



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ALINE CHIODI BORGES

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE DO JATO DE
PLASMA FRIO SOB PRESSÃO ATMOSFÉRICA**

2016

ALINE CHIODI BORGES

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE DO JATO DE PLASMA FRIO
SOB PRESSÃO ATMOSFÉRICA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientador: Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito

Coorientador: Prof. Konstatin Georgiev Kostov

São José dos Campos

2016

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Borges, Aline Chiodi

Atividade antifúngica e citotoxicidade do jato de plasma frio sob pressão atmosférica / Aline Chiodi Borges. - São José dos Campos : [s.n.], 2016. 69 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2016.

Orientadora: Cristiane Yumi Koga-ito

Coorientador: Konstantin Georgiev Kostov

1. Candida albicans. 2. Tricophyton. 3. Micoses. 4. Biofilmes. I. Koga-ito, Cristiane Yumi, orient. II. Kostov, Konstantin Georgiev, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga-Ito (orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus São José dos Campos

Profa. Dra. Ivanildes Vasconcelos Rodrigues

Universidade Federal de Juiz de Fora
Campus Avançado de Governador Valadares

Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Campus Araraquara

Profa. Adj. Janete Dias Almeida

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus São José dos Campos

Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 15 de dezembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP e ao Programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À CAPES pela concessão inicial da bolsa de Doutorado.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) por acreditar no potencial inovador do trabalho e pelo benefício da bolsa de Doutorado (Processo FAPESP 2014/02354-7).

À equipe da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá – UNESP, em especial ao Professor Konstatin Georgiev Kostov e Thalita Mayumi Castaldeli Nishime por todo o apoio na execução deste trabalho.

À minha orientadora Cristiane Yumi Koga-Ito pela confiança e nos momentos em que eu mesma achava que não era capaz de trilhar essa jornada.

À toda equipe do Laboratório de Genoma pelo suporte na execução desse projeto, pela força nos momentos de fraqueza. Devo a vocês muito do que aprendi nesses últimos anos!

À professora Mônica Fernandes Gomes pelo apoio na execução desse trabalho.

Aos meus amores Rafael e Vicente, que me acompanharam em todos os momentos dessa jornada, que me incentivaram quando eu pensei em desistir e que fazem todos os meus passos valerem a pena.

Deus por colocar em meu caminho todas essas pessoas e Instituições que contribuíram para meu crescimento.

“Algo é só impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 12 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 13 |
| 3.1 Estudo do efeito antifúngico do jato de plasma em modo de tensão contínuo (MC) sobre culturas de <i>Candida albicans</i> | 13 |
| 3.2 Estudo do efeito antifúngico do jato de plasma em modo de tensão pulsado (MP) sobre culturas de <i>Candida albicans</i> | 20 |
| 3.3 Estudo do efeito antifúngico do jato de plasma (MP) sobre culturas de <i>Trichophyton rubrum</i> | 24 |
| 3.4 Análise estatística | 26 |
| 4 RESULTADOS | 27 |
| 4.1 Efeito antifúngico do jato de plasma em modo de tensão contínuo (MC) sobre culturas de <i>Candida albicans</i> | 27 |
| 4.2 Efeito antifúngico do jato de plasma em modo de tensão pulsado (MP) sobre culturas de <i>Candida albicans</i> | 37 |
| 4.3 Efeito antifúngico do jato de plasma (MP) sobre culturas de <i>T. rubrum</i> | 46 |
| 5 DISCUSSÃO | 51 |
| 6 CONCLUSÃO | 58 |
| REFERÊNCIAS | 59 |
| ANEXOS | 66 |

Borges AC. Atividade antifúngica e citotoxicidade do jato de plasma frio sob pressão atmosférica [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2016.

RESUMO

As doenças fúngicas representam grande desafio para a área médica e odontológica devido à crescente prevalência e aumento da resistência aos antifúngicos. O plasma frio sob pressão atmosférica (PFPA) é uma mistura gasosa contendo partículas carregadas, radicais livres e radiação. Sua potencial aplicação em doenças infecciosas foi relatada, contudo a literatura carece de estudo sistemático sobre o efeito antifúngico, mecanismos de ação e potencial citotóxico. Neste trabalho foi avaliado o efeito antifúngico do PFPA sobre *Candida albicans* através de ensaios em células planctônicas e biofilmes, efeitos sobre a integridade de parede celular e membrana plasmática, morfogênese, produção de exoenzimas, aderência às células epiteliais e efeito no tratamento *in vivo* de lesões de candidose oral induzida em modelo murino. Ainda, avaliou-se o efeito do PFPA sobre culturas de *Trichophyton rubrum*, além de efeitos sobre capacidade de adesão de conídios. Ainda, o potencial citotóxico foi investigado usando células epiteliais. PFPA em modo de tensão contínuo (MC) foi capaz de reduzir a aderência de *C. albicans* às células epiteliais, modular a transição levedura-hifa na cepa SC 5314 e comprometer a viabilidade de biofilmes. PFPA-MC se mostrou citotóxico em parâmetros efetivos frente a biofilmes de *C. albicans*. Porém, não foi observado efeito citotóxico quando o PFPA foi utilizado em modo de tensão pulsada (MP). A exposição ao PFPA-MP reduziu a invasão de *C. albicans* no epitélio *in vivo*. O PFPA-MP foi capaz de afetar o crescimento de *T. rubrum* a partir de 10 minutos e de afetar a sua capacidade de aderência. Assim, conclui-se que PFPA apresenta efeito antifúngico contra *C. albicans* e *T. rubrum* e é capaz de interferir em fatores de virulência de ambos os micro-organismos.

Palavras-chave: *Candida albicans*. *Trichophyton*. Micoses. Biofilmes.

Borges AC. Antifungal activity and cytotoxicity of atmospheric pressure nonthermal plasma jet [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2016.

ABSTRACT

Fungal diseases represent a great challenge to the medical and dental areas, due to the increasing prevalence and antifungal resistance. Atmospheric pressure plasma jet (APPJ) is a gaseous mixture containing charged particles, free radicals and radiation. Its potential application in infectious disease has been reported, however there is still a lack of a systematic study on the antifungal effect, mechanism of action and cytotoxic potential. The general aim of this project was to evaluate the antifungal effect of APPJ on Candida albicans in planktonic and biofilm cultures, effects on cell wall and cell membrane integrity, morphogenesis, exoenzymes production, adherence to epithelial cells and in vivo effect in the treatment of oral candidosis in murine model will be performed. The effect of APPJ on Trichophyton rubrum cultures and on adherence capability were also evaluated. The cytotoxic potential was evaluated in vitro. APPJ in continuous tension mode (CM) was able to reduce the adherence and yeast-hyphae transition in C. albicans SC 5314 and to decrease biofilm viability. APPJ-CM showed cytotoxic effect in the parameters effective to C. albicans biofilm. Conversely, no cytotoxic effect on epithelial cells were observed when pulsed (PM) plasma jet was used. In vivo tests showed that APPJ-PM was able to prevent C. albicans invasion to the epithelium. T. rubrum cultures were affected by APPJ-PM after 15 minutes of exposure and conidia adherence was impaired by 10 minutes exposure. In conclusion, APPJ showed antifungal effect against C. albicans and T. rubrum and can also impair virulence factors in both microorganisms.

Keywords: Candida albicans. Trichophyton. Mycoses. Biofilms.

1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas cresce em taxas alarmantes devido ao aumento em populações de pacientes imunocomprometidos, idosos e diabéticos, representando um grande desafio para as áreas médicas (Jain et al., 2010; Parada et al., 2013).

Candida albicans são leveduras encontradas nas mucosas e pele humanas como parte da microbiota saudável, no entanto, podem iniciar infecções oportunistas superficiais na pele, mucosa, cabelos e unhas ou infecções sistêmicas graves em pacientes com baixa imunidade (Jayatilake et al., 2009; Ahmed et al., 2013). A partir de uma infecção superficial, o micro-organismo pode atingir tecidos submucosos e subcutâneos ou a circulação sanguínea e por consequência comprometer órgãos vitais, como cérebro e rins (Jayatilake, Samaranayake, 2010).

Micoses superficiais causada pelo gênero *Candida* atingem principalmente pacientes imunocomprometidos HIV-positivos (Jayatilake, Samaranayake, 2010), transplantados (da Silva et al., 2012), idosos (Varade, Burkemper, 2013), diabéticos (de la Rosa-García et al., 2013), recém-nascidos e pacientes que fazem uso de corticóides ou antibióticos (Havlickova et al., 2008).

As candidoses bucais são as formas de candidose mais comum em humanos, principalmente em pacientes portadores de HIV (Jayatilake, Samaranayake, 2010). Nesses pacientes, as lesões fúngicas funcionam como marcadores da doença por surgir devido à debilidade da resposta imune celular, no entanto, pode estar presente em qualquer fase do desenvolvimento da doença (Ramos-e-Silva et al., 2010). As lesões podem atingir a mucosa jugal, língua, palato e gengiva. Em pacientes idosos, a diminuição do fluxo salivar, o uso de corticóides, antibióticos, imunossupressores e o uso de próteses bucais associada à má higienização favorecem o aparecimento das candidoses bucais. Ainda, a exposição a fatores ambientais ao longo da vida e a diminuição da espessura da epiderme facilita a ruptura da pele desses pacientes favorecendo o desenvolvimento de infecções cutâneas (Varade, Burkemper, 2013).

Biofilmes formados por *Candida albicans* estão relacionados a infecções causadas por este micro-organismo, assim como a sua resistência aos antifúngicos

convencionais. Enquanto a formação de biofilmes na superfície de próteses bucais pode levar ao aparecimento de uma infecção superficial (de La Rosa-Garcia et al., 2013), biofilmes aderidos à superfície de catéteres, válvulas cardíacas e próteses articulares estão relacionados a infecções sistêmicas graves (Kojic, Darouich, 2004).

A aderência de *Candida albicans* ao epitélio depende de forças atrativas relacionadas à carga superficial das células (Interação de van der Waals, interação hidrofóbica e movimento Browniano) e de moléculas específicas na superfície do fungo chamadas adesinas, as quais interagem com ligantes específicos na célula hospedeira como proteínas séricas (fator H29), componentes da matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno), ou indiretamente, através da adesão a outros micro-organismos (Williams et al., 2013). Uma vez aderidas a superfície celular, *C. albicans* utiliza outros fatores de virulência que levam ao dano do tecido hospedeiro, como a invasão por hifas, produção de enzimas proteolítica e fosfolipases (Williams et al., 2013; Staniszewska et al., 2014).

As dermatomicoses são infecções fúngicas superficiais que atingem a pele, cabelos e unhas, podem ser causadas por fungos dermatófitos e leveduras comensais da pele como *Candida* spp., ou ainda por fungos não-dermatófitos como fungos filamentosos ambientais (Dawson et al., 2012). Leveduras do gênero *Candida* estão entre os principais agentes causadores de infecções em unhas e pele podendo corresponder a até 49 % dos isolados de dermatomicoses (Silva et al., 2013; Khosravi et al., 2013). Dentre os fungos dermatófitos, *Trichophyton rubrum* é a espécie mais isolada em amostras de dermatomicoses (Ataides et al., 2012; Silva et al., 2013; Vasconcelos et al., 2013).

Processos patológicos relacionados à circulação sanguínea, diabetes, obesidade, psoríase e imunossupressão são condições que podem predispor indivíduos às dermatomicoses (Martinez-Rossi et al., 2016). Em pacientes imunocomprometidos esta infecção representa um problema relevante visto que podem levar a úlceras e infecções bacterianas secundárias, resultando em eventual amputação do membro (Matricciani et al., 2011).

O tratamento de micoses superficiais pode ser feito com antifúngicos sistêmicos ou tópicos como derivados azólicos, griseoflúvina, Nistatina ou ciclopirox dependendo do local, extensão e microrganismo envolvido (Silva et al., 2013). Todavia, existem casos de resistência aos antifúngicos utilizados (Peres et al.,

2010). O tratamento sistêmico pode trazer efeitos adversos ao paciente além de apresentarem duração prolongada, interações com outros fármacos, perfil farmacocinético limitado e custo elevado (Yu et al., 2005; Gupta, Tu, 2006; Lewis, Graybill, 2008).

As onicomicoses, ou micoses de unha, são mais difíceis de tratar por via tópica devido à dificuldade das formulações em penetrarem a lâmina e atingirem o leito ungueal. O tratamento sistêmico, geralmente efetivo, pode trazer efeitos adversos ao paciente além de apresentarem duração prolongada (Gupta, Tu, 2006). Assim, a busca por terapias alternativas para tratamento de dermatomicoses são de grande interesse.

O plasma, conhecido como o quarto estado físico da matéria, pode ser gerado na natureza sob altas temperaturas, como nos raios, estrelas e explosões solares, ou sob baixas temperaturas como em ventos solares, estelares e auroras. É gerado através de gases carregados eletricamente, podendo ser composto por moléculas, átomos, íons e elétrons de várias densidades (Mc Combs, Darby, 2010).

Os plasmas gerados sob baixa pressão podem ser utilizados no tratamento de materiais, como por exemplo na deposição de polímeros sobre alguma superfície (Nabesawa et al., 2013). Contudo, a necessidade de uso de sistemas de vácuo de alto custo que requerem manutenção contínua limita o tamanho do objeto a ser tratado pelo tamanho da câmara de vácuo (Schutze et al., 1998). No entanto, plasmas sob pressão atmosférica podem ser gerados por vários tipos de eletrodos com fontes de excitação como micro-ondas ou eletricidade sem a necessidade de câmaras de vácuo (Laroussi et al., 2003).

Gases nobres (Ar e He), oxigênio (O), nitrogênio (N), ar ambiente ou misturas de gases são utilizados para a geração de jatos de plasma sob pressão atmosférica (Laroussi et al., 2003).

A possibilidade de geração de plasma em temperaturas baixas, próximas a temperatura ambiente, possibilitou o estudo da aplicação desse dispositivo na área médica e odontológica. A utilização de jatos de plasma frio contra micro-organismos patogênicos (Alkawareek et al., 2012a; Joshi et al., 2010), contaminantes de alimentos (Kim et al., 2011; Niemira, 2012), água e solo (Joaquin et al., 2009) vem sendo estudado. Vários estudos apontam a atividade antimicrobiana de jatos de plasma frios sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos na forma

planctônica, esporos bacterianos e biofilmes, mostrando o potencial desse dispositivo para descontaminação, esterilização e anti-sepsia (Sedghizadeh et al., 2012; Jiang et al., 2012; Alkawareek et al., 2012b; Uhm et al., 2012). A tolerância tecidual à exposição ao jato de plasma também vem sendo estudada apresentando resultados promissores (Daeschlein et al., 2012a, 2012b).

O efeito do jato de plasma está associado à formação de radicais livres de oxigênio ou nitrogênio e íons (Laroussi, Leipold, 2004). Acredita-se que as moléculas geradas atuem de forma sinérgica resultando na atividade antimicrobiana. A identificação de moléculas geradas pelo plasma pode ser realizada através de técnicas espectroscópicas. Esses estudos apontam a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), íons nitrato (NO^{-3}) e nitrito (NO^{-2}) (Boekema et al., 2013), radicais hidroxila (OH) (Goree et al., 2006), oxigênio atômico (O), ânion de óxido nítrico (Kolb et al., 2008), ozônio (Lackmann JV et al., 2013). Essas espécies e partículas reativas podem comprometer a integridade da membrana através da peroxidação de lipídeos ou interagir com moléculas intracelulares como DNA e proteínas, levando a danos que podem causar a morte celular ou interferir no crescimento microbiano (Laroussi et al., 2003; Lackmann JV et al., 2013; Alkawareel et al., 2014).

Alguns estudos mostram que o jato de plasma apresenta atividade anti-*Candida* tanto em culturas planctônicas quanto em biofilmes, além de potencializar o efeito de antifúngicos convencionais (Yamazaki et al.; 2011; Fricke et al., 2012; Sun Y et al., 2012), porém a literatura carece de estudo sistemático sobre os mecanismos de ação e toxicidade. Recentemente, os efeitos do jato de plasma sobre a viabilidade de fungos dermatófitos foi discutida (Heilin et al., 2013), abrindo também novas possibilidades de estudos no tema.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica do jato de plasma frio de hélio (He) sob pressão atmosférica sobre *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum* e avaliar o potencial citotóxico e nos parâmetros eficientes para a atividade antifúngica.

2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar os parâmetros físicos do jato de plasma com atividade antifúngica;
- b) Avaliar o efeito do jato de plasma sobre culturas planctônicas e biofilme de *C. albicans* e sobre culturas planctônicas de *T. rubrum*;
- c) Avaliar os efeitos do jato de plasma sobre células de *C. albicans* e *T. rubrum*;
- d) Avaliar o efeito do jato de plasma sobre fatores de virulência de *C. albicans* e *T. rubrum*;
- e) Verificar a citotoxicidade *in vitro* do jato de plasma nos parâmetros antifúngicos efetivos;
- f) Avaliar os efeitos do jato de plasma no tratamento de candidose bucal induzida em modelo murino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo do efeito antifúngico do jato de plasma em modo de tensão contínuo (MC) sobre culturas de *Candida albicans*

3.1.1 Cepas e condições de crescimento

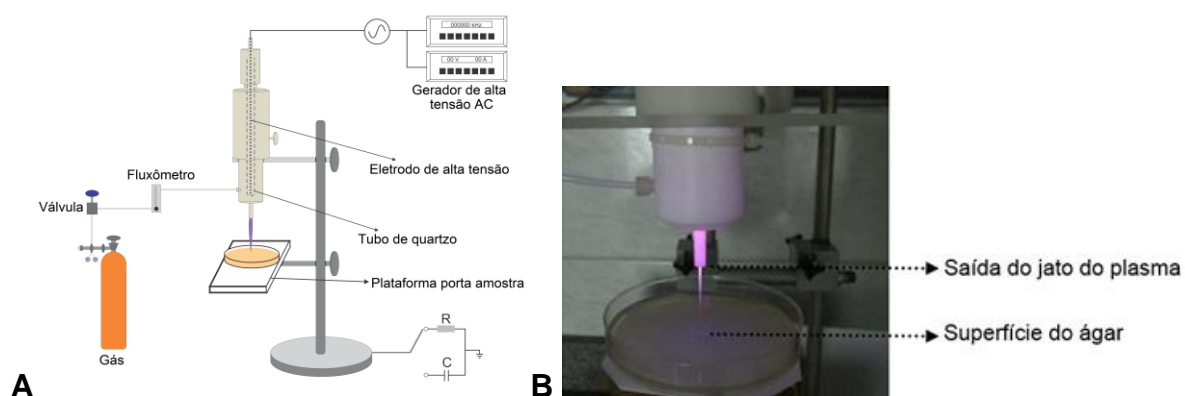
Foram incluídas no estudo cepas de referência de *Candida albicans* SC 5314 e ATCC 18804, além de 10 isolados clínicos de *C. albicans* provenientes de lesões de estomatite protética (CEPh 070/2006). Essas cepas permaneceram armazenadas em caldo Sabouraud com 20% de glicerol a - 80 °C. Os inóculos utilizados nos testes foram obtidos a partir de cultura desses micro-organismos em ágar Sabouraud dextrose (SD) por 24 horas, 37°C. As células de *Candida albicans* foram suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) até atingir a concentração de aproximadamente 10^6 células ml^{-1} , com o auxílio de um espectrofotômetro (λ : 550; DO: 0,380).

3.1.2 Características do jato de plasma em modo de tensão contínuo (MC)

O plasma frio em pressão atmosférica (Figura 1) foi gerado dentro de um cilindro de quartzo contendo um fio fino (0,45 mm) de Ni-Cr o qual foi conectado a um gerador de alta tensão alternada (Minipuls4 da GBS, Elektronik, Dresden, Germany) capaz de gerar sinais com tensões de até 40 kV p-p com frequência de operação entre 5 e 40 kHz. O gás hélio (He) 99,5 % de pureza foi utilizado no estudo. A vazão de 4 L/minuto foi controlada por um rotâmetro. A potência atingida foi de 1,8 W em modo de tensão contínuo (MC). Nessas condições, o jato de plasma possui um comprimento de aproximadamente 2,5 cm (Kostov et al., 2015a).

A caracterização do jato foi realizada através de espectroscopia de emissão óptica (EOS) com comprimento de onda entre 300 e 850 nm (Andor Technology Shamrock 303i) para a identificação das espécies reativas geradas.

Figura 1 - Esquema do aparato para geração do jato de plasma frio sob pressão atmosférica em modo de tensão contínua



Legenda: esquema do equipamento (A) e imagem do jato em funcionamento (B).

Fonte Figura A (Kostov et al., 2015a); Figura B (Elaborado pelo autor).

3.1.3 Determinação dos parâmetros físicos do plasma (MC) com atividade antifúngica

As cepas de referência de *C. albicans* foram utilizadas para padronizar a distância e tempo de exposição ao jato de plasma baseando-se em estudo de Alkawareek et al. (2012a). Assim, 100 μ l dos inóculos (10^6 células ml^{-1}) foram distribuídos, com auxílio de *swabs* estéreis, sobre placas de Petri (90 x 15 mm) contendo ágar Sabouraud dextrose. Após 15 minutos de secagem à temperatura ambiente, pontos padronizados da placa foram expostos ao jato de plasma nos tempos: 30, 60, 90, 120 e 150 segundos, em triplicata. As distâncias entre a saída do jato de plasma e a superfície do ágar foram de 1,5; 2,0; 2,5 e 3 cm. Após 24 horas de incubação, a 37 °C, o diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm) foi determinado.

Os isolados clínicos de candidose bucal foram utilizados para verificar a

variabilidade intra-espécie de *C. albicans*. Para isso, a metodologia de halo de inibição de crescimento foi utilizada. A distância de exposição ao jato de plasma foi mantida em 3 cm e as placas foram expostas ao jato de plasma durante 60, 90, 120, 150, 180 e 240 segundos

O ensaio foi realizado em triplicata e grupo controle expostos apenas ao fluxo de gás foi incluído no ensaio.

3.1.4 Efeito do jato de plasma (MC) sobre células de *C albicans* em suspensão

O efeito do jato de plasma em meio líquido foi estudado baseando-se em estudo de Yamazaki et al. (2011). Em placas de 24 poços foram adicionados 50 µL da suspensão fúngica (10^6 células ml^{-1}) e 450 µL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9 %), caldo RPMI1640 pH 3,5 ou tampão citrato (2 mM) pH 3,5 com distância de 2,5 cm da saída do plasma e fluxo de gás de 2 L min^{-1} . Após exposição ao jato de plasma durante 5 minutos foram obtidas diluições seriadas as quais foram semeadas em ágar SD. Os valores de UFC ml^{-1} foram determinados após 24 horas (37°C) de incubação. O grupo controle não foi exposto ao jato de plasma. O ensaio foi realizado em triplicata em três ensaios diferentes.

Adicionalmente, foi utilizada metodologia baseada em Boekema et al. (2013), onde 150 µl de suspensão fúngica (10^6 células ml^{-1}) foram adicionados a placas de 96 poços e foram expostas ao jato de plasma por 30, 60 e 90 segundos com distância de 1,5 cm da saída do plasma e fluxo de gás de 2 L min^{-1} . Posteriormente, o conteúdo dos poços foi diluído em série e semeado em ágar SD. Após incubação por 48 horas (37°C) foram obtidos os valores de UFC ml^{-1} . O grupo controle foi exposto apenas ao fluxo de gás sem geração do plasma ou não exposto. O estudo foi realizado em triplicata em 3 diferentes ocasiões.

A partir deste ensaio, foram selecionados os parâmetros (tempo de exposição e distância de tratamento) de inibição do crescimento fúngico, os quais foram utilizados para avaliar os efeitos celulares e sobre fatores de virulência de *C. albicans*.

3.1.5 Efeito do jato de plasma (MC) sobre biofilmes monoespécie de *C. albicans*

Para a avaliação do efeito do jato de plasma MC sobre biofilmes de *C. albicans* (ATCC 18804 e SC 5314) 200 µl de caldo RPMI (acrescido de 2 % de glicose) e 10 µl de inóculo contendo 10^6 células ml^{-1} foram adicionados a placas de microtitulação de 96 poços. Após 90 minutos (37 °C, 80 rpm) de incubação, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com solução fisiológica estéril para retirada das células não aderidas ao fundo dos poços. Posteriormente, meio de cultura novo foi adicionado e os biofilmes foram cultivados durante 24 horas (37 °C, 80 rpm). Então o meio de cultura foi retirado, os biofilmes foram lavados solução fisiológica estéril e expostos ao jato de plasma durante 1; 2,5; 5 e 7,5 minutos, a 1,5 cm de distância da ponta do equipamento. Após diluição em série, inoculação em ágar SD e incubação (37 °C, 24 horas), a viabilidade do biofilme foi determinada através de contagem de UFC biofilme⁻¹ e os valores foram comparados com biofilmes não expostos ao jato de plasma. Esse ensaio foi realizado em triplicata em três ocasiões diferentes.

Os biofilmes, expostos ou não ao jato de plasma conforme descrito anteriormente, foram submetidos ao processo de fixação por glutaraldeído 2,0 % durante 24 horas. Após enxague em solução fisiológica foi realizada a desidratação em diferentes concentrações de etanol (70 % e 95 % durante 10 minutos e 100 % durante 20 minutos) e os biofilmes foram secos em estufa (28 °C) durante 4 dias. Então os biofilmes foram metalizados (Emitech SC7620) e as imagens foram feitas em microscópio eletrônico de varredura (INSPECT S50).

3.1.6 Análise do efeito do jato de plasma (MC) sobre a parede celular de *C. albicans*

O efeito do jato de plasma sobre a parede celular fúngica foi avaliado através do ensaio de proteção por sorbitol baseando-se na metodologia proposta por Frost et al. (1995), na qual o sorbitol 0,8 M atua como osmoprotetor aumentando

a viabilidade celular. Assim, suspensões de *C. albicans* (ATCC 18804 e SC 5314) contendo 10^6 células ml^{-1} (150 μL) foram expostas ao jato de plasma durante 30, 60 e 90 segundos. Posteriormente, foram adicionadas a estas suspensões caldo RPMI contendo sorbitol 1,6 M (concentração final de sorbitol na suspensão = 0,8 M). O tempo de exposição ao jato de plasma em que houve redução visual do crescimento fúngico quando comparado ao controle não tratado foi avaliado após 2 e 7 dias de incubação (37 °C, câmara úmida). Paralelamente, suspensões expostas ao jato de plasma, porém sem adição de sorbitol, foram cultivadas nas mesmas condições.

Para confirmar a capacidade do ensaio em identificar danos na parede celular, foi realizado a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da caspofungina, antifúngico que tem como alvo a parede celular, baseando-se no documento M27-A3 da Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) com concentrações variando de 0,05 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na presença e ausência de sorbitol (0,8 M) com cultivo nas mesmas condições descritas anteriormente. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.1.7 Efeito do jato de plasma (MC) na integridade da membrana celular

O efeito do jato de plasma sobre a membrana de *C. albicans* foi avaliado através da identificação de perda de material celular (Khan et al., 2013). Suspensões de *C. albicans* (ATCC 18804 e SC 5314) contendo 10^6 células ml^{-1} (150 μL) foram expostas ao jato de plasma durante 30, 60 e 90 segundos. Após adição de solução de PBS e repouso por 1 hora, as suspensões foram centrifugadas por 5 minutos (10.000 rpm) e a absorbância dos sobrenadantes foi determinada em 260 nm. Como controle negativo, utilizou-se suspensão não exposta ao jato de plasma. O grupo controle positivo foi exposto à anfotericina B 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O experimento foi realizado em triplicata em três ocasiões diferentes.

3.1.8 Efeito do jato de plasma (MC) sobre a morfogênese de *C. albicans* (transição levedura-hifa)

O efeito do jato de plasma sobre a transição levedura-hifa foi realizado em placa de 96 poços onde 150 µL de suspensões de *C. albicans* (ATCC 18804 e SC 5314) contendo 10⁶ células ml⁻¹ foram expostas ao jato de plasma durante tempos 30 e 60 segundos. Posteriormente, foram adicionados 150 µL de caldo RPMI (2 vezes concentrado) e as suspensões foram incubadas a 37 °C. Após 4 e 24 horas foi realizada contagem de células em Câmara de Neubauer as quais foram classificadas como “broto” (menos de três células juntas) ou hifas, incluindo tanto as hifas verdadeiras e pseudohifas. A porcentagem de filamentação foi determinada através da seguinte fórmula e os valores entre os grupos exposto e não expostos ao jato de plasma foram comparados:

$$\% \text{ filamentação} = \frac{\text{número de hifas} \times 100}{\text{número de leveduras} + \text{hifas}}$$

3.1.9 Ação sobre a aderência de *Candida albicans* às células epiteliais bucais

As células epiteliais bucais foram obtidas de indivíduos saudáveis (sem candidose bucal) por raspagem da mucosa jugal utilizando swabs estéreis (CONEP CAAE 31787814.1.0000.0077). De acordo com Etgeton et al. (2011), as células foram suspensas em 10 mL de solução fisiológica tamponada (PBS) e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Após 3 lavagens com PBS, as células foram analisadas ao microscópio para confirmar a ausência de leveduras. Após contagem em Câmara de Neubauer, 450 µL de suspensão de células epiteliais bucais (10⁵ células ml⁻¹) foram misturados a 450 µL suspensão de *Candida albicans* ATCC 18804 ou SC 5314 (10⁵ células ml⁻¹) expostas ao jato de plasma em tempos sub-inibitórios. Como controle foram usadas suspensões de *C. albicans* não expostas ao jato de plasma. Após 1 hora de incubação (37 °C, 70 rpm), a mistura foi centrifugada

a 1500 rpm e lavadas 5 vezes com PBS para retirada das células não aderidas. Posteriormente, alíquotas dos pellets foram transferidas para uma lâmina de microscopia e fixada em chama. As lâminas foram coradas com cristal violeta durante 1 minuto, posteriormente foram lavadas em água e imediatamente coradas com coloração de Papanicolau. Foram avaliadas 25 células em cada lâmina (exposta ou não ao jato de plasma) e o número de células de *C. albicans* aderida nas células epiteliais bucais foi determinado. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.10 Efeito do jato de plasma (MC) sobre a produção das enzimas protease e fosfolipase

Suspensões de *C. albicans* (ATCC 18804 e SC 5314) contendo 10^6 células ml^{-1} (150 μL) foram expostas ao jato de plasma durante 30 e 60 segundos. Para a análise da produção de fosfolipase (Polak, 1992), 2 μL das suspensões expostas ao jato de plasma foram inoculadas em meio de cultura específico de fosfolipase composto de 20 g dextrose, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 58,5 g de cloreto de sódio, 0,55 g de cloreto de cálcio, 20 g de ágar em 840 ml de água destilada e acréscimo de 160 ml de emulsão de gema de ovo a 50%.

A produção de protease foi avaliada através da inoculação de 2 μL de suspensão exposta ao jato de plasma em ágar contendo soro albumina bovina (BSA). Uma solução contendo 0,04 g MgSO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 , 1 g NaCl , 0,2 g extrato de levedura, 4 g glicose e 0,5 g BSA (albumina sérica bovina) foi preparada e o pH ajustado a 3,5 com 1 N HCl . Essa solução foi esterilizada por filtração e 60 ml foram adicionados a 140 ml de ágar.

As placas foram incubadas por 5 dias a 37 °C em câmara úmida e os resultados foram expressos em valores de Pz, (razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação), de acordo com Price et al. (1982). Os resultados foram classificados quanto à capacidade da ação enzimática como negativa (Pz = 1), moderada (Pz 0,51 – 0,74) ou alta (Pz 0,35 – 0,5) de acordo com Mattei et al. (2013).

3.1.11 Citotoxicidade do jato de plasma (MC) sobre células epiteliais

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando células Vero (ECACC 84113001), cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com soro albumina bovina (10 %), Penicilina (100 UI mL⁻¹) e estreptomicina (100 µg mL⁻¹) a 37 °C e atmosfera de 5 % de CO₂.

As células foram transferidas para placas de 96 poços (6 x 10⁴ células/ poço) e incubadas durante 24 horas (37 °C) para promover a adesão celular. Então, o meio de cultura foi removido e 30 µL de HBSS-MOPS (Hanks' Balanced Salt Solution pH 7,4 com 10 mM de 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) foi adicionado aos poços, os quais foram expostos ao jato de plasma MC durante 30, 60, 150 e 300 segundos.

A viabilidade celular foi determinada imediatamente após exposição ao jato de plasma MC ou após 24 horas de incubação (em meio DMEM, 37 °C, 5 % CO₂) através do ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Após 3 horas de incubação, a solução de formazan foi substituída por DMSO (dimetilsulfóxido) com o objetivo de dissolver os cristais de formazan. Os valores de absorbância (570 nm) foram determinados assim como e a porcentagem de viabilidade celular considerando a absorbância do grupo não exposto ao jato de plasma MC como 100%.

Devido à alta citotoxicidade do jato de plasma MC observada neste estudo, o jato de plasma MP foi estudado com o objetivo de avaliar o efeito do jato de plasma no tratamento de candidose bucal induzida em modelo murinho em condições seguras para as células epiteliais do hospedeiro.

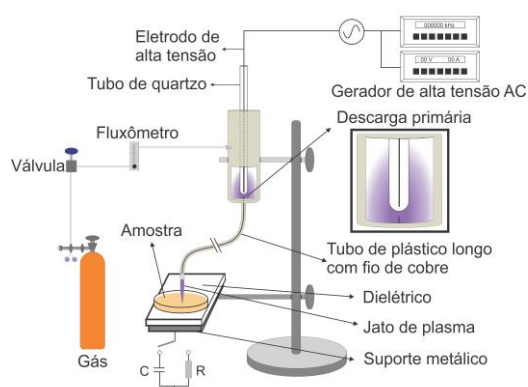
3.2 Estudo do efeito antifúngico do jato de plasma em modo de tensão pulsado (MP) sobre culturas de *Candida albicans*

3.2.1 Características do jato de plasma (MP)

O plasma frio em pressão atmosférica em modo pulsado (MP) foi gerado através do mesmo sistema descrito anteriormente ao qual foi conectado um tubo de 1 m de comprimento e diâmetro interno de 2,5 mm (Figura 2). Foi utilizado fluxo de gás total de 2,0 L/min, 31,7 kHz de frequência, tensão de 26 kV pico a pico. O sinal foi modulado com uma frequência de 667 Hz e ciclo de trabalho de 22 %, gerando uma pluma com potência de 1 W. (Figura 2). (Kostov et al., 2015b).

A caracterização do jato foi realizada através de espectroscopia de emissão óptica (EOS) com comprimento de onda entre 300 e 850 nm (Andor Technology Shamrock 303i) para a identificação das espécies reativas geradas.

Figura 2 - Esquema do jato de plasma em modo de tensão pulsado



Fonte: Kostov et al. (2015b).

3.2.2 Citotoxicidade do jato de plasma (MP)

O ensaio de citotoxicidade foi realizado conforme descrito em 3.1.11. Da mesma forma, a viabilidade celular foi determinada imediatamente após exposição ao jato de plasma MP ou após 24 horas de incubação (em meio DMEM, 37 °C, 5 % CO₂) através do ensaio de MTT. Os valores de absorbância no comprimento de

onda de 570 nm foram determinados e a porcentagem de viabilidade celular foi determinada considerando a absorbância do grupo não exposto ao jato de plasma MP como 100%.

3.2.3 Efeito do jato de plasma (MP) sobre biofilmes de *C. albicans*

Biofilmes de *C. albicans* ATCC 18804 foram formados no fundo de placas de 96 poços, conforme descrito no item 3.1.5. Após 24 horas de incubação (37 °C), os biofilmes foram expostos ao jato de plasma MP durante 2,5; 5 e 7,5 minutos. Então os biofilmes foram rompidos e os valores de UFC/ biofilme foram determinados.

3.2.4 Efeito do jato de plasma (MP) no tratamento de lesões de candidose oral induzida em modelo murino

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais sob o protocolo n 01/2015 CEUA / ICT – CSJC – UNESP.

A metodologia de indução da candidose oral foi baseada em Rossoni et al. (2015). Setenta e nove camundongos machos (*Mus musculus* Swiss) de aproximadamente 40 g foram randomicamente divididos em 3 grupos: Tratados com plasma MP (n = 24), tratados com nistatina 100.000 UI (n = 24) e controle não tratado (n = 24). Todos os animais foram imunossuprimidos com metilprednisolona (Depro-Medrol; Pfizer) por via intraperitoneal na concentração de 100 mg/Kg peso corporal durante 4 dias em dias intercalados. A inoculação com *C. albicans* foi realizada 2 vezes em dias intercalados as imunossupressões. Para isso, os animais foram sedados por via intramuscular (Dopalen – 0,2 ml/100 g/Kg e 2% xilazina - Anasedan, 0,1 ml/100 g/Kg) e então swabs embebidos em suspensão de *C. albicans* ATCC18804 (1×10^8 células ml⁻¹) foram mantidos em contato com a língua do animal durante 3 minutos. Três dias após a última inoculação foi realizado o diagnóstico das lesões. Os animais foram mantidos em condições usuais de biotério durante todo o período experimental com alimentação e água acrescida de

tetraciclina (Terramicina – Pfizer, 0,83 mg/ml) *ad libitum*.

Os animais foram submetidos ao tratamento duas vezes num período de 48 horas, sendo que o primeiro tratamento foi realizado 24 horas após o diagnóstico da lesão. Os grupos tratados com plasma foram expostos ao jato de plasma MP durante 5 minutos, mantendo a distância de 1,5 cm entre a saída do tubo e a língua do animal. Os grupos tratados com nistatina (Neo Química) receberam 100 µl de suspensão de nistatina 100.000 UI de cada lado da boca. O grupo controle não recebeu tratamento. Os animais foram sacrificados por excesso de anestésico 24 ou 48 horas após o último tratamento. O quadro 1 resume as etapas do experimento.

Quadro 1 - Esquema de execução do experimento *in vivo*

| Dias | Evento |
|-------------|--------------------------------------|
| D1 | Imunossupressão |
| D2 | Infecção |
| D3 | Imunossupressão |
| D4 | Infecção |
| D5 | Imunossupressão |
| D6 | * |
| D7 | Diagnóstico da lesão Imunossupressão |
| D8 | Tratamento 1 |
| D9 | Tratamento 2 |
| D10 | Eutanásia 24 horas após tratamento 2 |
| D11 | Eutanásia 48 horas após tratamento 2 |

*Nenhum procedimento foi executado.

Para avaliar o efeito do jato de plasma na mucosa lingual, 4 animais foram expostos ao jato de plasma MP sem indução de candidose. Para avaliar alterações na mucosa lingual devido ao estabelecimento de lesões de candidose, 3 animais foram sacrificados no dia do diagnóstico da lesão.

Para análise microbiológica foram selecionados aleatoriamente 7 animais de cada grupo. As línguas foram removidas e maceradas em solução fisiológica estéril seguida por semeadura em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol.

Cinco animais de cada grupo tiveram as línguas removidas, fixadas em solução de formalina 20% e embebidas em parafina. Secções semi-seriadas de 5 micrometros foram obtidas e coradas por HE (hematoxilina-eosina) para observar alterações inflamatórias epiteliais e das estruturas da mucosa lingual. A coloração de PAS (periódico ácido de Schiff) foi utilizada para avaliar o grau de invasão do epitélio lingual por *C. albicans*. Foram analisados 21 campos histológicos em 2 cortes para cada animal, totalizando 42 campos histológicos, os quais foram analisados com objetiva de 40 X em microscópio óptico (Zeiss) por um único observador. Análise semi-quantitativa para avaliar o grau de invasão do epitélio por *C. albicans* foi realizada através de atribuição dos seguintes scores: 0: ausência de hifas; 1: 1-5 hifas; 2: 6-15 hifas; 3: 16-50 hifas e 4: mais de 50 hifas (Rossoni et al., 2015).

3.3 Estudo do efeito antifúngico do jato de plasma (MP) sobre culturas de *Trichophyton rubrum*

3.3.1 Cepa e condições de crescimento

A cepa padrão de *Trichophyton rubrum* ATCC 28189 foi fornecida pela Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). O inóculo foi obtido conforme descrição do documento M38-A da Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). O micro-organismo foi cultivado em ágar Batata durante 7 dias, a 28 ± 2 °C. Então, 1 ml de solução fisiológica estéril foi adicionada à cultura, a qual foi raspada com uma alça de inoculação. A suspensão resultante foi transferida para um tubo tipo Falcon e agitada vigorosamente em vórtex. Após 5 minutos de repouso, a porção superior da suspensão foi transferida para um novo tubo e a concentração de conídios foi determinada através de contagem em Câmara de Newbawer com auxílio de um microscópio óptico (aumento 40 x). O inóculo de partida continha aproximadamente $1,0 \times 10^6$ conídeos ml⁻¹.

3.3.2 Inibição radial do micélio (conídeo germinado)

Este ensaio foi realizado baseando-se em estudo de Heilin et al. (2013), com modificações. Alíquotas de 20 μL de inóculo contendo 10^6 conídios ml^{-1} foram depositados sobre o centro de placas contendo ágar Batata. Após incubação por 48 horas, o diâmetro de crescimento fúngico foi medido com o auxílio de um paquímetro. Em seguida, as placas foram expostas ao jato de plasma MP durante 5, 10 e 15 minutos com distância de 1,5 cm entre a saída do jato e a superfície do ágar. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 15 dias, a 28 ± 2 °C. O diâmetro do crescimento do micélio foi avaliado 2, 5, 7, 12 e 15 dias após a exposição ao jato de plasma. Controle de crescimento, sem tratamento, foi incluído.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos em três ocasiões diferentes.

3.3.3 Efeito do jato de plasma (MP) sobre conídios em suspensão

Para avaliar o efeito do jato de plasma MP sobre conídios em suspensão, 500 μL de inóculo contendo 10^6 conídios ml^{-1} foram transferidos para poços de placa de 24 poços. Após exposição ao jato de plasma durante 5, 10 e 15 minutos, foi acrescentado ao volume dos poços 500 μL de caldo RPMI 2 vezes concentrado. As placas contendo as suspensões foram incubadas a 28 ± 2 °C durante 7 dias. Durante todos os sete dias os poços foram avaliados visualmente quanto à presença ou ausência de crescimento fúngico.

3.3.4 Inibição da produção de biomassa

Esse ensaio foi realizado baseando-se na metodologia de Khan et al. (2014), onde 500 μl de inóculo contendo 10^6 conídios ml^{-1} foram expostos ao jato de plasma

durante 5, 10 e 15 minutos. Posteriormente, as suspensões foram transferidas para tubos contendo 50 ml de caldo Sabouraud dextrose, os quais foram incubados a 28 ± 2 °C. Após 5 dias, a biomassa do micélio foi coletada através de filtração em filtros pré-pesados. Os filtros foram secos em estufa a 70 °C por 24 horas. Posteriormente, o filtro foi novamente pesado e foi determinado a porcentagem de inibição de crescimento de micélio comparando-se ao controle não exposto ao jato de plasma. Este ensaio foi realizado em triplicata em três diferentes ocasiões.

3.3.5 Efeito do jato de plasma (MP) sobre dermatófitos em modelo ex vivo de unha

Fragmentos de unhas das mãos ou pés foram coletados de voluntários sem infecção (onicomicoses), após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CONEP CAAE 31787814.1.0000.0077). As unhas foram cortadas em fragmentos de 1 x 1 mm, os quais ficaram em contato com etanol 70 % durante 15 minutos. Após secagem a temperatura ambiente, os fragmentos foram transferidos para placa de 96 poços e sobre eles foram depositados 5 μ L de suspensão contendo 10^6 conídios ml^{-1} . Após uma hora de contato, 200 μ L de água estéril foi adicionada aos poços, os quais foram incubados a 28 ± 2 °C durante 5 dias (Takasura, 2000; Pereira et al., 2015). O crescimento fúngico foi observado em microscópio de luz invertido. O experimento foi realizado em triplicata.

3.4 Análise estatística

Os ensaios realizados com 9 repetições foram analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism[®] 6.0 (GraphPad Software Inc.) através do teste de Kruskal-Wallis / Dunn, com exceção do ensaio de morfogênese onde foi usado o teste ANOVA / Dunnt's. Os ensaios que realizados com 3 repetições estão expressos em valores de média \pm desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito antifúngico do jato de plasma em modo de tensão contínuo (MC) sobre culturas de *Candida albicans*

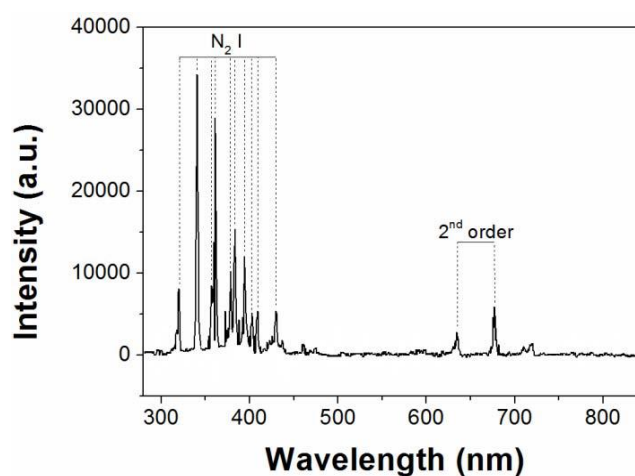
4.1.1 Caracterização do jato de plasma em modo de tensão contínuo (MC)

Para determinação do fluxo de gás ideal, a estabilidade do jato de plasma foi utilizada como parâmetro. Dessa forma, foi possível determinar que o fluxo de 4 L min⁻¹ de hélio gerou um feixe estável com 2,5 cm de comprimento.

A temperatura atingida pelo jato de plasma foi mensurada através de termômetro infravermelho durante 240 segundos. Assim, foi possível observar que a temperatura máxima atingida foi de 40 °C.

O espectro de emissão óptica obtido a partir da ponta do plasma MC (Figura 3) mostrou que o plasma é composto por moléculas de N₂ e N₂⁺ e picos característicos de He entre 550 e 750 nm.

Figura 3 - Espectro de Emissão Óptica do jato de plasma MC



Legenda: N: nitrogênio.

Fonte: Kostov et al. (2015a).

4.1.2 Parâmetros físicos do plasma (MC) com atividade antifúngica

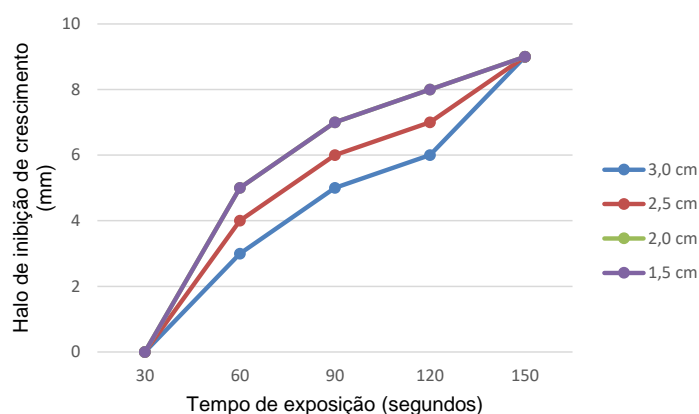
Para a determinação do parâmetro distância de aplicação, placas de ágar contendo suspensão de *C. albicans* ATCC18804 foram expostas ao jato de plasma durante 30, 60, 90, 120 e 150 segundos com distâncias de 1,5; 2; 2,5 e 3 cm entre a saída do jato e a superfície do ágar.

As relações entre tempo e distância de aplicação do jato de plasma estão apresentadas na figura 4. Nenhuma variação de distância apresentou atividade antifúngica contra a cepa estudada no tempo de 30 segundos. O diâmetro máximo de inibição (9 mm) foi alcançado após 150 segundos de exposição ao jato de plasma em todas as distâncias avaliadas.

Entre 60 e 120 segundos, foi possível observar uma relação diretamente proporcional entre o diâmetro do halo de inibição do crescimento e o tempo de exposição em todas as distâncias avaliadas, ou seja, quanto maior o tempo de exposição, maior o diâmetro do halo.

Observou-se uma relação inversamente proporcional entre a distância de aplicação e o diâmetro do halo de inibição entre 60 e 120 segundos de exposição ao jato de plasma, ou seja, quanto mais próximo do ágar o jato de plasma foi aplicado (menor distância), maior o diâmetro do halo. Contudo, não houve diferença no diâmetro do halo de inibição de crescimento nas distâncias de 1,5 e 2,0 cm.

Figura 4 - Relação entre a média do diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano e tempo de exposição ao jato de plasma em diferentes distâncias de aplicação utilizando *C. albicans* ATCC 18804



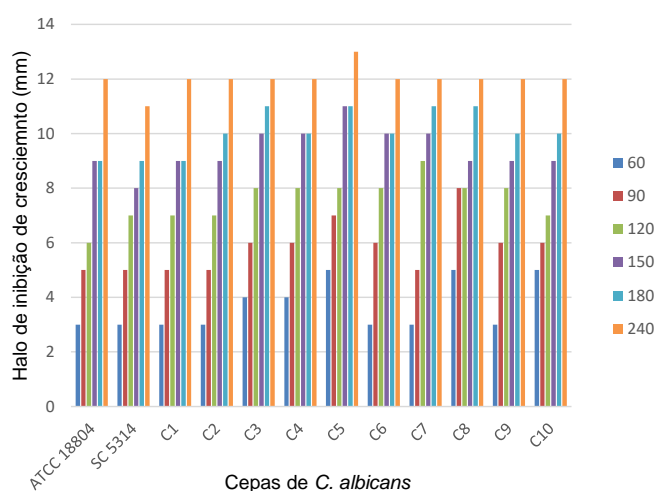
Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se que somente o fluxo de hélio não apresenta atividade antimicrobiana, uma vez que não houve formação de halo de inibição de crescimento após 240 segundos de aplicação.

Observou-se que tanto o jato de hélio (sem geração do plasma), quanto o jato de plasma causam pequeno rebaixamento na superfície do ágar. Para avaliar a influência desse fenômeno no crescimento fúngico, placas sem suspensão de *C. albicans* ATCC 18804 foram expostas ou fluxo de gás durante 240 segundos e posteriormente a suspensão de *C. albicans* foi distribuída na placa. Após 24 horas de incubação (37 °C) não foi observado inibição de crescimento, indicando que o rebaixamento da superfície não impede o crescimento microbiano.

A figura 5 mostra a variação do diâmetro do halo de inibição de crescimento entre 60 e 240 segundos de exposição ao jato de plasma de 2 cepas de referência de *C. albicans* (ATCC 18804 e SC 5314) e 10 isolados clínicos de candidose bucal na distância fixa de 3 cm. Todas as cepas estudadas apresentaram relação diretamente proporcional entre tempo de exposição ao jato de plasma e diâmetro do halo de inibição de crescimento. O menor diâmetro foi observado após exposição ao jato de plasma durante 60 segundos (3 a 5 mm) e o maior diâmetro após 240 segundos (entre 11 e 13 mm).

Figura 5 - Variação média do diâmetro do halo de inibição de crescimento em diferentes tempos de exposição ao jato de plasma



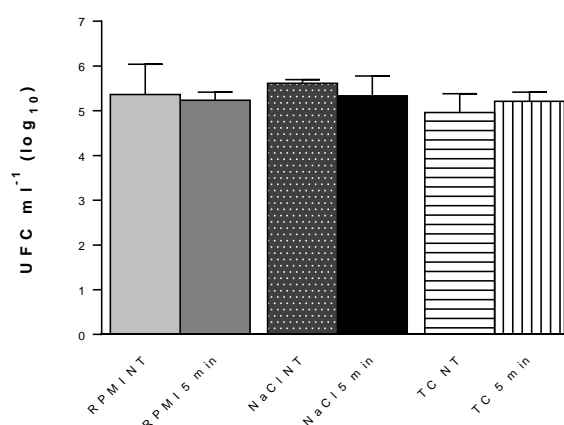
Legenda: Cepas de referência: ATCC 18804 e SC 5314. Isolados clínicos de candidose bucal: C1 a C10.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.3 Efeito do jato de plasma (MC) sobre células de *C albicans* em suspensão

Inicialmente, 500 μl de suspensões de *C albicans* ATCC18804 em NaCl, tampão citrato pH 3,5 (2 mM) e caldo RPMI pH 3,5 (10^6 células ml^{-1}) foram expostas ao jato de plasma MC durante 5 minutos. Contudo, não foi observada diferença significativa entre os grupos expostos ao jato de plasma e seus respectivos controles ($p > 0,05$, Mann-Whitney Test) conforme pode ser observado na figura 6.

Figura 6 - Valores de UFC ml^{-1} (mediana e intervalo) de suspensões expostas ao jato de plasma durante 5 minutos

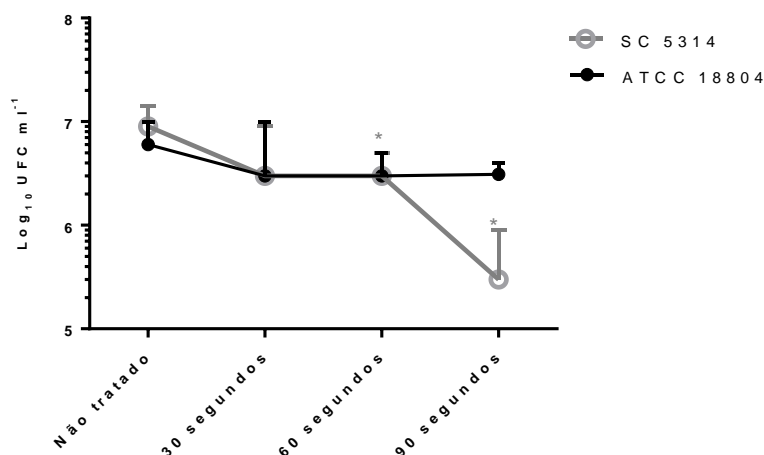


Legenda: NT: controle não tratado; TC: tampão citrato 2 mM.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Visto que não houve redução na viabilidade celular de *C. albicans* após exposição ao jato de plasma utilizando-se a metodologia proposta inicialmente, novos testes foram executados expondo menor volume de suspensão de *C. albicans* (150 μL) e diminuindo a distância entre a saída do jato e a superfície do líquido (1,5 cm).

Para a cepa ATCC 18804, não houve diferença significativa entre as suspensões expostas ou não ao jato de plasma MC (Figura 7). Contudo, para a cepa SC 5314, 60 e 90 segundos de exposição ao jato de plasma induziram redução significativa na contagem de UFC ml^{-1} quando comparado ao controle não tratado ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis/Dunn).

Figura 7 - Valores de UFC ml⁻¹ em suspensões expostas ao jato de plasma (mediana e intervalo) durante 30, 60, e 90



Legenda: *Diferença estatística entre grupos tratado e não-tratado.
Fonte: Elaborado pelo autor.

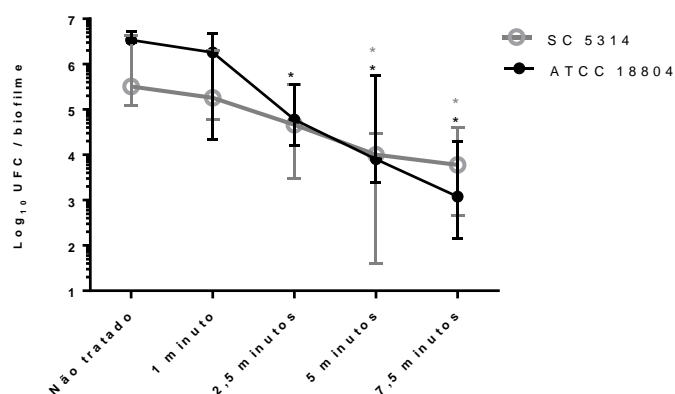
4.1.4 Efeito do jato de plasma (MC) sobre biofilmes monoespécie de *C. albicans*

Os biofilmes formados por *C. albicans* ATCC18804 mostraram-se mais sensíveis ao jato de plasma MC quando comparado àqueles formados pela cepa SC 5314. Houve redução significativa na contagem de células viáveis após 2,5 minutos de exposição ao jato de plasma MC comparando-se ao controle não exposto ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis/Dunn). Após 7,5 minutos de exposição foi possível observar redução de aproximadamente 1000 vezes no número de células viáveis (Figura 8).

Biofilmes de *C. albicans* SC 5413 também apresentaram redução significativa na contagem de células viáveis após exposição ao jato de plasma a partir de 5 minutos ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis/Dunn). Após 7,5 minutos de exposição, houve uma redução de aproximadamente 100 vezes na contagem celular comparando-se ao grupo não exposto ao jato (Figura 8).

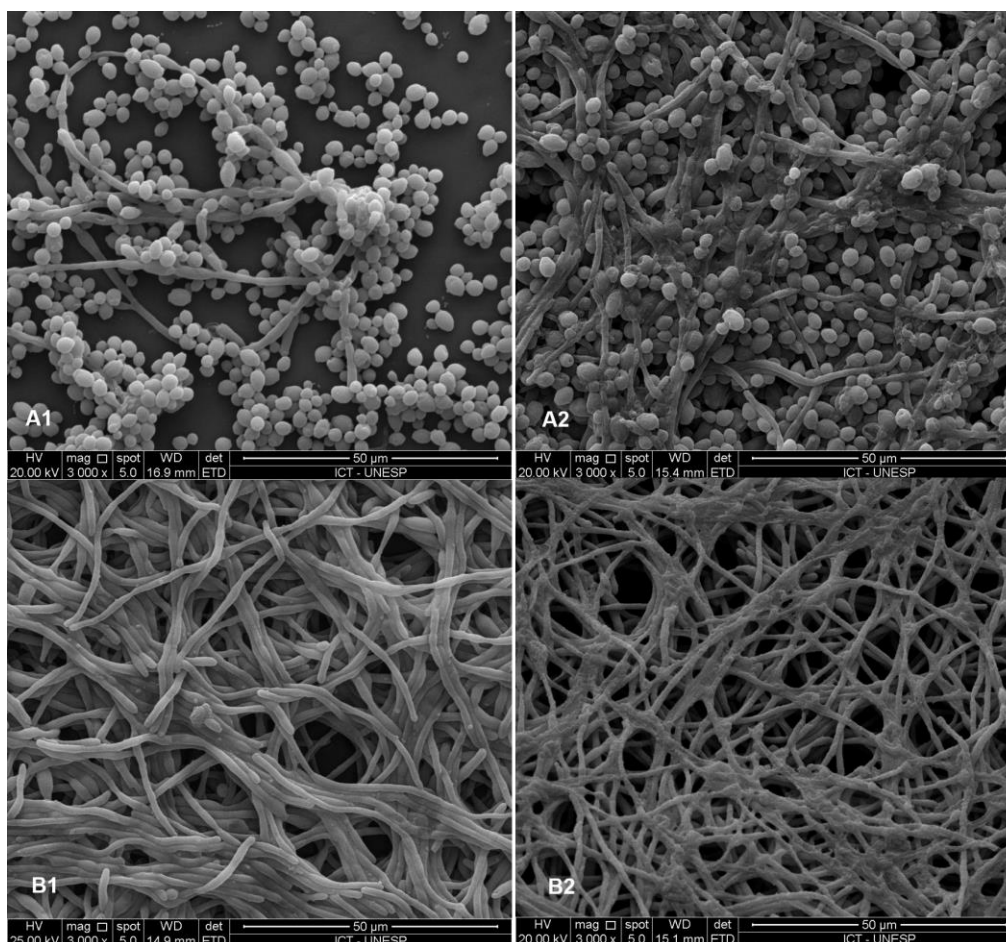
Através das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 9) foi possível observar que o jato de plasma afeta a estrutura celular de *C. albicans*. A exposição ao jato de plasma resultou em alteração na parede celular tanto em leveduras como em hifas, enquanto células não expostas ao jato de plasma aparecem com estrutura íntegra.

Figura 8 - Valores de UFC/biofilme de *C. albicans* (mediana e intervalo) após exposição ao jato de plasma MC de 1 a 7,5 minutos



Legenda: *Diferença significativa entre os grupos expostos e não exposto ao jato de plasma MC.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Microscopia Eletrônica de Varredura de biofilmes de *C. albicans* exposta ao jato de plasma MC



Legenda: (A1): ATCC 18804 não exposta do jato de plasma; (A2): ATCC 18804 exposta ao jato de plasma durante 7,5 minutos. (B1): SC 5314 não exposta ao jato de plasma; (B2): exposta ao jato de plasma MC 7,5 minutos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.5 Análise do efeito do jato de plasma (MC) sobre a parede celular de *C. albicans*

O ensaio de proteção pelo sorbitol, que avalia dano na parede celular fúngica através da análise visual de inibição de crescimento, foi realizado com caspofungina e apontou a eficiência do teste, visto que, após 2 e 7 dias de incubação, a concentração inibitória mínima de crescimento fúngico na presença de sorbitol foi maior do que sua ausência (Quadro 2).

Contudo, quando o teste foi realizado com inóculo exposto ao jato de plasma, o tempo de 90 segundos apresentou diminuição do crescimento quando comparado ao controle não exposto ao jato de plasma, tanto na ausência quanto em presença Sorbitol.

Quadro 2 - Concentração mínima de caspofungina ($\mu\text{g ml}^{-1}$) e tempo de exposição ao jato de plasma (s) na presença e ausência de sorbitol (0,8 M) necessárias para reduzir o crescimento de *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5413

| | 2 dias | | 7 dias | |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | + Sorbitol | - Sorbitol | + Sorbitol | - Sorbitol |
| Jato de plasma | | | | |
| <i>C. albicans</i> ATCC 18804 | - | - | - | - |
| <i>C. albicans</i> SC 5314 | 90 | 90 | 90 | 90 |
| Caspofungina | | | | |
| <i>C. albicans</i> ATCC 18804 | 6,2 | 1,5 | 6,2 | 1,5 |
| <i>C. albicans</i> SC 5314 | 3,1 | 1,5 | 3,1 | 1,5 |

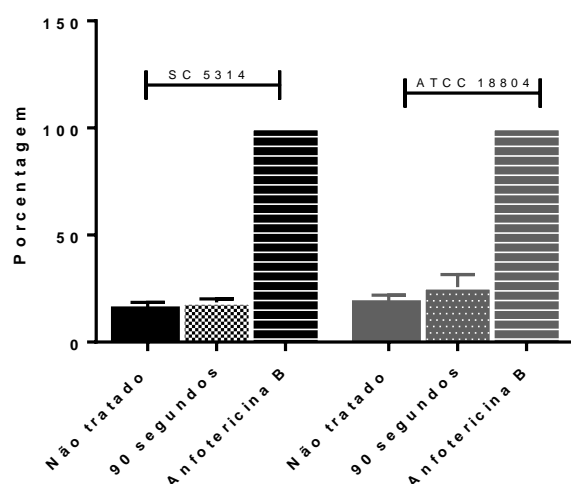
(-): não foi possível observar redução visual no crescimento fúngico.

4.1.6 Efeito do jato de plasma (MC) na integridade da membrana celular

A avaliação da integridade da membrana de *C. albicans* 2 horas após exposição de suspensão de *C. albicans* ao jato de plasma foi realizada através da identificação da perda de material intracelular com auxílio de um espectrofotômetro ($\lambda = 260 \text{ nm}$). Visto que Anfotericina B causa danos na membrana celular fúngica e conseqüentemente extravasamento de conteúdo intracelular, os valores de

absorbância do grupo exposto a essa molécula ($13 \mu\text{g ml}^{-1}$) forma considerados com 100 % de extravasamento. Conforme pode ser observado na figura 10, não houve diferença significativa na quantidade de conteúdo intracelular liberado no meio entre o grupo exposto ao jato de plasma durante 90 segundos e o grupo não exposto para ambas as cepas estudadas ($p > 0,05$; Kruska-Wallis/ Dunn). Esse resultado indica que a exposição ao jato de plasma não afeta a estrutura da membrana celular de maneira a resultar em perda de material intracelular.

Figura 10 - Porcentagem de conteúdo intracelular liberado no meio de cultura (mediana e intervalo) por *C. albicans* ATCC 18804 e SC 5314 após 90 segundos de exposição ao jato de plasma



Fonte: Elaborado pelo autor.

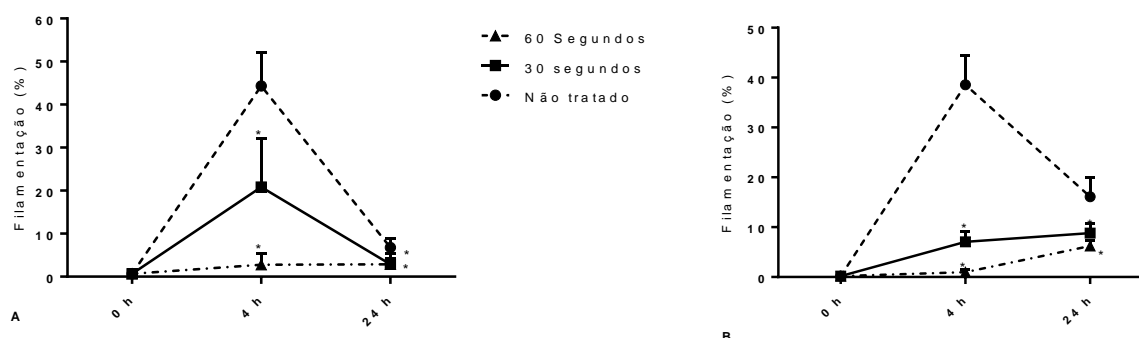
4.1.7 Efeito do jato de plasma (MC) sobre a morfogênese de *C. albicans* (transição levedura-hifa)

Após 4 horas de incubação em caldo RPMI ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), as suspensões de *C. albicans* ATCC 18804 não exposta ao jato de plasma apresentaram 44 % das células na forma filamentosa (hifa). Contudo, suspensões expostas ao jato de plasma durante 30 e 60 segundos continham 20 e 2 % das células na forma filamentosa, respectivamente (Figura 11A). Após 4 horas de incubação, 38 % das células de *C. albicans* SC 5314 estavam na forma filamentosa enquanto no grupo exposto ao jato de plasma durante 30 e 60 segundos 7 e 0.9 % das células estavam

na forma filamentososa, respectivamente (Figura 11B). Assim foi possível observar que para ambas as cepas, a porcentagem de filamentação reduziu significativamente após exposição ao jato de plasma por 30 e 60 segundos quando comparado ao controle não exposto ($p < 0,0001$; ANOVA/Dunnet's Multiple Comparisons Test).

Após 24 horas de incubação, a porcentagem de filamentação reduziu tanto nos grupos expostos quanto nos grupos não expostos ao jato de plasma. Contudo, para a cepa SC 5314 a porcentagem continuou significativamente menor quando comparada ao grupo não exposto ao jato de plasma ($p > 0,0004$; ANOVA/Dunnet's Multiple Comparisons Test).

Figura 11 - Porcentagem de filamentação (média e desvio padrão) de suspensões de *C. albicans* expostas ou não ao jato de plasma



Legenda: ATCC 18804 (A) e SC 5314 (B). *Diferença significativa entre os grupos expostos e não exposto ao jato de plasma MC.

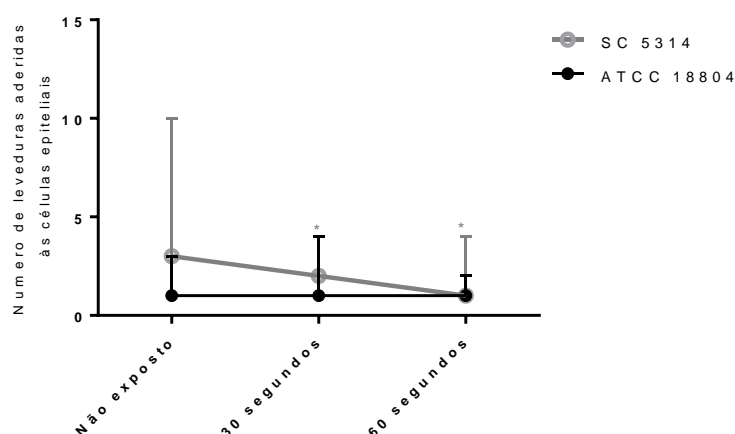
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.8 Ação sobre a aderência de *Candida albicans* às células epiteliais bucais

A avaliação do efeito do jato de plasma MC sobre a aderência de *C. albicans* SC5314 às células epiteliais bucais mostrou que, após 30 e 60 segundos de exposição, as leveduras apresentaram potencial reduzido de aderir às células epiteliais bucais quando comparado ao grupo não exposto ao jato de plasma ($p < 0,01$; Kruskal-Walis/Dunn). Contudo, os resultados indicaram que o potencial de aderência de *C. albicans* ATCC 18804 não foi afetado pela exposição ao jato de

plasma após 30 ou 60 segundos ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis/Dunn), conforme pode ser observado na figura 12.

Figura 12 - Influência do jato de plasma MC no número de leveduras aderidas às células epiteliais bucais



Legenda: *Diferença significativa entre os grupos expostos e não exposto ao jato de plasma MC.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.9 Efeito do jato de plasma (MC) sobre a produção das enzimas protease e fosfolipase

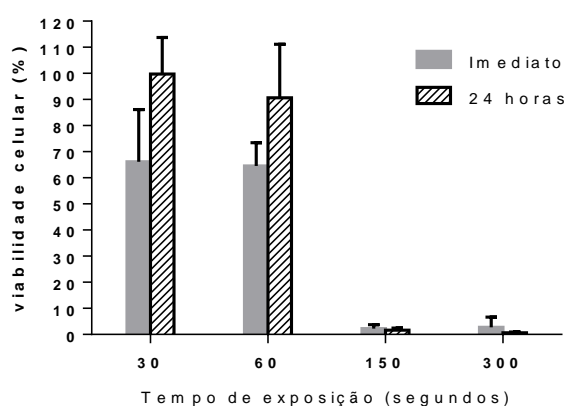
C. albicans ATCC 18804 não exposta ao jato de plasma apresentou atividade moderada ou alta de fosfolipase e protease ($Pz < 0,74$) de acordo com Mattei et al. (2013). Os grupos expostos ao jato de plasma durante 30 e 60 segundos também apresentaram atividade moderada ou alta. Os mesmos resultados foram observados para *C. albicans* SC 5314 expostas ou não ao jato de plasma, indicando que o mesmo não afeta secreções ou a atividade das enzimas estudadas.

4.1.10 Citotoxicidade do jato de plasma (MC) sobre células epiteliais

O efeito citotóxico do jato de plasma MC variou de acordo com o tempo de exposição, conforme pode ser observado na figura 13. As células expostas ao jato

de plasma durante 30 e 60 segundos apresentaram viabilidade de aproximadamente 70 % e significativa capacidade de regeneração após 24 horas de incubação em meio DMEM (aproximadamente 100 % de viabilidade). Contudo as células expostas ao jato de plasma MC durante 2,5 e 5 minutos apresentaram viabilidade inferior a 20 % imediatamente após a exposição ao jato de plasma e após 24 horas de incubação. Esses resultados indicam que o jato de plasma apresenta efeito pouco tóxico para células epiteliais quando essa são expostas durante períodos efetivos para inibir fatores de virulência de *C. albicans*. No entanto, tempos de exposição capazes de afetar a viabilidade de biofilmes de *C. albicans* apresentaram potencial altamente tóxico para as células epiteliais.

Figura 13 - Efeito citotóxico do jato de plasma MC



Fonte: Elaborado pelo autor.

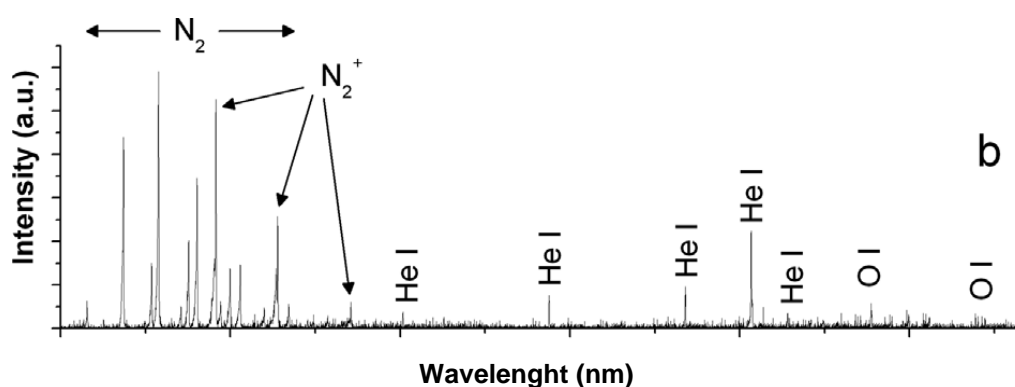
A alta citotoxicidade do jato de plasma MC fornece indício que o dispositivo pode ocasionar danos as células do hospedeiro. Dessa forma, foi necessário o estudo de outro modo de tensão para o jato de plasma, buscando parâmetros seguros para a avaliação dos efeitos do jato no tratamento de candidose bucal induzida em modelo murino.

4.2 Efeito antifúngico do jato de plasma em modo de tensão pulsado (MP) sobre culturas de *Candida albicans*

4.2.1 Caracterização do jato de plasma (MP)

O espectro de emissão óptica do jato de plasma MP apresentou picos de nitrogênio, sendo em sua maioria linhas de N_2 e N_2^+ . A presença de picos de oxigênio atômico foi também detectada, evidenciando a existência de espécies reativas de oxigênio na zona de tratamento.

Figura 14 - Espectro de Emissão Óptica do jato de plasma MP



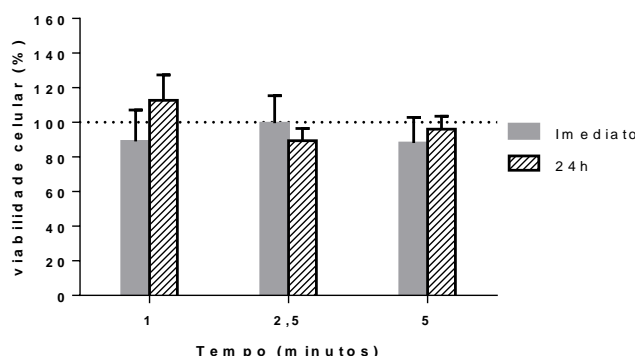
Legenda: N: nitrogênio, He: hélio, O: oxigênio.

Fonte: Kostov et al. (2015b).

4.2.2 Citotoxicidade do jato de plasma (MP)

Devido à toxicidade do jato de plasma MC a partir de 2,5 minutos, avaliou-se o potencial citotóxico do jato de plasma MP entre 1 e 5 minutos de exposição. Foi possível observar a viabilidade celular imediatamente após exposição ao jato de plasma foi de aproximadamente 100%. A capacidade proliferativa também foi mantida, uma vez que após 24 horas de incubação a viabilidade celular manteve-se próxima a 100% (Figura 14).

Figura 14 - Percentagem de viabilidade celular após 1; 2,5 e 5 minutos (média \pm desvio padrão) imediatamente e após 24 horas da exposição ao jato de plasma MP



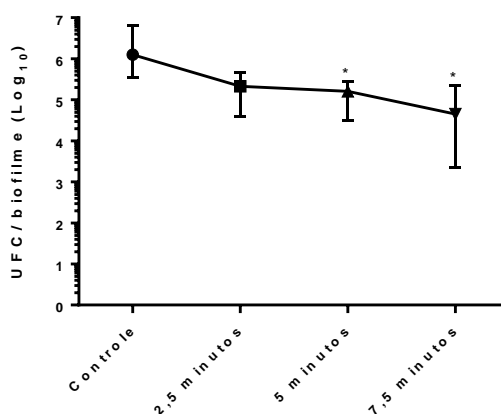
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.3 Efeito do jato de plasma (MP) sobre biofilmes de *C. albicans*

Visto que o jato de plasma MP apresentou baixa citotoxicidade quando comparado ao jato de plasma MC, foi avaliado seu efeito sobre biofilme de *C. albicans* ATCC 18804, cepa a ser utilizada no ensaio *in vivo*.

Conforme pode ser observado na figura 15, a exposição ao jato de plasma MP durante 5 e 7,5 minutos reduziram significativamente a viabilidade de células de *C. albicans* no biofilme quando comparado ao controle não tratado (Kruskal-Wallis/Dunn's multiple comparisons test; $p = 0,0033$).

Figura 15 - UFC/ biofilme de *C. albicans* ATCC 18804 (mediana e intervalo) expostos ao jato de plasma em diferentes tempos



Legenda: * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos expostos e não exposto ao jato de plasma MP.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4 Efeito do jato de plasma (MP) no tratamento de lesões de candidose oral induzida em modelo murino

A partir desses resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, o jato de plasma MP foi selecionado para o tratamento de lesões de candidose bucal induzida em modelo murino, visto que apresentou efeito anti-*Candida* e baixa citotoxicidade.

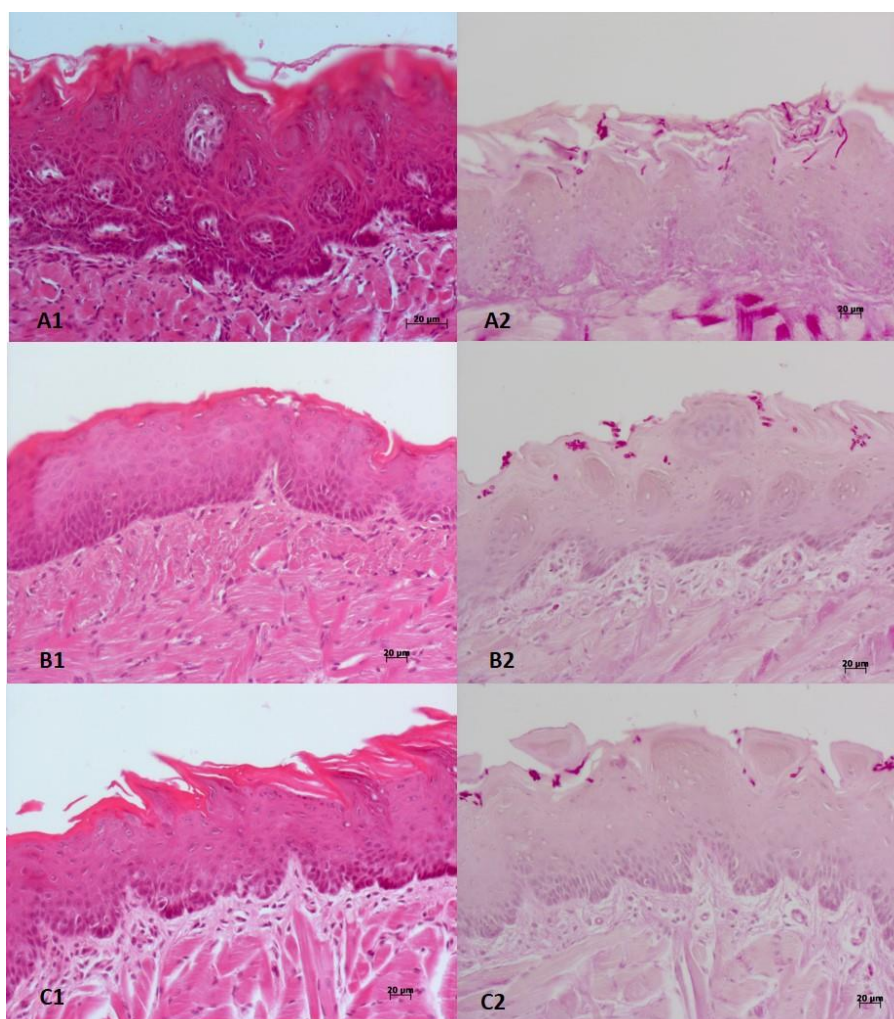
Os cortes histológico corados com HE pertencentes ao grupo não tratado (Figura 16) cujos animais foram sacrificados em 24 horas (D10) apresentam, em algumas regiões, o epitélio que recobre o dorso lingual hiperplásico e, por vezes, hiperqueratinizado, sendo que o aspecto papilar frequentemente desaparece nessas regiões e é possível visualizar alterações epiteliais inflamatórias associadas ou não (degeneração hidrópica, espongirose, desorganização da camada basal, exocitose e microabscesso intraepitelial), caracterizando lesões de candidose bucal, que podem ser conferidas nas lâminas coradas por PAS. As áreas de lesão epitelial por *Candida* são mais extensas e mais frequentes em comparação com os demais grupos. Sob o epitélio, pode-se encontrar intenso infiltrado inflamatório misto, predominantemente polimorfonuclear que se infiltra por entre as fibras musculares para a profundidade do tecido. No terço anterior da língua, onde há conjuntivo mais frouxo, o infiltrado é mais evidente e vasos congestos podem ser vistos (Figura 16A).

Cortes histológicos da língua de animais sacrificados 24 horas após a última aplicação do jato de plasma MP (5 minutos) mostraram características inflamatórias correspondentes a lesão leve causada por *Candida*, e que foram confirmadas nas lâminas coradas por PAS. Nas áreas de lesão foram encontradas alterações como exocitose e degeneração hidrópica e, por vezes, áreas de hiperplasia. Áreas de espongirose, múltiplas áreas de exocitose, desorganização da camada basal do epitélio, microabscesso intraepitelial e infiltrado inflamatório subepitelial intenso, foram encontrados em apenas 1 animal. Diferentemente do grupo controle, foi encontrado infiltrado inflamatório moderado mononuclear, com marcante presença de macrófagos, porém raros polimorfonucleares (Figura 16B).

Os cortes histológicos do grupo tratado com nistatina e sacrificado após 24 horas do último tratamento apresentam áreas características de lesão por *Candida*, tanto de HE como PAS, porém tem aspecto inflamatório mais brando comparado ao controle. Nas áreas acometidas, pode-se notar hiperplasia epitelial acompanhada

por hiperqueratose, perda da característica papilar (epitélio retificado, sem projeções) e exocitose. Ainda, nota-se moderado infiltrado inflamatório subepitelial misto, com predomínio de polimorfonucleares (Figura 16C).

Figura 16 - Cortes histológicos corados por Hematoxilina/Eosina (HE) e Periódico Ácido de Schiff (PAS) analisados em microscópio óptico em aumento de 200 x.



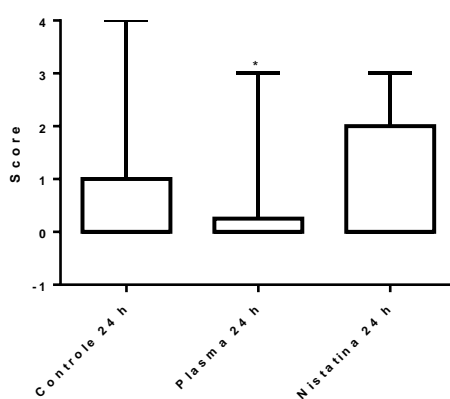
Legenda: HE. (1) e PAS (2) nos grupos não tratado (A), tratado com jato de plasma MP (B) e tratado com nistatina (C) sacrificados 24 horas após o tratamento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Aos cortes corados com PAS, foram atribuídos escores de acordo com a quantidade de hifas invadindo o epitélio. Na figura 17 é possível observar que houve número significativamente menor de hifas no grupo exposto ao jato de plasma quando comparado ao controle não exposto ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis/Dunn).

Contudo, não houve diferença significativa no número de hifas entre os grupos controle não tratado e grupo tratado com nistatina ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis/Dunn). Ainda, observa-se que o grupo exposto ao jato de plasma apresenta número significativamente menor de hifas quando comparado ao grupo tratado com nistatina ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis/Dunn).

Figura 17 - Distribuição dos scores correspondentes aos campos histológicos analisados nos grupos experimentais após 24 horas (n = 210)



Legenda: *Diferença significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

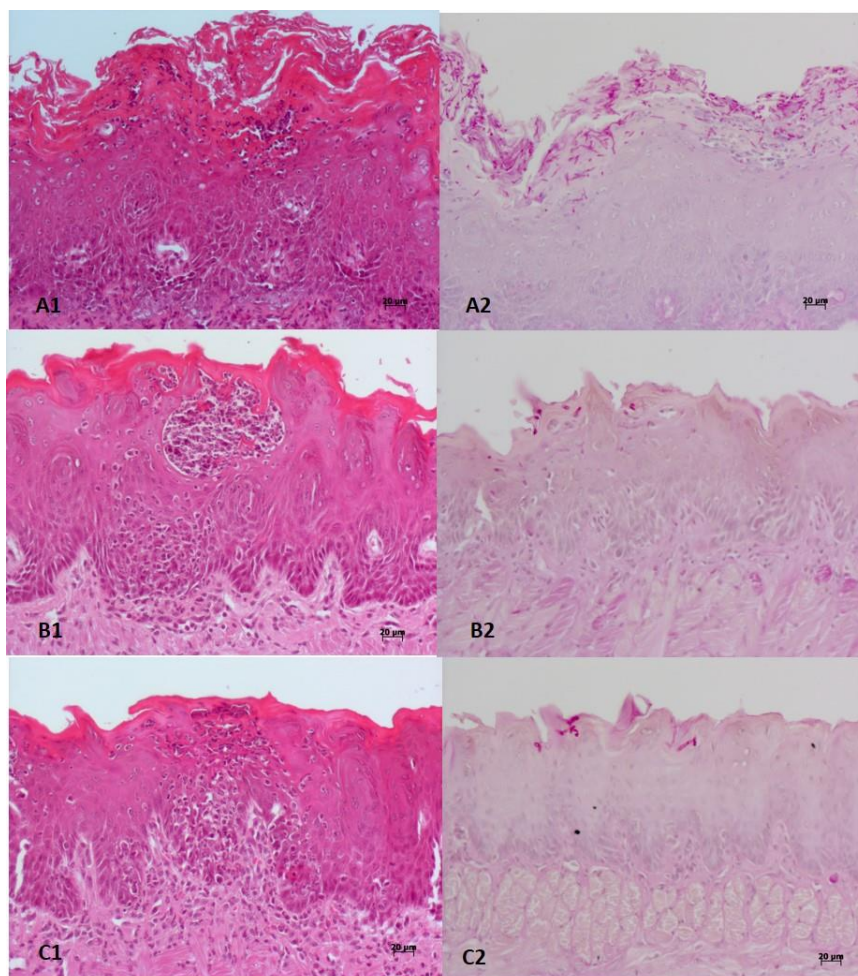
Os cortes histológicos do grupo não tratado cujos animais foram sacrificados com 48 horas mostram características semelhantes às do controle 24 horas, porém tanto a área como intensidade da lesão se mostram aumentados, sendo comum em todos os cortes analisados, a combinação de alterações epiteliais e celulares (hiperplasia celular e alteração da relação núcleo/citoplasma). A perda das papilas linguais e presença de microabscessos intraepiteliais foram mais comuns no grupo 48 horas. Sob o epitélio de recobrimento das regiões de lesão por *Candida*, o tecido conjuntivo aparece permeado por intenso infiltrado inflamatório misto que se dispersa para a profundidade, por entre as fibras musculares. Dentre as células inflamatórias, além de polimorfonucleares, é comum a presença de macrófagos (Figura 18A).

O quadro histológico das línguas de animais sacrificados 48 horas após a última aplicação do jato de plasma MP (5 minutos) foi muito semelhante ao do grupo

sacrificado 24 horas antes, porém mais animais demonstraram características de candidose intensa, como microabscesso, espongiose, exocitose intensa e intenso infiltrado inflamatório subepitelial misto, com predominância de células polimorfonucleares. Nas demais áreas, o infiltrado inflamatório presente disperso entre feixes musculares e conjuntivo do terço anterior da língua era predominantemente mononuclear, com comum presença de macrófagos, contrastando com o infiltrado misto, com muitos polimorfonucleares, nos demais grupos (Figura 18B).

Os cortes histológicos do grupo tratado com nistatina e sacrificado após 48 horas do último tratamento mostraram-se com alterações inflamatórias importantes nas áreas de lesão por *Candida*, com marcante hiperplasia epitelial, perda de papila lingual e formação de microabscessos intraepiteliais. No entanto, quando comparado ao controle, a extensão e quantidade de áreas acometidas foi menor. Na região de tecido conjuntivo, é possível notar moderado infiltrado inflamatório misto disperso, alguns pequenos vasos congestos e, mais posteriormente, esse infiltrado se difunde por entre os feixes colágenos. O infiltrado inflamatório mostra-se semelhante ao do grupo tratado com plasma MP, que apesar de misto, tem predominância de células mononucleares, especialmente macrófagos (Figura 18C).

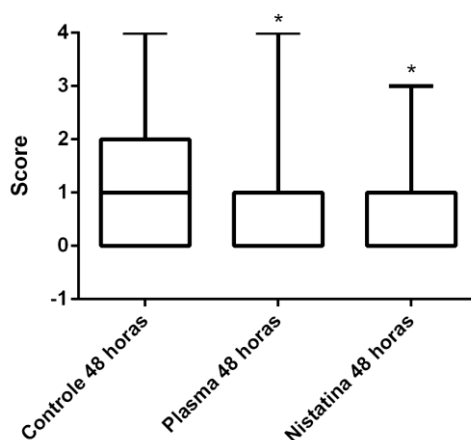
Figura 18 - Cortes histológicos corados por Hematoxilina/Eosina (HE) e Periódico Ácido de Schiff (PAS) analisados em microscópio óptico em aumento de 200 x.



Legenda: HE. (1) e PAS (2) nos grupos não tratado (A), tratado com jato de plasma MP (B) e tratado com nistatina (C) sacrificados 48 horas após o tratamento.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Aos cortes corados com PAS analisados em cada animal 48 horas após o último tratamento (D11), foi possível observar que houve número significativamente menor de hifas no grupo exposto ao jato de plasma e grupo tratado com nistatina quando comparado ao controle não exposto ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis/Dunn). No entanto, não houve diferença no número de hifas entre os grupos tratado com plasma e nistatina ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis/Dunn), conforme ilustrado na figura 19.

Figura 19 - Distribuição dos scores dos campos histológicos analisados nos grupos experimentais após 48 horas (n = 210)

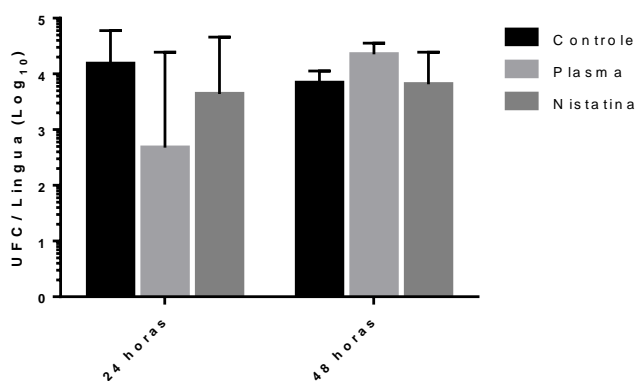


Legenda: *Diferença significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise microbiológica através da contagem de UFC dos grupos submetidos a eutanásia após 24 horas do último tratamento, mostraram que não houve diferença significativa entre o grupo não tratado e os grupos tratados com plasma ou nistatina, conforme pode ser observado na figura 20 ($p = 0,3201$; Kruskal-Wallis/Dunn multiple comparisons test). O mesmo foi observado dentre os grupos submetidos a eutanásia após 48 horas do último tratamento ($p = 0,0616$; Kruskal-Wallis/Dunn multiple comparisons test).

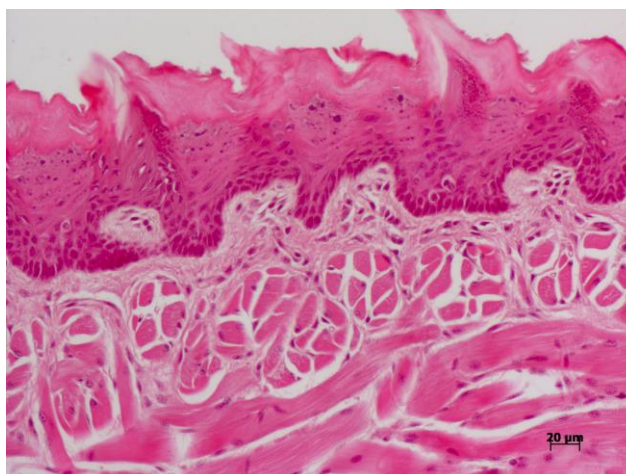
Figura 20 - Contagem de UFC (mediana com intervalo) na língua de animais após 24 horas de tratamento com nistatina ou jato de plasma



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os cortes histológicos de animais expostos apenas ao jato de plasma MC, sem infecção, indicam que a exposição ao jato não trouxe qualquer alteração aos tecidos da língua. O epitélio mostra-se íntegro com contornos e camada bem definidos e a característica papilar do epitélio também foi mantida. O tecido conjuntivo aparece bem celularizado com poucas células inflamatórias mononucleares, não caracterizando infiltrado inflamatório. Os feixes de fibras musculares, glândulas salivares e apresentam-se dentro dos padrões de normalidade (Figura 21).

Figura 21 - Corte histológico corados por HE do grupo exposto ao jato de plasma MC sem infecção experimental por *C. albicans*



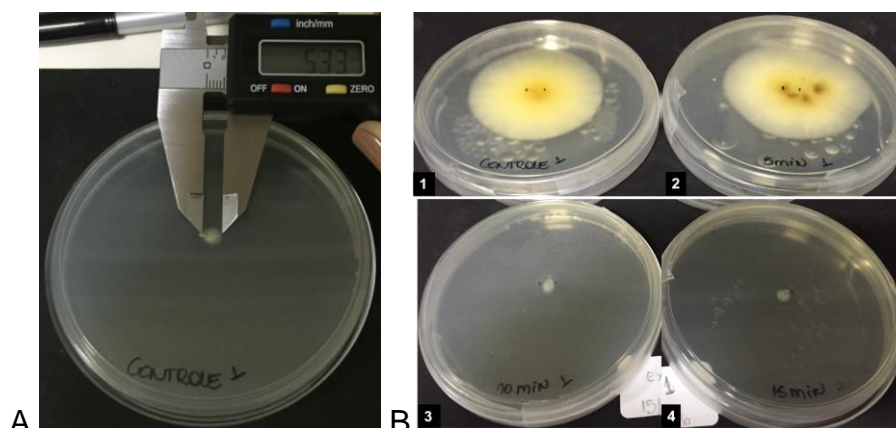
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Efeito antifúngico do jato de plasma (MP) sobre culturas de *T rubrum*

4.3.1 Inibição radial do micélio (conídeo germinado)

O efeito do jato de plasma sobre o crescimento radial do micélio de *T. rubrum* foi avaliado em cultura de conídeo germinado. A figura 22 ilustra o crescimento radial do micélio no dia da exposição ao jato de plasma (D0) e 15 dias após a exposição.

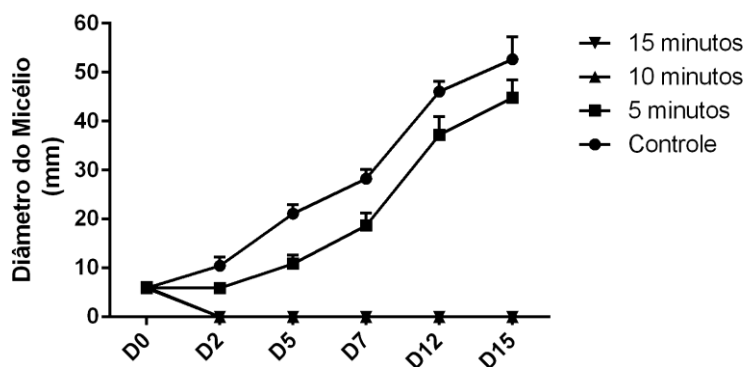
Figura 22 - Crescimento radial do micélio



Legenda: (A) Medida do diâmetro de crescimento de *T. rubrum* (mm) no dia da exposição ao jato de plasma. (B) Crescimento de *T. rubrum* 15 dias após exposição ao jato de plasma durante 5 (2), 10 (3) e 15 minutos (4). (1) Não exposto ao jato de plasma
Fonte: Elaborado pelo autor.

No dia do tratamento (D0), o valor médio de diâmetro de crescimento de *T. rubrum* foi $5,95 \pm 0,41$. A exposição ao jato de plasma durante 5 minutos inibiu parcialmente o crescimento radial do micélio durante 15 dias. Conforme ilustrado na figura 22, houve diferença significativa entre o grupo exposto ao jato de plasma durante 5 minutos e o grupo não exposto durante todo o período de avaliação do crescimento ($p < 0,0001$; Multiple t test). O crescimento radial do micélio foi completamente inibido após 10 e 15 minutos de exposição ao jato de plasma.

Figura 23 - Diâmetro do crescimento radial do micélio de *T. rubrum* 2, 5, 7, 12 e 15 dias após exposição ao jato de plasma durante 5, 10 e 15 minutos. O grupo controle não foi exposto ao jato de plasma



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2 Efeito do jato de plasma (MP) sobre conídios em suspensão

Para determinar o tempo de exposição inibitório mínimo, foi realizada a análise visual dos poços 24, 48, 72, 96 e 144 horas após incubação e os resultados estão apresentados no quadro 3.

Após 24 horas de incubação, apenas o grupo controle não exposto ao jato de plasma indicava crescimento de *T. rubrum*. O grupo exposto ao jato de plasma durante 5 minutos apresentou início de crescimento após 48 horas de incubação, sendo que após 96 horas de incubação apresentava crescimento similar ao controle não exposto ao jato de plasma.

O grupo exposto ao jato de plasma durante 10 minutos apresentou crescimento visível após 72 horas de incubação, sendo que após 144 horas apresentou crescimento moderado e menos intenso que o grupo controle não exposto ao jato de plasma.

A exposição ao jato de plasma durante 15 minutos inibiu o crescimento de *T. rubrum* em meio líquido até 144 horas após a incubação, apresentando crescimento discreto quando comparado ao grupo não exposto ao jato de plasma.

Para a anfotericina B e fluconazol, concentração igual a 1 µg / ml inibiu visivelmente o crescimento de *T. rubrum* até 144 horas de incubação.

Quadro 3 - Avaliação visual do crescimento de *T. rubrum* em meio RPMI

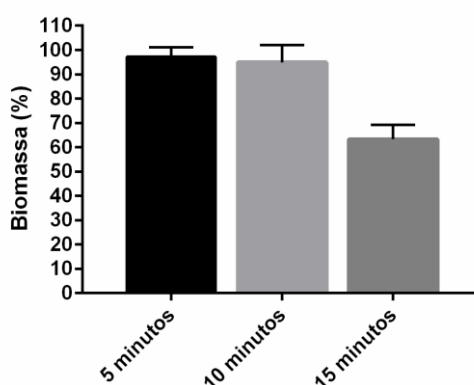
| | CONTROLE* | 5 MINUTOS | 10 MINUTOS | 15 MINUTOS |
|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| 24 HORAS | + | - | - | - |
| 48 HORAS | ++ | + | - | - |
| 72 HORAS | +++ | ++ | + | - |
| 96 HORAS | +++ | +++ | + | - |
| 144 HORAS | +++ | +++ | ++ | + |

Legenda: +: pouco crescimento (turvação); ++: médio crescimento (turvação); +++: crescimento intenso; -: ausência de crescimento. *Controle não exposto ao jato de plasma.

4.3.3 Inibição da produção de biomassa

O efeito do jato de plasma sobre suspensão de conídios de *T. rubrum* também foi avaliada através da quantificação de biomassa. A figura 23 mostra que, após 6 dias de incubação a 28 ± 2 °C, apenas os conídios expostos ao jato de plasma durante 15 minutos apresentaram menor capacidade de crescimento. Esse efeito está expresso pela produção de em média 60 % da biomassa comparado ao controle não exposto ao jato de plasma (100 % de biomassa).

Figura 24 - Efeito do jato de plasma sobre a produção de biomassa (%) comparado ao controle não exposto ao jato de plasma

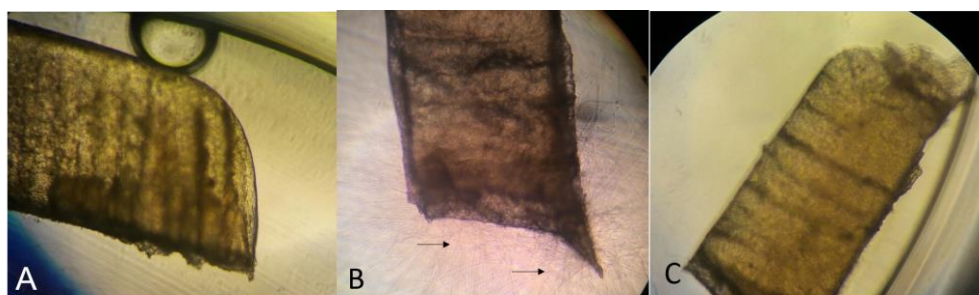


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.4 Efeito do jato de plasma (MP) sobre dermatófitos em modelo *ex vivo* de unha

Este ensaio avaliou o efeito do jato de plasma sobre a capacidade de aderência de conídios de *T. rubrum* em fragmentos de unha. Foi possível observar que na suspensão não exposta ao jato de plasma, os conídios foram capazes de germinar e infectar os fragmentos de unha avaliados após 5 dias de incubação. Nas suspensões expostas ao jato de plasma durante 10 e 15 minutos, os conídios não foram capazes de infectar os fragmentos de unha (Figura 25).

Figura 25 - Fragmentos de unha após contato com suspensões de *T. rubrum* expostos ou não ao jato de plasma observados em microscópio de luz invertido



Legenda: Fragmento de unha infectado 5 dias após adição de conídios não expostos ao jato de plasma (B), expostos durante 10 minutos (A) e 15 minutos (C). As setas indicam a presença de filamentos de *T. rubrum*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Estudos anteriores apontam para uma promissora aplicação do plasma atmosférico para o tratamento de infecções fúngicas (Yamazaki et al., 2011; Sun P et al., 2011; Fricke et al., 2012; Sun Y et al., 2012, Heinlin et al., 2013). Contudo, esses estudos não apresentam informações sobre o modo de ação do jato de plasma e sua influência sobre os fatores de virulência desses micro-organismos. A toxicidade para células humanas também tem sido pouco explorada. O presente estudo avaliou um dispositivo gerador de jato de plasma de Hélio (He), desenvolvido na Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG – UNESP), quanto a sua atividade frente a *C. albicans* em culturas planctônicas e biofilme, além de investigar a influência do jato de plasma sobre alguns fatores de virulência assim como possíveis alvos da ação antifúngica. Adicionalmente, avaliou-se o efeito do jato de plasma sobre *Trychophyton rubrum* e seu efeito sobre sua infectividade.

A espectroscopia de emissão óptica mostra que o jato de plasma em modo de tensão contínuo utilizados nesse estudo geram espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), moléculas consideradas importantes para o efeito antimicrobiano de jatos de plasma (Boekema et al., 2013, Lackmann JW, Bandow, 2014). Essas espécies são produzidas através da reação da pluma com moléculas do ar ambiente (O_2 , N_2 and H_2O). Em suspensão, o plasma pode interagir com a superfície do líquido gerando OH^\cdot e H_2O_2 devido à dissociação da água com o impacto de elétrons (Norberg et al., 2014, Wende et al., 2015).

A triagem inicial da atividade antifúngica do jato de plasma MC foi realizada através da avaliação da formação de zona de inibição de crescimento. Por se tratar de uma metodologia simples, este método é muito utilizado para identificar a atividade de jatos de plasma contra diversos micro-organismos (Goree et al., 2006; Alkawareek et al., 2012a, 2012b). Neste estudo foi possível observar a influência da distância de aplicação do jato de plasma na atividade antifúngica, uma vez que a diminuição da distância entre a saída do jato de plasma e a superfície do ágar resultou em aumento na zona de inibição do crescimento de *C. albicans*. Isso demonstra que o aumento da distância de aplicação dificulta o efeito das moléculas e íons gerados pelo jato de plasma, os quais provavelmente são responsáveis pela

atividade antimicrobiana. Ainda, observou-se que distâncias menores 1,5 cm não foram seguras para aplicação do jato de plasma sobre o ágar, pois danificaram a superfície do meio de cultura. Através desse ensaio também foi possível observar que o aumento do tempo de exposição ao jato de plasma resulta no aumento das zonas de inibição do crescimento de *C. albicans*. Essa relação também foi observada em estudos com outros micro-organismos (Alkawareek et al., 2012a, 2012b). Embora as triagens iniciais tenham sido feitas com cepas de referência de *C. albicans*, isolados clínicos foram também avaliados nos ensaios de zona de inibição de crescimento para verificação da variabilidade intraespécie de resposta ao efeito antimicrobiano do jato de plasma. Observou-se que três isolados clínicos apresentaram zonas de inibição de crescimento maiores que os demais isolados e cepas de referência com a exposição ao jato de plasma nas mesmas condições, indicando possível variabilidade intraespécie.

O efeito do jato de plasma sobre suspensões microbianas difere de acordo com o líquido presente. Boekema et al. (2013) observaram que plasma de Argônio aplicado em soluções básicas e tamponados resultava em baixo efeito antimicrobiano. Yamazaki et al. (2011) observaram que efeito antimicrobiano do jato de plasma de Hélio foi melhor em soluções ácidas, sugerindo que o pH baixo contribui para a solubilidade de ERON. No presente estudo, o efeito do jato de plasma MC sobre *C. albicans* em suspensão foi inicialmente realizado baseando-se em metodologia proposta por Yamazaki e colaboradores (2011), onde foi observado que o efeito do jato de plasma na inativação de *C. albicans* suspensa em tampão citrato pH 3,5 foi maior que em outros valores de pH. Assim, o presente estudo avaliou a capacidade de inativação de *C. albicans* ATCC 18804 em tampão citrato pH 3,5 com distância de 2,5 cm entre a saída do plasma de e tempos variando entre 1 e 5 minutos, conforme descrito por Yamazaki et al. (2011).

Adicionalmente, avaliou-se também suspensões em caldo RPMI pH 3,5 e NaCl. Contudo, não houve redução na viabilidade de *C. albicans* em nenhuma das suspensões estudadas quando comparado ao grupo controle não exposto ao jato de plasma. Dessa forma, optou-se por utilizar metodologia baseada em estudo de Boekema et al. (2013), visto que esse grupo observou melhor efeito antibacteriano do jato de plasma em suspensões sem tamponamento como NaCl e água destilada. Assim 150 µL de suspensão de *C. albicans* em NaCl foram expostas ao jato de

plasma de 30 a 90 segundos a uma distância de 1,5 cm entre a saída do jato e a superfície do líquido. Pode-se observar que a diminuição do volume de suspensão associado à diminuição da distância de aplicação do jato de plasma tornou o tratamento eficiente, visto que foi observada diminuição na viabilidade *C. albicans* quando comparado ao controle não exposto ao jato de plasma. Assim, sugere-se que o volume da suspensão pode interferir no efeito antimicrobiano. De acordo com Norberg et al. (2014), as espécies reativas dentro da suspensão são determinadas pelas espécies geradas na pluma e por reações subsequentes com a superfície do líquido, assim como a capacidade de difusão no líquido.

A viabilidade de *C. albicans* ATCC 18804 em suspensão não foi afetada pela exposição ao jato de plasma, enquanto que a viabilidade da cepa SC 5314 foi significativamente reduzida a partir de 60 segundo de exposição. Dessa forma, mais uma vez foi possível observar que pode haver diferença na susceptibilidade ao jato de plasma entre diferentes cepas da mesma espécie.

A partir dos resultados obtidos em suspensões, classificou-se os tempos de 30 e 60 segundos como subinibitórios e conseqüentemente esses tempos foram selecionados para o estudo dos efeitos do jato de plasma sobre alguns fatores de virulência de *C. albicans*.

Os resultados sugerem que o jato de plasma MC utilizado neste estudo reduz a capacidade de adesão de *C. albicans* SC 5314 às células epiteliais bucais. Tal observação indica que o jato de plasma pode prejudicar uma etapa importante para a formação de biofilme e conseqüentemente infecções. A adesão de *Candida* às células epiteliais podem ocorrer através de interações entre receptores proteicos (adesinas) microbianos e receptores nas células epiteliais (Moyes et al., 2015). Visto que ROS reagir com proteínas causando oxidação de aminoácidos (Brothers et al., 2013), novos estudos serão necessários para investigar o mecanismo preciso pelo qual o jato de plasma afeta a capacidade de adesão de *C. albicans*.

Depois da adesão, a transição levedura-hifa e a secreção de enzimas facilitam a invasão tecidual no hospedeiro (Moyes et al., 2015). A filamentação é um fator de virulência importante de *C. albicans* que se atenuado reduz o potencial infeccioso do micro-organismo (Lu et al., 2014; Saville et al., 2006). No presente estudo, observou-se que o jato de plasma MC foi capaz de inibir a filamentação de ambas as cepas de *C. albicans*. Tal resultado é interessante, visto que o bloqueio da

transição levedura-hifa é considerado um alvo terapêutico promissor (Jacobsen et al., 2012).

A atividade de protease e fosfolipase não foi afetada pela exposição ao jato de plasma MC. Rahimi-Verki et al. (2016) observaram que houve redução na atividade enzimática de *C. albicans* ATCC 10231 após exposição ao jato de plasma de He/O₂ durante 90 segundos. Contudo diferenças no jato de plasma, na cepa estudada e no volume de suspensão dificultam a comparação entre os estudos.

Com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos de ação do jato de plasma sobre a célula de *C. albicans* alguns ensaios foram realizados. O ensaio de proteção pelo sorbitol estabelecido por Frost et al. (1995) tem como objetivo identificar danos causados na parede celular, uma vez de o sorbitol atua como osmoprotetor (na concentração de 0,8 M) aumentando o tempo da viabilidade celular após o dano. Este fato foi observado neste estudo através do uso do antifúngico caspofungina. Observou-se que a concentração inibitória mínima na presença de sorbitol foi maior que em sua ausência para ambas as cepas de referência de *C. albicans*. Contudo, quando o mesmo ensaio foi realizado com suspensões expostas ao jato de plasma MC não foi possível avaliar o efeito osmoprotetor do sorbitol, visto que o tempo de 90 segundos foi o maior tempo analisado e neste tempo foi observado redução no crescimento fúngico. Dessa forma, seria necessário aumentar o tempo de exposição ao jato de plasma para que fosse possível visualizar o efeito do sorbitol. Contudo, tempos maiores que 90 segundos resultam em considerável perda de volume da suspensão (> 25%) por isso não foram testados.

Para estudar se a exposição ao jato de plasma MC causa danos na membrana celular, suspensões de *C. albicans* expostas ou não ao jato de plasma foram analisadas através de espectrometria. Componentes celulares que absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm, como os nucleotídeos, indicam dano irreversível na membrana celular que leva a perda de conteúdo intracelular (Khan et al., 2013). Não houve diferença significativa entre os grupos exposto e não exposto ao jato de plasma.

Baseando-se nos resultados encontrados no presente estudo, pode se sugerir que efeito antifúngico do jato de plasma MC em suspensão não se deve a danos irreversíveis na parede e membrana celular. Dessa forma novos estudos

serão conduzidos para verificar se o mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de moléculas vitais ao micro-organismo.

Ao contrário do observado em suspensão, *C. albicans* ATCC 18804 em biofilme foi mais sensível ao jato de plasma MC do que a cepa SC 5314, visto que menor tempo de exposição foi necessário para reduzir a viabilidade celular. Sabe-se que as espécies reativas formadas por jatos de plasma em suspensão são diferentes daquelas formadas em meio semi-seco como o de biofilmes (O_3 , O, OH). Ainda, as células em biofilme são diretamente afetadas pelos componentes do jato de plasma, visto que não existe a coluna de líquido entre o jato e as células. A diferença na susceptibilidade intraespécie pode estar relacionada à morfologia das células em biofilme. As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram que biofilmes da cepa SC 5314 são predominantemente formados por uma rede de hifas, enquanto biofilmes formados pela cepa ATCC 18804 apresenta grande quantidade de leveduras.

O efeito do jato de plasma MC contra células de *C. albicans* em biofilmes foi visto a partir de 2,5 minutos de exposição. Sun Y et al. (2012) observaram que um microjato de plasma de He/O₂ inativou 100 % das células em biofilme após 60 segundos de exposição. Embora o tempo de exposição seja diferente do observado no presente estudo, as alterações morfológicas observadas em microscopia foram similares.

A comparação dos resultados obtidos em diferentes estudos deve considerar diferenças entre os dispositivos geradores de plasma como a fonte, o gás utilizado assim como seu fluxo e potência, pois esses parâmetros podem influenciar a geração de componentes com atividade antimicrobiana. Ehlbeck et al. (2011) aponta que a dificuldade de comparação dos resultados deve-se aos diferentes métodos aplicados e a pequenas variações nos dispositivos que podem alterar os resultados obtidos.

Visto que o presente estudo demonstrou o efeito antifúngico do jato de plasma, o efeito tóxico sobre as células do hospedeiro foi estudado através da toxicidade para células epiteliais. O jato de plasma MC apresentou baixa citotoxicidade quanto aplicado em tempos subinibitórios (30 e 60 segundos). Ainda após 24 horas de incubação, as células epiteliais apresentaram capacidade de regeneração, fenômeno observado em estudo anterior (Guerrero-Preston et al.,

2014). No entanto, a partir de 2,5 minutos de exposição ao jato de plasma MC, a viabilidade celular foi baixa.

Embora o jato de plasma MC tenha apresentado atividade antifúngica, sua alta citotoxicidade às células epiteliais apontou a necessidade do desenvolvimento de um jato de plasma mais seguro para tratamento de candidose *in vivo*. Dessa forma, os estudos foram conduzidos com o jato de plasma em modo pulsado (MP).

O jato de plasma MP também foi capaz de gerar RONS, conforme observado anteriormente, e afetar a viabilidade de *C. albicans* em biofilmes. Adicionalmente, a baixa citotoxicidade após 5 minutos de exposição indicou que o jato MP teria tolerabilidade tecidual aceitável (Matthes et al., 2013). Assim, o jato de plasma MP foi utilizado para o tratamento de candidose bucal em modelo murino.

Os resultados *in vivo* demonstram que não houve diminuição significativa na contagem de UFC de *C. albicans* após duas exposições a jato de plasma MP quando comparado ao controle não tratado. Contudo, a análise histológica indica redução no número de hifas invadindo o epitélio nos grupos expostos ao jato de plasma. Nos grupos analisados após 24 horas do último tratamento, o grupo exposto ao jato de plasma apresentou resultados melhores do que o grupo tratado com nistatina. Após 48 horas, tanto os animais expostos ao jato de plasma, quanto os animais tratados com nistatina apresentaram menor grau de invasão tecidual quando comparado ao grupo controle não tratado. Os cortes histológicos de animais expostos ao jato de plasma sem infecção por *C. albicans* mostraram que o jato de plasma não danifica a mucosa dorsal da língua, indicando boa tolerância tecidual e corroborando os resultados de baixa citotoxicidade *in vitro*.

Estudos anteriores também mostraram que o jato de plasma apresenta boa tolerabilidade tecidual. Daeschlein et al. (2012a) avaliaram o efeito de um jato de plasma de Argônio (kINPen 09, INP Greifswald) na redução da microbiota normal da pele em voluntários. Observou-se que 210 segundos de exposição ao jato de plasma foram suficientes para a descontaminação e o tratamento foi bem tolerado pelos voluntários quanto a dor e calor. Liu et al. (2011) avaliaram o efeito do jato de plasma de He/O₂ sobre a mucosa bucal e superfície ventral da língua de coelhos após 10 minutos de exposição. Os resultados apontaram que o jato de plasma poderia ser usado na mucosa bucal uma vez que não foi notada presença de úlceras, mucosite ou qualquer irritação na mucosa.

Além de estudar o efeito do jato de plasma MP sobre *C. albicans*, principal micro-organismo envolvido em infecções em mucosas, o presente trabalho avaliou o efeito do jato de plasma sobre culturas de *T. rubrum*, principal micro-organismo responsável por onicomicoses.

O jato de plasma MP foi capaz de inibir completamente o crescimento de culturas de conídios germinados de *T. rubrum* após 10 e 15 minutos. Heinlin et al. (2013) avaliaram o efeito de plasma sobre culturas de *T. rubrum* e observaram que um único tratamento por 5, 8 ou 10 minutos não foi suficiente para inibir o crescimento radial do micélio. No mesmo estudo foram necessárias 9 aplicações em dias diferentes para reduzir o crescimento fúngico.

O efeito do jato de plasma MP sobre conídios não germinados de *T. rubrum* foi avaliado através da exposição de suspensões ao jato de plasma. Através da análise visual foi possível observar que após 15 minutos de exposição ao jato de plasma, o crescimento e germinação dos conídios em suspensão ocorreu mais lentamente quando comparado ao controle. O mesmo efeito foi observado no ensaio de produção de biomassa.

Considerando que a aderência dos conídios aos tecidos é pré-requisito para o estabelecimento de infecções causada por dermatófitos (Baldo et al., 2012), o presente estudo buscou avaliar se a exposição ao jato de plasma afetaria a capacidade de adesão de *T. rubrum* a fragmentos de unha. Assim, foi possível observar que conídios expostos ao jato de plasma MP apresentaram menor capacidade de aderir aos fragmentos de unha. Contudo, outros estudos serão necessários para avaliar o mecanismo pelo qual o jato de plasma interfere na aderência de conídios de *T. rubrum*.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o jato de plasma de He utilizado apresenta efeito antifúngico contra dois principais micro-organismos envolvidos em micoses superficiais, *C. albicans* e *T. rubrum* em diferentes tempos de exposição, além de afetar importantes fatores de virulência como adesão e filamentação em *C. albicans* e adesão em *T. rubrum*. Ainda, foi possível concluir que o jato de plasma em modo contínuo apresenta acentuada citotoxicidade e que o jato de plasma em modo pulsado é mais indicado para a aplicação *in vivo*. Além de boa tolerância tecidual *in vivo*, o jato de plasma em modo pulsado mostrou-se tão eficaz quanto a nistatina na redução de invasão tecidual.

REFERÊNCIAS*

Ahmed R, Kharal SA, Durrani MA, Sabir M, Chang AH. Frequency of *Candida* in onychomycosis. J Pak Med Assoc. 2013;63(3):350-3.

Alkawareek MY, Algwari QT, Gorman SP, Graham WG, O'Connell D, Gilmore BF. Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the *in vitro* eradication of bacterial biofilms. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012a;65(2):381-4. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00942.x.

Alkawareek MY, Algwari QT, Lavery G, Gorman SP, Graham WG, O'Connell D, et al. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma. PLoS One. 2012b;7(8):e44289. doi: 10.1371/journal.pone.0044289.

Alkawareek MY, Gorman G, Graham WG, Gilmore BF. Potencial cellular targets and bacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. Int J Antimicrob Agents. 2014;43(2):154-60. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.08.022.

Ataides FS, Chaul MH, El Essal SE, Costa CR, Souza LK, Fernandes OF, et al. Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012 Dec;26(12):1479-85. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04315.x.

Baldo A, Monod M, Mathy A, Cambier L, Bagut ET, Defaweux V, et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. Mycoses. 2012;55(6):218-23. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02081.x.

Boekema BKHL, Hofmann F, van Ham BJT, Bruggeman PJ, Middelkoop E. Antibacterial plasma at safe levels for skin cells. J Phys D: Appl Phys. 2013;46(42):1-7. doi: 10.1088/0022-3727/46/42/422001.

Brothers KM, Gratacap RL, Barker SE, Newman ZR, Norum A, Wheeler RT. NADPH oxidase-driven phagocyte recruitment controls *Candida albicans* filamentous growth and prevents mortality. PLoS Pathog. 2013;9(10):1-17. doi: 10.1371/journal.ppat.1003634.

Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, Majumdar A, von Woedtke T, Haase H, et al. Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture. J Dtsch Dermatol Ges. 2012a;10(7):509-15. doi: 10.1111/j.1610-0387.2012.07857.x.

Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, von Woedtke T, Haase H, Niggemeier M, et al. Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. J Hosp Infect. 2012b;81(3):177-83. doi: 10.1016/j.jhin.2012.02.012.

da Silva LCF, Freitas RA, de Andrade MP, Piva MR, Martins-Filho PR, Santos TS. Oral lesions in renal transplants. *J Craniofac Surg.* 2012;23(3):214-8. doi: 10.1097/SCS.0b013e31824de388.

Dawson AL, Dellavalle RP, Elston DM. Infectious skin diseases: a review and needs assessment. *Dermatol Clin.* 2012;30(1):141-51. doi: 10.1016/j.det.2011.08.003.

de La Rosa-Garcia E, Miramontes-Zapata M, Sanches-Vargas SO, Mondragon-Padilha A. Oral colonization na infection by *Candida* sp. in diabetic and non-diabetic patients with chronic kidney disease on dialysis. *Nefrologia.* 2013;33(6):764-70. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2013.

Ehlbeck J, Schnabel U, Polak M, Winter J, von Woedtke TH, Brandenburg R, et al. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *J Phys D: Appl Phys.* 2011;44(1):1-33. doi: 10.1088/0022-3727/44/1/013002.

Etgeton S, Chassot F, Boer C, Donatti L, Svidzinsky T, Consolaro M. Influência da co-agregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* na capacidade de adesão destes microrganismos às células epiteliais vaginais humanas. *Acta Scientiarum.* 2011;33(8):1-8.

Fricke K, Koban I, Tresp H, Jablonowski L, Schroder K, Kramer A, et al. Atmospheric pressure plasma: a high-performance tool for the efficient removal of biofilms. *PLoS One.* 2012 Aug;7(8):e42539. doi: 10.1371/journal.pone.0042539.

Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J Antibiot (Tokyo).* 1995 Apr;48(4):306-10. doi: 10.7164/antibiotics.48.306.

Goree J, Liu B, Drake D, Stoffels E. Killing of *S. mutans* bacteria using a plasma needle at Atmospheric Pressure. *IEEE Trans Plasma Sci.* 2006;34(4):1317-24. doi: 10.1109/TPS.2006.878431.

Guerrero-Preston R, Ogawa T, Uemura M, Shumulinsky G, Valle, BL, Pirirni F, et al. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med.* 2014;34(4):941-6. doi: 10.3892/ijmm.2014.1849.

Gupta AK, Tu LQ. Therapies for onychomycosis: a review. *Dermatol Clin.* 2006 Jul;24(3):375-9. doi: 10.1016/j.det.2006.03.010.

Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skyn mycoses worldwide. *Mycosis.* 2008 Sep;51(4):2-15. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x.

Heinlin J, Maisch T, Zimmermann JL, Shimizu T, Holzmann T, Simon M, et al. Contact-free inactivation of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* by cold atmospheric plasma treatment. *Future Microbiol.* 2013 Sep;8(9):1097-106. doi: 10.2217/fmb.13.86.

Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(1):85-93. doi: 10.1586/eri.11.152.

Jain A, Jain S, Rawat S. Emerging fungal infections among children: A review on its clinical manifestations, diagnosis, and prevention. *J Pharm Bioallied Sci.* 2010;2(4):314-20. Doi: 10.4103/0975-7406.72131.

Jayatilake JA, Samaranayake LP. Experimental superficial candidiasis on tissue models. *Mycoses.* 2010 Jul;53(4):285-95. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01879.x.

Jayatilake JA, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. Candidal onychomycosis: a mini-review. *Mycopathologia.* 2009 Oct;168(4):165-73. doi: 10.1007/s11046-009-9212-x.

Jiang C, Schaudinn C, Jaramillo DE, Webster P, Costerton JW. *In Vitro* Antimicrobial Effect of a Cold Plasma Jet against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *ISRN Dent.* 2012;2012:295736. doi: 10.5402/2012/295736.

Joaquin JC, Kwan C, Abramzon N, Vandervoort K, Brelles-Mariño. Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? *Microbiology.* 2009;155(Pt 3):724-32. doi: 10.1099/mic.0.021501-0.

Joshi SG, Paff M, Friedman G, Fridman G, Fridman A, Ari D, et al. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am J Infect Control.* 2010;38(4):293-301. doi: 10.1016/j.ajic.2009.11.002.

Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. *AMB Express.* 2013;3(1):54. doi: 10.1186/2191-0855-3-54.

Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS. *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* oils inhibit virulence in *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus* spp. *Braz J Microbiol.* 2014;45(2):523-31.

Khosravi AR, Shokri H, Nikaein D, Mansouri P, Erfanmanesh A, Chalangari L, et al. Yeast as important agent in onychomycosis: in vitro activity of propolis against yeast isolated from patients with nail infection. *J Altern Complement Med.* 2013;19(1):57-62. doi: 10.1089/acm.2011.0722.

Kim B, Yun H, Jung S, Jung Y, Jung H, Choe W, et al. Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food Microbiol.* 2011;28(1):9-13. doi: 10.1016/j.fm.2010.07.022.

Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of Medical devices. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(2):255-67. doi: 10.1128/CMR.17.2.255-267.2004.

Kolb JF, Mohamed A-AH, Price RO, Swanson RJ, Bowman A, Chiavarini RL, et al. Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications. *Appl Phys Lett.*

2008;92(241501):1-3. doi: 10.1063/1.2940325.

Kostov KG, Borges AC, Koga-Ito CY, Nishime TMC, Prysiashnyi V, Honda RY. Inactivation of *Candida albicans* by Cold Atmospheric Pressure Plasma Jet. IEEE Trans Plasma Sci. 2015a;43:770-775.

Kostov KG, Nishime TMC, Machida M, Borges AC, Prysiashnyi V, Koga-Ito CY. Study of Cold Atmospheric Plasma Jet at the End of Flexible Plastic Tube for Microbial Decontamination. Plasma Processes Polym. 2015b;12(12):1383-1391. doi: 10.1002/ppap.201500125.

Lackmann JV, Schneider S, Edengeiser E, Jarzima F, Brinckmann S, Steinborn E, et al. Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. J R Soc Interfaces. 2013;10(89):20130591. doi: 10.1098/rsif.2013.0591.

Lackmann JW, Bandow JE. Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. Applied Microbiology and Biotechnology. 2014; 98(14):6205-13. doi: 10.1007/s00253-014-5781-9.

Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. Plasma interaction with microbes. New J Physics. 2003;5:41:1–10.

Laroussi M, Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasma at atmospheric pressure. Int J Mass Spectro. 2004;233:81-6. doi: 10.1016/j.ijms.2003.11.016.

Lewis JS, Graybill JR. Fungicidal versus Fungistatic: what's in a word? Expert Opin Pharmacother. 2008;9(6):927-35. doi: 10.1517/14656566.9.6.927.

Liu D, Xiong Z, Du T, Zhou, Cao Y, Lu X. Bacterial-killing effect of atmospheric pressure non-equilibrium plasma jet and oral mucosa response. J Huazhong Univ Sci Technol. 2011;31(6):852-6. doi: 10.1007/s11596-011-0690-y.

Lu X, Cao Y, Yang P, Xiong Q, Xiong G, Xian Y, et al. An RC Plasma device for sterilization of root canal of teeth. IEEE Trans Plasma Sci. 2009;37(5):668-73. doi: 10.1109/TPS.2009.2015454.

Lu Y, Su C, Liu H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. Trends Microbiol. 2014;22(12):707-14. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.001.

Martinez-Rossi NM, Peres NT, Rossi A. Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. Mycopathologia. 2016 Sep 2. [Epub ahead of print].

Matriccioni L, Talbot K, Jones S. Safety and efficacy of tinea pedis and onychomycosis treatment in people with diabetes: a systematic review. J Foot Ankle Res. 2011;4:26. doi: 10.1186/1757-1146-4-26.

Mattei AS, Alves SH, Severo CB, Guazzelli LDS, Oliveira FDM, Severo LC.

Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(3):340-2. doi: 10.1590/0037-8682-0045-2013.

Matthes R, Bender C, Schlüter R, Koban I, Bussiahn R, Reuter S, et al. Antimicrobial efficacy of two surface barrier discharges with air plasma against in vitro biofilms. PLoS One. 2013;8(7):1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0070462.

McCombs GB, Darby ML. New discoveries and directions for medical, dental hygiene research: low temperature atmospheric pressure plasma. Int J Dent Hyg. 2010;8(1):10-5. doi: 10.1111/j.1601-5037.2009.00386.x.

Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. Virulence. 2015;6(4):338-46. doi: 10.1080/21505594.2015.1012981

Nabesawa H, Hiruma T, Hitobo T, Wakabayashi S, Asaji T, Abe T, et al. Low-pressure plasma-etching of bulk polymer materials using gas mixture of CF₄ and O₂. AIP Advances. 2013;3:1-7. doi: 10.1063/1.4830277.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard – Third edition. CLSI document M27–A2. Wayne, PA; 2008. [ISBN 1-56238-666-2].

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard – Second edition. CLSI document M38–A2. Wayne, PA; 2008. [ISBN 1-56238-668-9].

Niemira BA. Cold plasma reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on almonds using ambient pressure gases. J Food Sci. 2012;77(3):M171-5. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02594.x.

Norberg SA, Tian W, Johnsen E, Kurshner MJ. Atmospheric pressure plasma jets interacting with liquid covered tissue: touching and not touching the liquid. J Phys D: Appl Phys. 2014;47(11):1-11.

Parada H, Veríssimo C, Brandão J, Nunes B, Boavida J, Duarte R, et al. Dermatomycosis in lower limbs of diabetic patients followed by podiatry consultation. Rev Iberoam Micol. 2013;30(2):103-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02594.x.

Pereira FO, Mendes JM, Lima IO, Mota KSL, Oliveira WA, Lima EO. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Tricophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. Pharm Biol. 2015;53(2):228-34. doi: 10.3109/13880209.2014.913299.

Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. An Bras Dermatol. 2010;85(5):657-67.

Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses* 1992;35:9-16.

Price M, Wilkson I, Gentry L. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20(1):7-14.

Rahimi-Verki N, Shapoorzadeh A, Razzaghi-Abyaneh M, Atyabi SM, Shams-Ghahfarokhi M, Jahanshiri Z, et al. Cold atmospheric plasma inhibits the growth of *Candida albicans* by affecting ergosterol biosynthesis and suppresses the fungal virulence factors *in vitro*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2016;13:66-72. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.12.007.

Ramos-e-Silva M, Lima CM, Schechtman RC, Trope BM, Carneiro S. Superficial mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clin Dermatol*. 2010 Mar 4;28(2):217-25. doi: 10.1016/j.clindermatol.2009.12.008.

Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SF, dos Santos JD, de Barros PP, Prata MC, et al. Competitive interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during biofilm formation and development of experimental candidiasis. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131700. doi: 10.1371/journal.pone.0131700.

Saville SP, Lazzell AL, Bryant AP, Fretzen A, Monreal A, Solberg EO, et al. Inhibition of Filamentation Can Be Used To Treat Disseminated Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemot*. 2006;50(5):3312-6.

Schutze A, Jeong JY, Babayan SE, Park J, Selwyn GS, Hicks RF. The Atmospheric-Pressure Plasma Jet: A Review and Comparison to Other Plasma Sources. *IEEE Trans Plasma Sci*. 1998;26(6):1625-93.

Sedghizadeh PP, Chen MT, Schaudinn C, Gorur A, Jiang C. Inactivation Kinetics Study of an Atmospheric-Pressure Cold-Plasma Jet Against Pathogenic Microorganisms. *IEEE. Trans Plasma Sci*. 2012;40(11):2879-82.

Silva LB, de Oliveira DB, da Silva BV, de Souza RA, da Silva PR, Ferreira-Paim K, et al. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;28(5):633-40. doi: 10.1111/jdv.12151.

Staniszewska M, Bondaryk M, Malewski T, Kurzatkowisk W. Quantitative expression of *Candida albicans* aspartyl proteinase genes SAP7, SAP8, SAP9, SAP10 in human serum *in vitro*. *Pol J Microbiol*. 2014;63(1):15-20.

Sun P, Sun Y, Wu H, Lopes JL. Atmospheric pressure cold plasma as an antifungal therapy. *Appl Phys Lett*. 2011;98(021501):1-3. doi:10.1063/1.3530434.

Sun Y, Yu S, Sun P, Wu H, Zhu W, Liu W, et al. Inactivation of *Candida* biofilms by non-thermal plasma and its enhancement for fungistatic effect of fungal drugs. *Plos One*. 2012;7(7):e40629. doi: 10.1371/journal.pone.0040629.

Takasura T. Amino acid- or protein-dependent growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000.

29:241-5.

Uhm HS, Choi EH, Cho GS. Sterilization of Microbes by Using Various Plasma Jets. *J Korean Phys Soc.* 2012;60(6):897-902.

Varade RS, Burkemper MN. Cutaneous fungal infections in elderly. *Clin Geriatr Med.* 2013;29(2):461-78. doi: 10.1016/j.cger.2013.01.001.

Vasconcelos C, Pereira CQM, Souza MC, Pelegri A, Freitas RS, Takahashi JP. Identification of antifungal species in the onychomycosis of institutionalized elderly. *An Bras Dermatol.* 2013;88(3):377-80. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20131884>.

Wende K, Williams P, Dalluge J, van Gaens W, Aboubarkr H, Bischof J, et al. Identification of the biologically active liquid chemistry induced by a nonthermal atmospheric pressure plasma jet. *Biointerphases.* 2015;10(029518):1-16. doi: 10.1116/1.4919710.

Williams DW, Jordan RPC, Wei XQ, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surface. *J Oral Microbiol.* 2013;5. doi: 10.3402/jom.v5i0.22434.

Yamazaki H, Ohshima T, Tsubota Y, Yamaguchi H, Jayawardena JA, Nishimura Y. Microbicidal activities of low frequency atmospheric pressure plasma jets on oral pathogens. *Dent Mater J.* 2011;30(3):384-91.

Yu DT, Peterson JF, Seger DL, Gerth WC, Bates DW. Frequency of potential azole drug-drug interactions and consequences of potential fluconazole drug interactions. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2005 Nov;14(11):755-67.

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E GENOTOXICIDADE DO JATO DE PLASMA FRIO SOB PRESSÃO ATMOSFÉRICA

Pesquisador: CRISTIANE YUMI KOGA ITO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31787814.1.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 698.119

Data da Relatoria: 23/06/2014

Apresentação do Projeto:

As doenças fúngicas representam grande desafio para a área médica e odontológica devido à crescente prevalência, escassas opções terapêuticas e aumento da resistência antifúngica. O plasma frio é uma mistura gasosa contendo partículas carregadas, radicais livres e radiação. Sua potencial aplicação em doenças infecciosas foi relatada, contudo a literatura carece de estudo sistemático sobre o efeito antifúngico e seus mecanismos de ação. Outrossim, não foram detectados estudos sobre seu potencial genotóxico. O escopo geral deste projeto é avaliar o efeito antifúngico do jato de plasma de hélio sobre *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum* e seu potencial genotóxico. A atividade antifúngica sobre células planctônicas e biofilmes será determinada. Serão avaliados os efeitos celulares e sobre fatores de virulência na busca por evidências de seus mecanismos de ação. Para *C. albicans*, serão realizados ensaios de análise de integridade de parede celular e membrana plasmática, quantificação de ergosterol, morfogênese, produção de exoenzimas, aderência a células epiteliais e efeito no tratamento in vivo de lesões de candidose oral induzida em modelo

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 698.119

murino. Para *T. rubrum* serão analisados integridade de parede celular e membrana, produção de biomassa, crescimento radial do micélio, morfologia celular, atividade de queratinase e efeitos sobre modelo *ex vivo* de infecção de unha. O potencial genotóxico será avaliado *in vitro* sobre culturas de queratinócitos e CHO pelo teste do cometa. Os dados serão analisados estatisticamente, inicialmente por teste de normalidade da distribuição amostral e, a seguir, por análise específica adequada (=5%).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a atividade antifúngica do jato de plasma frio de hélio sob pressão atmosférica sobre as principais espécies envolvidas nas candidoses e dermatofitoses, verificar a genotoxicidade do plasma de hélio nos parâmetros eficientes para atividade antifúngica.

Objetivo Secundário:

Determinar as condições físicas do jato de plasma frio de hélio com atividade sobre *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*; Avaliar o efeito sobre fatores de virulência das espécies dessas espécies; Avaliar o efeito do jato de plasma em modelo *in vivo* para *C. albicans* e *ex vivo* para *T. rubrum*; Avaliar a genotoxicidade sobre linhagem celular de queratinócitos e células de ovário de hamster (CHO).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não existem riscos pois no projeto serão utilizados: 1) cepas de *Candida albicans* previamente isoladas em estudo anterior; 2) fragmentos de unhas doadas por voluntários saudáveis.

Benefícios:

O estudo pode trazer benefícios à população gerando tratamento alternativo para doenças refratárias e com poucas opções terapêuticas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a declarar

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nada a declarar

Endereço: Av. Eng^o Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 698.119

Recomendações:

Nada a declarar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a declarar

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado confirma o parecer da relatora.

SAO JOSE DOS CAMPOS, 25 de Junho de 2014

Assinado por:
JANETE DIAS ALMEIDA
(Coordenador)

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000

UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

ANEXO B - Comissão de Ética no Uso de AnimaisThe logo for UNESP (Universidade Estadual Paulista) features the word "unesp" in a bold, lowercase sans-serif font. To the right of the text is a stylized blue geometric icon consisting of several interconnected shapes forming a larger, abstract form.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

A graphic element consisting of a vertical line intersected by a horizontal line, with four colored squares (blue, red, yellow, and green) arranged in a 2x2 grid to the left of the intersection.

CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **01/2015-CEUA/ICT-CJSC-UNESP**, sobre "**Atividade antifúngica e genototoxicidade do jato de plasma frio sob pressão atmosférica**", sob responsabilidade de **CRISTIANE YUMI KOGA ITO**, tendo como colaboradora **ALINE CHIODI BORGES**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por esta CEUA.

São José dos Campos, 24 de abril de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "P. Komori".

Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
Coordenadora

Obs:- Para este trabalho serão utilizados 102(cento e dois) camundongos machos heterogênicos de 60 dias, linhagem Swiss, incluso 10% para estudo piloto.