediátrica: teoria e prática**. São Paulo: Roca, 2007. p. 385
- SOUSA, N. T. A. *et al.* *In Vitro* Analysis of Bacterial Morphology by Atomic Force Microscopy of Low Level Laser Therapy 660, 830 and 904 nm. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 5, 2012.
- SOUSA, N. T. A. *et al.* Red and infrared laser therapy inhibits *in vitro* growth of major bacterial species that commonly colonize skin ulcers. **Lasers Med Sci.**, n. 31, p. 549–556, 2016.
- STOLL, B. J. *et al.* Neonatal Outcomes of Extremely Preterm Infants From the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics.**, v. 126, n. 3, p. 443-456, 2010.
- TATMATSU-ROCHA, J. C. *et al.* Mitochondrial dynamics (fission and fusion) and collagen production in a rat T model of diabetic wound healing treated by photobiomodulation: comparison of 904 nm laser and 850 nm light-emitting diode (LED). **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 187, p. 41–47, 2018.

UPPERMAN, J. S. *et al.* Mechanisms of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure in necrotizing enterocolitis. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 14, n. 3, p. 159-166, 2005.

VERGNANO, S. *et al.* Neonatal sepsis: an international perspective. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 90, p. 220-224, 2005.

VILELA, S. F. G. **Influência de *Lactobacillus acidophilus* sobre biofilme formado por *Candida albicans* *in vitro* e infecção em modelo de invertebrado**. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2013.

VLADIMIROV, Y. A. *et al.* Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation, **BIOCHEMISTRY** (Moscow), v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 1st ed. Springer Science+Business Media Dordrecht, 1995.