



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

GERALDO MAGNO ALVES DE ABREU

**EFEITOS DO PLASMA FRIO SOB PRESSÃO ATMOSFÉRICA
COMO ADJUVANTE NO CONTROLE DA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *Aggregatibacter*
*actinomycetemcomitans***

2021

GERALDO MAGNO ALVES DE ABREU

**EFEITOS DO PLASMA FRIO SOB PRESSÃO ATMOSFÉRICA COMO
ADJUVANTE NO CONTROLE DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL INDUZIDA
POR *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

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. Linha de pesquisa: Doenças Infeciosas de Interesse Médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito
Coorientadora: Dra. Gabriela de Moraes Gouvêa Lima

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. 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).

Abreu, Geraldo Magno Alves de

Efeitos do plasma frio sob pressão atmosférica como adjuvante no controle da periodontite experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* / Geraldo Magno Alves de Abreu. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.

49 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, 2021.

Orientadora: Cristiane Yumi Koga Ito

Coorientadora: Gabriela de Moraes Gouvêa Lima

1. Periodontite. 2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. 3. Gases em plasma. 4. Antibacterianos. I. Koga Ito, Cristiane Yumi, orient. II. Lima, Gabriela de Moraes Gouvêa, 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. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Dra. Ana Maria do Espírito Santo

Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Dra. Marianne Spalding

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Dra. Sônia Khouri

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Faculdade de Ciências da Saúde

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 30 de abril de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Victor Canettieri

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Faculdade de Ciências da Saúde

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 30 de abril de 2021.

AGRADECIMENTOS

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

À minha orientadora Prof. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito por ter me recebido como aluno de doutorado no Laboratório de Genoma, pela confiança e paciência principalmente nos momentos mais difíceis deste percurso.

À minha coorientadora Dra. Gabriela de Moraes Gouvêa Lima pela contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Tit. Sergio Lúcio Pereira de Castro Lopes pelas discussões e sugestões durante as análises tomográficas.

À equipe do Laboratório de Genoma pelo carinho e apoio e em toda execução desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através dos processos números: 308127/2018-8 e 302405/2018-6 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do processo número: 2019/05856-7.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 PROPOSIÇÃO	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Micro-organismo e origem da cepa analisada.....	15
3.2 Caracterização do jato de plasma	15
3.3 Determinação dos parâmetros físicos do plasma com atividade inibitória frente a <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	17
3.4 Determinação dos parâmetros físicos do plasma com atividade anti-biofilme frente a <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	17
3.5 Avaliação do PBTPA como adjuvante no controle da doença periodontal induzida <i>in vivo</i> por <i>A. actinomycetemcomitans</i>	18
3.6 Avaliação tomográfica para avaliação da perda óssea alveolar	23
3.7 Análise estatística	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Determinação dos parâmetros físicos do plasma com atividade inibitória frente a <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	26
4.2 Efeito do PBTA sobre a viabilidade dos biofilmes de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	27
4.3 Avaliação do PBTPA como adjuvante no controle da doença periodontal induzida <i>in vivo</i> por <i>A. actinomycetemcomitans</i>	27
4.3.1 Controle do alimento inoculado	27
4.3.2 Verificação da viabilidade de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> após protocolo de inoculação	28
4.3.3 Análise da perda óssea por tomografia computadorizada	28
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO	49

De Abreu GMA. Efeitos do plasma frio sob pressão atmosférica como adjuvante no controle da periodontite experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

A etiopatogenia da doença periodontal é complexa e exige estudos constantes em alternativas terapêuticas que possibilitem seu controle. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está associado fortemente à periodontite crônica e à periodontite agressiva. A tecnologia do plasma frio sob pressão atmosférica tem potencial para uso na odontologia, mas sua aplicação na periodontia ainda é pouco explorada. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (PBTPA) como adjuvante no controle da doença periodontal experimental induzida por ligadura, inoculada com *A. actinomycetemcomitans*, na região cervical do primeiro molar inferior em modelo murino. Inicialmente, foram determinados os parâmetros físicos efetivos para inibição de biofilmes de *A. actinomycetemcomitans* utilizando cepa padrão American Type Culture Collection ATCC 29523. Foram realizados testes de *screening* inicial com a verificação da inibição do crescimento por exposição ao PBTPA de *A. actinomycetemcomitans* semeados em placas de Petri. Posteriormente, foram formados biofilmes em placas de microtitulação e foram determinados os parâmetros físicos efetivos do PBTPA. Foram realizados experimentos *in vivo* de indução de doença periodontal por *A. actinomycetemcomitans* em modelo utilizando ligaduras em ratos. A tomografia computadorizada de feixe cônico foi utilizada para avaliar o nível de perda óssea após período experimental. Os resultados mostraram que o PBTPA foi efetivo na eliminação do micro-organismo observado através da formação de halos de inibição nos tempos de 5 e 7, 5 minutos e sobre biofilmes de *A. actinomycetemcomitans* expostos ao PBTPA no tempo de 5 minutos. Os resultados exibiram diferença estatística significativa ($p < 0,001$) na distância entre a junção esmalte-cimento e a crista óssea alveolar, do grupo tratado com PBTPA em relação ao grupo raspagem e ao grupo controle. Os resultados do presente estudo sugerem o potencial do PBTPA no controle da periodontite induzida, contudo análises adicionais são necessárias.

Palavras-chave: Periodontite. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Gases em plasma. Antibacterianos.

De Abreu GMA. *Effect of atmospheric pressure cold plasma as adjuvante in the control of experimental periodontitis induced by Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

The etiopathogenesis of periodontal disease is complex requiring constant studies of therapeutic alternatives that enable its control. Aggregatibacter actinomycetemcomitans is strongly associated with chronic periodontitis and aggressive periodontitis. Cold plasma technology under atmospheric pressure has potential for use in dentistry, but its application in periodontics is still not well explored. This study aimed to evaluate the effects of low temperature atmospheric pressure plasma (PBTPA) as an adjuvant in the control of experimental periodontal disease induced by ligature inoculated with A. actinomycetemcomitans in the cervical region of the lower 1st molar in a murine model. Initially, effective physical parameters for inhibition of A. actinomycetemcomitans biofilms were determined using the standard strain American Type Culture Collection ATCC 29523. Initial screening tests were performed to verify growth inhibition after exposure of A. actinomycetemcomitans seeded in Petri dishes to the PBTPA. Subsequently, biofilms were formed on microtiter plates and the effective physical parameters of the PBTPA were determined. In vivo experiments were carried out to induce A. actinomycetemcomitans periodontal disease induced by ligature in a rat model. Cone beam computed tomography was used to assess the level of bone loss after the experimental period. The results showed that PBTPA was effective in eliminating the microorganism observed through the formation of halos inhibition during 5 and 7.5 minutes and in A. actinomycetemcomitans biofilms exposed to PBTPA at 5 minutes. The previous study using PBTPA in 5 minutes did not show cytotoxicity in Vero cells. The results showed a statistically significant difference ($p < 0.0001$) in the distance between the enamel-cement joint and the alveolar bone crest, of the group treated with PBTPA in relation to the scaling group and the control group, confirming the potential of the technique in dentistry.

Keywords: Periodontitis. Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Plasma gases. Anti-bacterial agents.

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais apresentam elevada relevância no contexto da saúde bucal mundial (Organização Mundial da Saúde, 2017; Papapanou, Susin, 2017; Petersen, Ogawa, 2005). Por muitas décadas, a ocorrência de periodontite foi associada à presença de grupos bacterianos específicos (Bartold, Van Dyke, 2013; Kinane et al., 2005; Kinane et al., 2017; Lindhe et al., 2010; Newman, 2016; Wong et al., 2021). Atualmente, a etiopatogenia dessa doença está relacionada à associação de diferentes fatores, como acúmulo de biofilme, condições sistêmicas desfavoráveis e outras condições externas que culminam com a ocorrência de disbiose, caracterizada pelo elevado número de bactérias Gram-negativas proteolíticas específicas (Al-Maweri et al., 2021; Armitage, 1999; Hajishengallis, 2014; Lindhe et al., 2010; Kinane et al., 2017; Newman, 2016; Wong et al., 2021).

A complexa interação da microbiota disbiótica e os elementos das respostas imune inata e adaptativa iniciam e propagam a inflamação crônica periodontal a qual resulta em destruição tecidual, incluindo a reabsorção óssea (Al-Maweri et al., 2021; Hajishengallis, 2014; Kinane et al., 2017; Lindhe et al., 2010; Newman, 2016). Com base nessa visão sobre a patogênese da doença periodontal, a terapêutica que anteriormente era baseada na utilização de antimicrobianos, passa a exigir um enfoque ampliado, levando à necessidade de pesquisa em novas formas de controle e tratamento (Bartold, Van Dyke, 2013; Kinane et al., 2017; Laroussi, 2019; Newman, 2016; Tonetti, Claffey, 2005; Tonetti et al., 2017, Wong et al., 2021).

Dentre os periodontopatógenos, a espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é uma das mais estudadas. Trata-se de um coco bacilo pequeno, imóvel, Gram-negativo, anaeróbico facultativo, microaerófilo, capnofílico, não esporulado, tamanho entre 0,4-0,5 µm x 1,0-1,5 µm pertencente à família Pasteurellaceae e que forma pequenas colônias convexas de centro estrelado quando cultivado em ágar-sangue (Benso, 2017; Haubek, 2010; Kachlany, 2010; Oscarsson et al., 2019; Poulsen et al., 2011; Tsai et al., 2018). Estudos prospectivos relatam sua presença em número elevado no biofilme subgingival na presença da doença periodontal, sendo que em indivíduos saudáveis seu número é diminuído ou ausente, o micro-organismo é associado fortemente à periodontite crônica e à periodontite

agressiva (Benso, 2017; Kachlany, 2010; Oscarsson et al., 2019; Pourhajibagher et al., 2017; Schacher et al., 2007; Tsai et al., 2018; Wong et al., 2021).

A. actinomycetemcomitans tem como fatores de virulência: leucotoxinas, toxina distensora citoletal (CDT), proteína C (MorC), collagenase, endotoxinas, toxinas, fímbrias e pili (Benso, 2017; Henderson et al., 2001; Kawamoto et al., 2016; Mayer et al., 1999; Poulsen et al., 2011; Tsai et al., 2018, Wong et al., 2021). Expressa ainda outros fatores que contribuem para sua virulência, tais como fator indutor de reabsorção óssea, fator inibidor de fibroblastos, indução da produção de citocinas pelos macrófagos, capacidade de invasão celular e capacidade de induzir a apoptose celular (Benso, 2017; Haubek, 2010; Oscarsson et al., 2019; Poulsen et al., 2011, Wong et al., 2021). Elevados níveis de pelo menos seis diferentes tipos de anticorpos específicos, determinados por O-polissacarídeos de superfície da bactéria, são encontrados no soro, na saliva e em sítios ativos de pacientes (Benso, 2017; Haubek, 2010; Oscarsson et al., 2019; Pourhajibagher et al., 2017; Schacher et al., 2007; Tsai et al., 2018). Esse micro-organismo tem sido identificado, entre outras patologias, em ateromas, pneumonias, osteopatologias, septicemias e abscessos cerebrais e é conhecida como a bactéria do grupo HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*) Gram-negativa facultativa produtora da toxina RTX (repeats in toxin) é mais prevalente nas endocardites bacterianas (Ando-Sugimoto et al., 2014; Benz, 2016; Oscarsson et al., 2019; Paturel et al., 2004; Winkelhoff, Slots, 1999; Yoshida et al., 2021).

A complexidade da etiologia multifatorial da doença periodontal e o insucesso nos tratamentos tradicionais, associada à resistência bacteriana, motivam a descoberta de novas terapias. A laserterapia e a terapia fotodinâmica são investigadas há alguns anos no tratamento da periodontite com aplicação clínica, mas seu emprego é limitado devido ao alto custo da tecnologia laser (Shetty et al., 2021). A nanotecnologia e medicina regenerativa com células tronco também são propostas no tratamento da periodontite, mas novamente o alto custo da técnica e a necessidade de especialização dos profissionais são limitadores para sua utilização na clínica odontológica (Dharma, Nagarathna, 2021)

A tecnologia do plasma frio sob pressão atmosférica (PBTPA) tem sido estudada e utilizada extensamente na esterilização de equipamentos médicos, indústria alimentícia, tratamento de superfícies, esterilização de grãos, esterilização

interna de embalagens previamente seladas, na indústria têxtil e automotiva, assim como no tratamento de águas (Arndt et al., 2018; Belgacem et al., 2017; Laroussi, 1996; Laroussi, 2019; Laroussi, Mendis, 2003; Neyts, Brault, 2017). Um vasto e promissor campo de estudo se abre com a aplicação da tecnologia em áreas como a energética, a fotônica, a comunicação, a exploração espacial, a física de materiais e muito especialmente nas áreas médicas (Belgacem et al., 2017; Laroussi, 2017; Mohades et al., 2017; Motaln et al., 2021; Neyts, Brault, 2017). Grupos multidisciplinares sob esforços conjuntos da engenharia, física, química, biologia, odontologia e medicina, entre outros, tem produzidos evidências *in vitro* e *in vivo* da eficácia e da aplicabilidade da tecnologia, no tratamento não invasivo e indolor, de infecções persistentes a diversos tipos de câncer (Arndt et al., 2018; Dobrynin et al., 2009; Lee et al., 2016; Laroussi, 2017; Laroussi, 2019).

Os efeitos do plasma sobre células procarióticas e eucarióticas na indução à apoptose celular e da regeneração celular são objetos dos estudos recentes com resultados promissores que norteiam pesquisas subsequentes (Brun et al., 2015; Borges, 2016; Motaln et al., 2021). Evidências que apontam para efetividade do plasma na inibição da cascata inflamatória que culmina com destruição tecidual, também motivam o estudo dessa tecnologia (Arndt et al., 2018; Borges, 2016; Brun et al., 2015; Laroussi, 2019; Motaln et al., 2021). Schmidt et al. (2017), em estudo prospectivo único, acompanhou por um ano os efeitos da PBTPA sobre feridas em orelhas de ratos com resultados que sugerem efeitos colaterais não evidentes incluindo ausência de formação de tumor, ausência de inflamação crônica e ausência de citocinas pro-inflamatórias e marcadores tumorais.

O plasma é conceituado como uma mistura gasosa carregada de íons, radicais livres e radiação produzidos por micro-ondas, radio frequência e estimulação elétrica contínua ou alternada de gases nobres ou moleculares (argônio, hélio, oxigênio, nitrogênio) (Bourke et al., 2017; Kong et al., 2009; Laroussi, 1996; Laroussi, 2019).

Embora existam dois tipos conhecidos de plasma: plasma com produção de calor em alta temperatura e plasma frio sob pressão atmosférica (PBTPA) com temperaturas inferiores a 40°C (Kong et al., 2009; Laroussi, 1996; Neyts, Brault, 2017), este trabalho se debruça sobre o último por sua característica inerente em não produzir calor e dor e por ter baixa toxicidade às células eucarióticas (Bourke et al.,

2017; Kong et al., 2009; Laroussi, 2019, Motaln et al., 2021). Laroussi (1996) foi o primeiro a relatar o efeito bactericida do plasma frio, liderando desde então um expressivo número de artigos abordando seu potencial antimicrobiano e investigando os mecanismos físicos e químicos envolvidos no processo terapêutico da técnica (Bourke et al., 2017; Coughlan et al., 2016; Delben et al., 2016; Jiang et al., 2009; Kong et al., 2009; Koban et al., 2010; Lunov et al., 2017; Von Woedtke et al., 2019).

O potencial da PBTPA na odontologia é corroborado e justificado por estudos investigando os efeitos antimicrobianos sobre *Streptococcus mutans* (Goree et al., 2006; Kang et al., 2011; Rupf et al., 2010; Tasaki et al., 2017; Yang et al., 2011). Efeito inibitório sobre *Lactobacillus acidophilus* após 5 minutos de aplicação do plasma também foi observado por Yang et al. (2011). Estudos conduzidos com jato de plasma mostraram a eliminação efetiva de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares *ex vivo* após 8-10 minutos de aplicação (Kleineidam et al., 2019; Jiang et al., 2009; Pan et al., 2013; Yamamoto et al., 2017). Efeito antifúngico frente a *Candida albicans* também foi reportado por Kostov et al. (2015) e Borges et al. (2017). Estudo conduzido com *Porphyromonas gingivalis* mostrou que o plasma frio é eficaz na inibição do micro-organismo numa variação temporal de 5 a 11 minutos de aplicação (Liu et al., 2011; Mahasneh et al., 2011; Yang et al., 2017).

A hipótese mais aceita para o mecanismo de ação do PBTPA é a capacidade de quebrar ligações covalentes de compostos estáveis como o peptideoglicano da parede celular de bactérias Gram-positivas e levar à peroxidação de lipídios da membrana celular de bactérias Gram-negativas (Laroussi, 1996; Laroussi, Leipold, 2004; Laroussi et al., 2017; Lunov et al., 2017; Mai-Prochnow et al., 2016, Von Woedtke et al., 2019). Os resultados mostram que a interação do plasma com a estrutura de células procarióticas leva a ruptura da célula por eletroerosão com formação de poros iônicos e subsequente extravasamento do conteúdo celular (Bourke et al., 2017; Delben et al., 2016; Mai-Prochnow et al., 2016; Motaln et al., 2021; Von Woedtke et al., 2019). Esses efeitos são decorrentes da ação dos radicais hidroxilas OH^\cdot , peróxido de hidrogênio H_2O_2 , oxigênio singlete $^1\text{O}_2$, ânion superóxido O^{2-} , oxigênio atômico O , nitrogênio atômico N , óxido nítrico NO entre outras espécies reativas produzidas pelo plasma frio (Bourke et al., 2017; Laroussi et al., 2003; Von Woedtke et al., 2019). Além disso, o plasma frio tem ainda a capacidade de romper as ligações covalentes das matrizes poliméricas dos biofilmes microbianos facilitando

sua desestruturação (Brelles-Mariño, 2012; Delben et al., 2016; Puligundla, Mok, 2017).

Outra propriedade marcante do plasma e determinante para o tratamento de infecções é a capacidade em causar dano à célula procariótica mantendo a integridade de células eucarióticas (Dobrynin et al., 2009; Mai-Prochnow et al., 2016; Lunov et al., 2017; Weltmann, Woedtke, 2017). Essa propriedade é baseada no metabolismo celular para espécies reativas de oxigênio (ERO) que não é igual para ambas uma vez que eucariotos possuem proteção para espécies como O_2^- , por exemplo, enquanto células procarióticas não possuem proteção ou tem baixa resistência (Dobrynin et al., 2009; Gorbanev et al., 2016; Kumar et al., 2014; Lin et al., 2017; Madigan et al., 2016; Xu et al., 2015). A diferença de tamanho entre as células também oferece seletividade visto que células bacterianas oferecem maior superfície em relação ao volume para ação do plasma, estando na ordem de 0,2 a 10 μ m enquanto a célula eucariótica apresenta tamanho variável de 10 a 100 μ m (Arndt et al., 2018; Dey et al., 2021; Dobrynin et al., 2009; Gorbanev et al., 2016; Kong et al., 2009; Motaln et al., 2021; Von Woedtke et al., 2019).

A capacidade das células eucarióticas de se organizarem em tecidos confere uma maior capacidade em resistir aos efeitos do plasma, assim uma pequena dose é capaz de eliminar bactérias que tendem a agir isoladamente ou em associações, muitas vezes compondo biofilmes, sem dano ao tecido organizado (Alkawareek et al., 2012; Arndt et al., 2018, Delben et al., 2016; Dey et al., 2021; Lunov et al., 2017; Puligundla, Mok, 2017). Diferenças metabólicas entre células saudáveis e células malignas e bacterianas também promovem seletividade uma vez que replicações celulares constantes expõe o DNA dessas últimas, em relação às células saudáveis, favorecendo a interação com o plasma que promove dano estrutural ao DNA, efeito seletivo desejável no tratamento e controle das infecções e das doenças malignas (Dey et al., 2021; Dobrynin et al., 2009; Hirst et al., 2016; Kong et al., 2009; Van der Paal et al., 2017, Von Woedtke et al., 2019; Xu et al., 2015).

As diversas ações biológicas das espécies reativas geradas pelo PBTPA (antimicrobiana, anti-inflamatória e indutora de reparação tecidual) e baixa toxicidade sugerem que esta tecnologia pode ser válida no controle da periodontite. A busca por novas formas de tratamentos para doenças infecciosas sem uso de antibióticos, segundo demandado pela Organização Mundial da Saúde (Petersen, Ogawa, 2005,

Yoshida et al., 2021), e a possibilidade de desenvolvimento tecnológico com aplicação clínica direta motivam o desenvolvimento desse estudo.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* do jato de plasma de baixa temperatura gerado com hélio (PBTPA) sob pressão atmosférica no controle da doença periodontal experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

2.1.1 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos do projeto:

- a) Determinar as condições físicas do jato de plasma frio sobre biofilmes de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29523);
- b) Avaliar o efeito do plasma frio sobre biofilmes de *A. actinomycetemcomitans*;
- c) Avaliar os efeitos do plasma, em modelo animal com periodontite induzida por ligadura associada a infecção por *A. actinomycetemcomitans*;
- d) Avaliar, o efeito do PBTPA na perda óssea alveolar após indução da periodontite em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos e procedimentos deste estudo foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação do ICT/UNESP e foram realizadas de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). CEUA nº 01/2018.

3.1 Micro-organismo e origem da cepa analisada

Foi utilizada a cepa padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523. A cepa de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC® 29523) é classificada como sorotipo A com base em suas propriedades antigênicas, e foi isolada a partir de amostras de sangue (Nørskov-Lauritsen et al., 2006).

3.2 Caracterização do jato de plasma

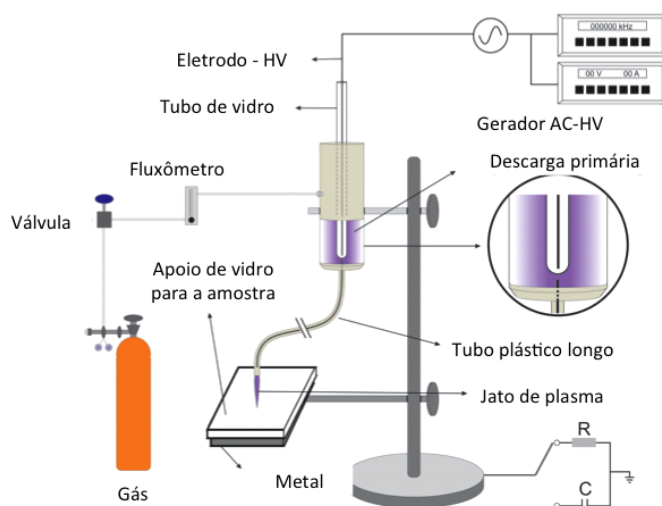
O gerador de plasma utilizado nesse projeto foi descrito anteriormente (Kostov et al., 2015). Um diagrama esquemático do arranjo experimental é apresentado (Figura 1).

O dispositivo consiste em um compartimento em formato de seringa feito de Delrin, em seu eixo encontra-se uma haste de cobre conectada a uma fonte de alta tensão mini pulse (GBS Elektronik GmbH, Alemanha) servindo como eletrodo de alta tensão. Esta haste metálica é envolvida por um tubo de quartzo que possui uma das extremidades fechadas. O plasma é gerado na região do eletrodo de alta tensão sendo direcionado por meio do fluxo de gás hélio, na ponta do invólucro em formato de seringa, um extenso tubo plástico é conectado e no seu interior encontra-se um fino fio de cobre que ajuda a conduzir o plasma para a região externa. O jato de plasma

descrito opera com os seguintes parâmetros variáveis: frequência, tensão, modulação do sinal, fluxo do gás e distância entre o bocal de saída do plasma e a amostra.

Os parâmetros são padronizados de acordo com o tipo de amostra, aplicação e resultado desejado. Nesse estudo, foi acoplado ao equipamento um tubo plástico longo, de diâmetro de alguns mm e comprimento que pode chegar a 4 m, a fim de reduzir o risco de choque elétrico e permitir que o plasma seja aplicado longe da descarga primária ou em superfícies de difícil acesso. O plasma ejetado pelo tubo é frio, permitindo assim que seja aplicado *in vivo*. Dentro do tubo flexível é instalado um fino fio condutor (cobre, prata, Ni-Cr ou outro metal) que ajuda gerar plasma na outra extremidade. Variando o comprimento e a geometria do tubo a potência do plasma pode ser controlada com precisão.

Figura 1 - Desenho esquemático do gerador de plasma acoplado a um tubo longo utilizado nos experimentos



Fonte: Elaborado por Kostov, 2015.

3.3 Determinação dos parâmetros físicos do plasma com atividade inibitória frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

O *screening* da atividade inibitória do PBTPA foi realizado pela metodologia do halo de inibição.

A capacidade do PBTPA em reduzir a viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* foi analisada frente à cepa padrão. Alíquotas de 100 µl de suspensões bacterianas de *A. actinomycetemcomitans* foram padronizadas partindo de culturas frescas de 24 horas, crescida em aerobiose. As alíquotas com 3×10^8 células/.ml⁻¹, com uma densidade óptica de 0,80, λ 600nm foram distribuídas, com auxílio de alça Drigalski estéreis, sobre placas de Petri (90 x 15 mm) contendo TSA (Tryptic soy agar). Após o espalhamento do inóculo, as placas foram deixadas a temperatura ambiente no fluxo laminar por 15 minutos para secagem. A seguir, as placas foram expostas ao jato de plasma a uma distância de 1,5 cm, nos tempos de 1; 2,5; 5 e 7 minutos, em triplicata (Abonti et al., 2016; Nishime et al., 2016). As placas foram incubadas após 24 horas de incubação, a 37°C em aerobiose. Como controle negativo, foram utilizadas placas expostas apenas ao fluxo de gás hélio. Os testes foram realizados em triplicata. E depois foi observada a formação de halos de inibição do crescimento bacteriano.

3.4 Determinação dos parâmetros físicos do plasma com atividade anti-biofilme frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Tendo como base os parâmetros estabelecidos no *screening*, as condições do PBTPA efetivas frente a biofilmes de cepa padrão de *A. actinomycetemcomitans* foram estabelecidos. Partindo de culturas frescas de 24 horas, crescidas em aerobiose em TSA (Tryptic soy agar), suspensões padronizadas de *A. actinomycetemcomitans* foram preparadas em TSB (Tryptic Soy Broth) utilizando-se os parâmetros de uma densidade óptica de 0,2 e comprimento de onda (λ) de 500 nm equivalente a 3×10^8 células.ml⁻¹. 200µL da alíquota foram depositados em placas de

96 poços por 24 horas para formação de biofilmes em aerobiose, conforme metodologia proposta por Yamazaki et al. (2011). Após este período, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com 100µL de solução salina 0,9% por 3 vezes e na sequência os biofilmes foram expostos ao PBTPA em tempos 1; 2,5 e 5 minutos. A diluição seriada foi realizada e semeados em meio de cultura TSA, por meio do método da gota para determinação de células viáveis nos biofilmes após 24 horas de incubação em aerobiose. Como controle biofilmes foram expostos ao fluxo de gás, sem a presença do hélio e da ativação do plasma. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em UFC/ml.

3.5 Avaliação do PBTPA como adjuvante no controle da doença periodontal induzida *in vivo* por *A. actinomycetemcomitans*

Os experimentos *in vivo* foram iniciados após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA sob o número 01/2018, anexo A.

Foram utilizados 30 ratos machos adultos (*Rathus norvegicus*, variação *albinus*), com 6-8 semanas de idade, peso de 150-250 gramas, mantidos em biotério com temperatura e umidade controladas em ciclo de 12 horas de luz-escuro. Os animais receberam água e ração *ad libitum*.

O protocolo experimental adotado foi o proposto por Schreine et al. (2003) e Campi et al. (2016). A fim de diminuir a flora bucal residente dos ratos foi realizada higiene oral diária com auxílio de um cotonete embebido em solução de gluconato de clorexidina a 0,12% (Schreiner et al., 2003). A seguir, o procedimento de indução da periodontite foi realizado. Para indução da periodontite experimental os animais foram pesados e anestesiados com quetamina (80 mg/kg, i.m.; Francotar, Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda, Brasil) e xilazina (20 mg/kg, i.m.; Kensol, König S.A., Brazil).

Em seguida, foi fixada ligadura, uma volta, com fio de algodão 3.0 (Ethicon®, Germany) na região cervical dos dentes primeiros molares inferiores da mandíbula esquerda. Os dentes contralaterais, mandíbula direita, passaram pelos mesmos procedimentos, mas sendo removida a ligadura imediatamente após a fixação da mesma no momento cirúrgico, servindo como controle. (Campi et al., 2016; Herreira

et al, 2015; Schreine et al., 2003) (Figura 2).

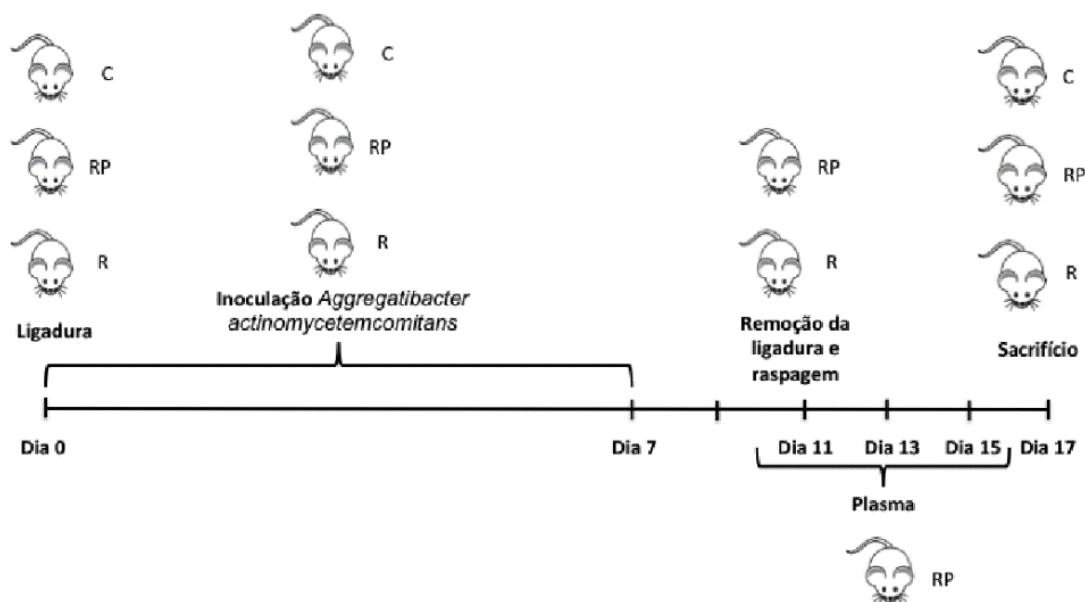
Figura 2 - Região onde foi instalada a ligadura na região cervical do dente primeiro molar inferior da mandíbula esquerda



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os animais foram divididos em 3 grupos: i) Grupo C (Controle) (n=11) - inserção de ligadura no dia 0, protocolo de inoculação de *A. actinomycetemcomitans* por 8 dias e eutanásia no dia 17; ii) Grupo R (Raspagem) (n=9) - inserção de ligadura no dia 0, protocolo de inoculação de *A. actinomycetemcomitans* por 8 dias, remoção da ligadura e raspagem no dia 11 e eutanásia no dia 17; iii) Grupo RP (Raspagem + PBTPA) (n=10) – inserção de ligadura no dia 0, protocolo de inoculação de *A. actinomycetemcomitans* por 8 dias, remoção da ligadura e raspagem no dia 11, aplicação do PBTPA nos dias 11, 13 e 15 e eutanásia no dia 17 conforme delineamento experimental (Figura 3).

Figura 3 - Esquema do delineamento experimental de modelo de periodontite induzida por *A. actinomycetemcomitans* em ratos



Legenda: Grupo controle – C, Grupo raspagem – R, Grupo raspagem + PBTPA – RP.
Fonte: Elaborado pelo autor.

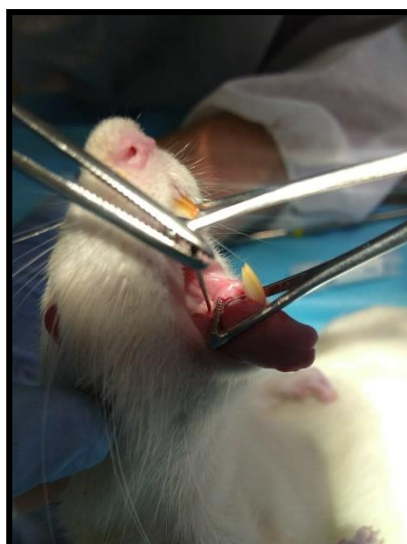
Após instalação da ligadura e por período de 48 horas, foi administrado dipirona sódica (50mg/kg peso), via oral, a cada 8 horas para controle da dor.

O protocolo de inoculação de *A. actinomycetemcomitans* foi realizado de acordo com Schreiner et al. (2013). Após um período de 4 horas em jejum os ratos foram alimentados com mistura alimentar controlada acrescida do inóculo bacteriano, conforme descrito por Schreiner et al. (2013). Para o preparo do inóculo foram utilizadas culturas frescas de *A. actinomycetemcomitans* crescidas em meio de cultura TSA, em anaerobiose, a 37°C, por 24 horas. O inóculo foi padronizado em PBS com 3% de sacarose contendo 10^8 células.mL⁻¹, densidade óptica de 0,80, λ 600nm. O regime de inoculação de *A. actinomycetemcomitans* pela alimentação foi realizado da seguinte forma: 1 ml do inóculo foi adicionado a 1 grama da ração para cada animal. O alimento foi colocado no alimentador e o animal foi observado até o consumo de toda a ração inoculada. Esse regime foi repetido diariamente por 8 dias (Schreiner et al., 2003; Campi et al., 2016).

Após o período de inoculação, foi realizada coleta de biofilme subgengival da região da ligadura para confirmação da presença de *A. actinomycetemcomitans*. A

coleta do biofilme foi realizada inserindo um cone de papel estéril no sulco gengival na região da ligadura por 20 segundos e imerso imediatamente em meio reduzido tioglicolato para transporte de amostra de micro-organismos anaeróbios (Figura 4). As coletas foram feitas em dias alternados, iniciadas 2 dias após o início da inoculação, e mantidos no 6° e no 9° dia imediatamente após a inoculação. Para a confirmação da presença do micro-organismo inoculado, os tubos contendo tioglicolato e os cones de papel foram incubados, em aerobiose, por 48 horas, a 37°C. Após o período de incubação, foi realizada verificação da turvação do meio de cultura e confirmação microscópica e pelo teste de catalase (Campi et al., 2016). Para o teste de catalase uma alíquota de 100µL do caldo tioglicolato contendo o cone foi semeado com alça Driglasky em placa de TSA (Tryptic soy agar) e incubado por 24 horas à 37 °C.

Figura 4 - Coleta com cone de papel estéril de amostra microbiana sub gengival do animal estudado; procedimento realizado sob contenção mecânica, sem auxílio de anestesia



Fonte: Elaborado pelo autor.

No 11º dia do período experimental os animais foram anestesiados e as ligaduras removidas. O tratamento experimental com o PBTPA foi aplicado nos animais do grupo plasma nos dias 11º, 13º e 15º dia, com os animais sob anestesia.

A operação de aplicação do PBTPA (Figura 5) foi realizada por 2 operadores, um que operou o equipamento e aplicou o plasma, e o outro que promoveu o afastamento das mucosas e manteve o animal na posição mais adequada para receber a aplicação PBTPA. O animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo (Figura 5). Essa operação foi repetida nos dias 13º e 15º dia de tratamento mantendo as posições tanto dos operadores, como dos animais. A distância da saída do jato de plasma até a mucosa do animal foi mantida em 1,5 cm para cada animais e o tempo de tratamento foi mantido em 5 minutos para cada animal.

Após finalização do período experimental, os animais foram eutanasiados no décimo sétimo dia por dose excessiva de anestésico

Figura 5 - Procedimentos de aplicação do plasma frio em pressão atmosférica. Em A: momento da aplicação do plasma na região do primeiro molar inferior esquerdo de um animal do grupo plasma e em B: detalhe da aplicação do plasma e a distância do jato de plasma até a área alvo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida foi realizada análise tomográfica das mandíbulas dos animais para determinação dos efeitos da doença periodontal experimental nos tecidos de suporte do dente. A perda óssea foi avaliada pela medida em mm da distância entre a junção esmalte-cimento (JCE) e a crista óssea alveolar na face disto-vestibular, disto-proximal e disto-lingual dos primeiros molares, de acordo com protocolo definido por Schreiner et al. (2003) e Campi et al. (2016)

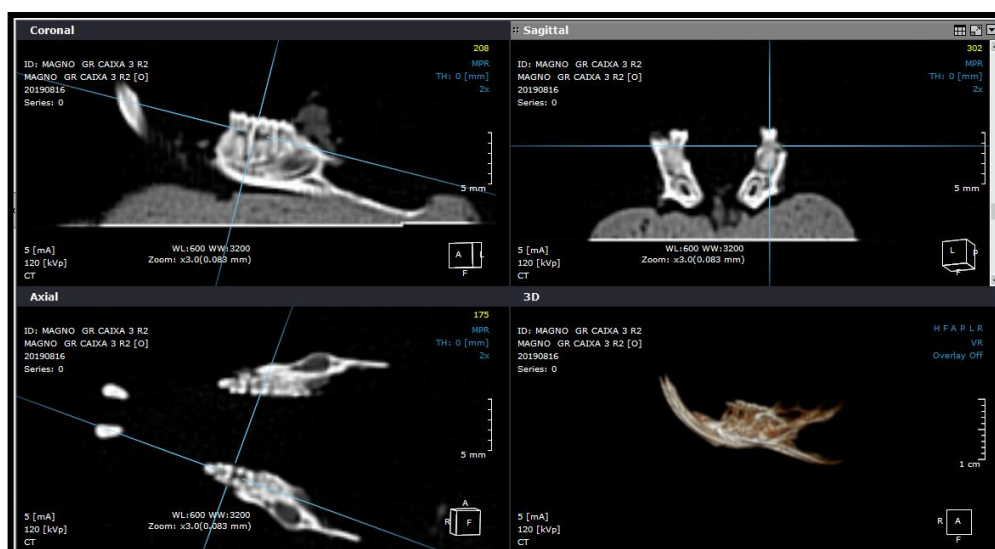
3.6 Avaliação tomográfica para avaliação da perda óssea alveolar

As tomografias das mandíbulas foram realizadas em um tomógrafo I-CAT Next Generation (Imaging Science International, Hattfield, PA, USA), localizado na clínica de Radiologia do ICT-UNESP. O protocolo utilizado para obtenção das imagens considerou um voxel de 0,120mm, com padrão de aquisição de imagem de 26,9 segundos. O FOV (field of view) abrangeu a região de interesse e foi determinado após a consideração do exame clínico e baseado na evidência científica. A tomografia foi realizada de toda a mandíbula em posição axial em uma porta amostra. Em seguida os dados foram avaliados pelo software OnDemand3D (Cybermed Inc., Tustin, CA, EUA) no formato DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine). As medidas foram realizadas por um único avaliador cego ao tipo de tratamento previamente calibrado. A ROI (Region of Interest) foi mantida com ajustes de brilho, contraste, zoom e filtro de nitidez nos parâmetros: Zoom de x3 (0,082mm), WL (window level/center) de 600, WW (wide window) de 3200.

O avaliador foi calibrado realizando todas medidas por 3 dias consecutivos. O teste de correlação interclasses foi aplicado e o avaliador considerado apto ao atingir concordância de 90% dos dados avaliados. Os resultados estão expressos pelas medidas obtidas após três tempos diferentes e consecutivos de análises das tomografias. O software utilizado foi o On Demand 3D®, após ICC-test.

A perda óssea alveolar foi medida em milímetros, em cortes parassagitais. A medida foi obtida da distância entre a junção esmalte-cimento e a crista óssea alveolar da mandíbula do animal (Figura 6).

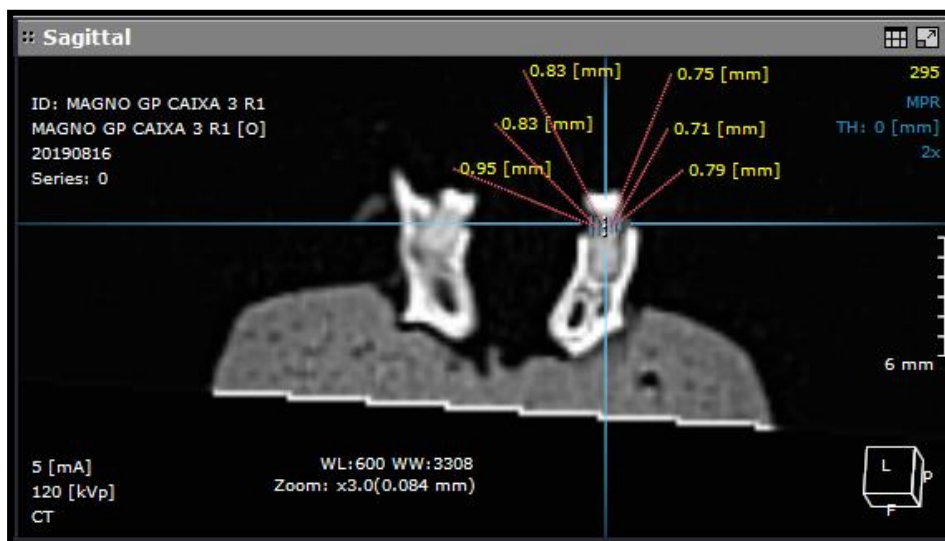
Figura 6 - Exemplos de imagens mandibulares em cortes paracoronal, parassagital, axial e mandíbula escaneada - em uma tela do software On Demand 3D®



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram coletadas as medidas em milímetros de 6 pontos equidistantes no plano parassagital da imagem analisada considerando os limites entre a junção esmalte-cimento e a crista óssea alveolar do 1º molar inferior de cada animal para cada grupo analisado em triplicatas (Figura 7).

Figura 7 - Detalhe da coleta das medidas em milímetros de 6 pontos equidistantes no plano parasagital da imagem analisada considerando os limites entre a junção esmalte-cimento e a crista óssea alveolar



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a análise das medidas obtidas em milímetros os dados foram colocados em tabelas e realizada a análise estatística.

3.7 Análise estatística

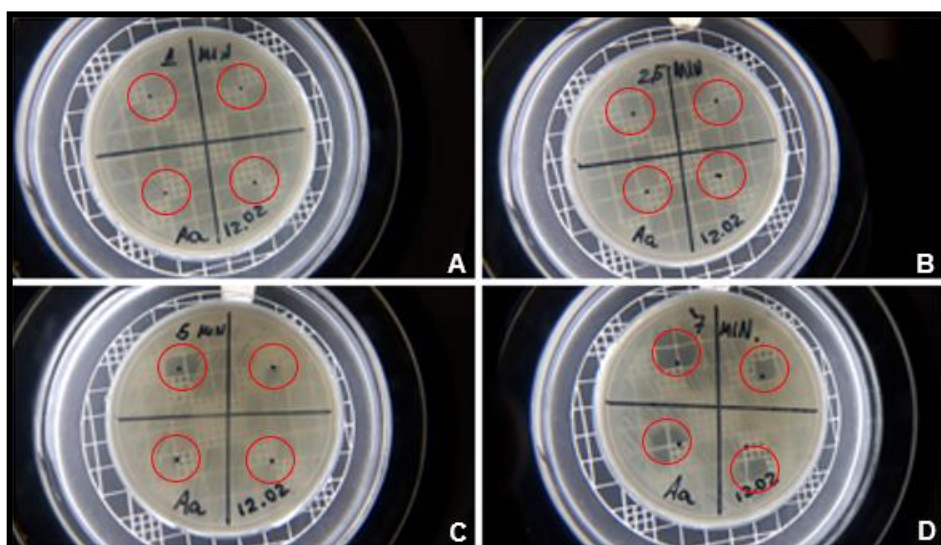
Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com a ferramenta do programa GraphPad Prism versão 7.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Foi realizado teste de distribuição amostral D'Agostino & Pearson Test e Shapiro-Wilk test. Em seguida, os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação dos parâmetros físicos do plasma com atividade inibitória frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Foi observada a formação de halos de inibição de bordas uniformes com aproximadamente 1 cm de diâmetro nas placas submetidas ao PBTPA nos tempos de 5 e 7,5 minutos de exposição (Figura 8).

Figura 8 - Halos de inibição em placas de Petri inoculadas com *A. actinomycetemcomitans* após aplicação de PBTPA para os tempos de 1; 2,5; 5 e 7,5 minutos em A, B C e D respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Efeito do PBTPA sobre a viabilidade dos biofilmes de *A. actinomycetemcomitans*

Houve redução na contagem de células viáveis nos biofilmes de *A. actinomycetemcomitans* após exposição ao PBTPA por 5 min ($6,0 \times 10^5$ UFC/mL) em relação grupo controle ($2,33 \times 10^6$ UFC/mL). Reduções inferiores foram observadas após exposições por 2,5 min ($1,07 \times 10^6$ UFC/mL) e 1 min ($2,33 \times 10^6$ UFC/mL).

4.3 Avaliação do PBTPA como adjuvante no controle da doença periodontal induzida *in vivo* por *A. actinomycetemcomitans*

O tempo que demonstrou maior atividade anti-biofilme de *A. actinomycetemcomitans* foi de 5 minutos. Considerando que estudo anterior realizado pelo grupo com o mesmo dispositivo gerador de plasma e mesmos parâmetros adotados nesse estudo por 5 minutos apresentou baixa toxicidade para células Vero (Borges et al., 2018), este protocolo foi aplicado nos experimentos *in vivo*.

4.3.1 Controle do alimento inoculado

Foi realizado controle diário da quantidade de alimento consumido. Cada animal consumiu 1 grama da ração inoculada, todos os dias durante os 8 dias que durou o período de inoculação.

4.3.2 Verificação da viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* após protocolo de inoculação

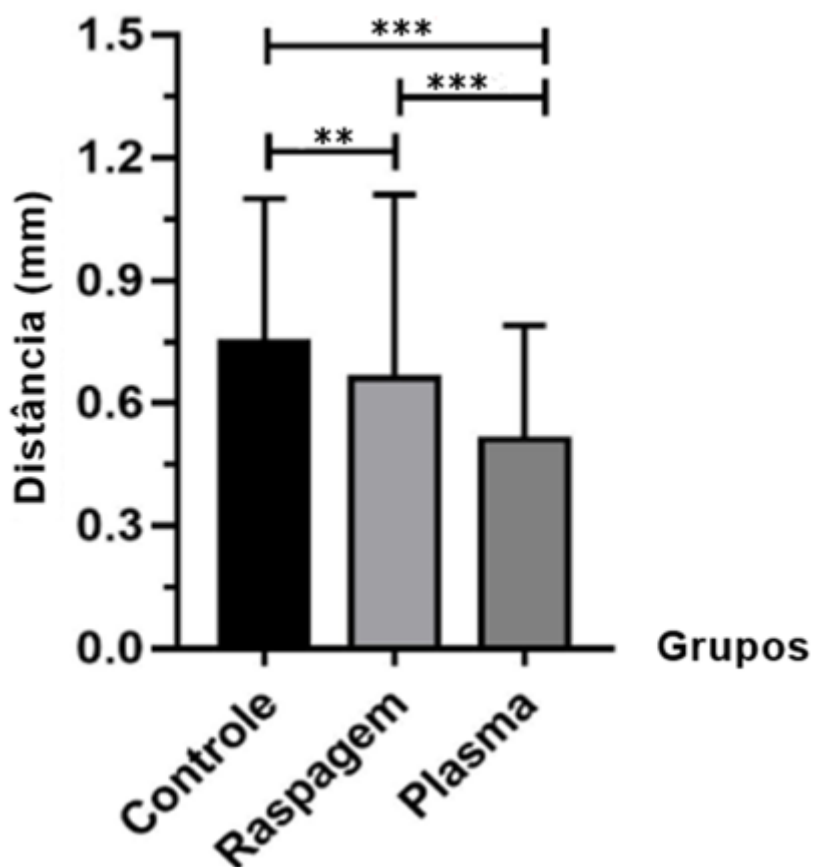
Na inspeção da viabilidade de cepas de *A. actinomycetemcomitans*, foi utilizado método presuntivo da presença de micro-organismo anaeróbio facultativo em caldo com a presença de turvação concentrada no fundo do tubo contendo o meio de cultura. No teste de Gram foi observada a presença de micro-organismo cocobacilo Gram negativo. No teste de catalase foi observado produção de bolhas após 1 gota de peróxido e hidrogênio ser depositada sobre uma colônia contida na placa inoculada para o teste de viabilidade do *A. actinomycetemcomitans*.

4.3.3 Análise da perda óssea por tomografia computadorizada

Os valores das medidas obtidas em milímetros nas tomografias, buscando a perda óssea em 6 pontos diferentes na face distal do dente primeiro molar inferior, foram organizados em tabelas após três tomadas diferentes e consecutivas das medidas, utilizando o software On Demand 3D® e o ICC-test. Em seguida os dados foram analisados estatisticamente.

O grupo tratado com plasma apresentou valores menores no nível de perda óssea alveolar, medida em milímetros, exibindo resultado com diferença estatística significativa ($p < 0,001$) quando comparado tanto com o grupo raspagem quanto com o grupo controle. Apesar da comparação entre os grupos controle e raspagem não apresentar diferença estatística significativa, observou-se uma tendência de redução do nível de perda óssea no grupo raspagem (Figura 9).

Figura 9 - Valores de mediana e da distância entre a junção esmalte-cimento e a crista óssea alveolar observada após período experimental entre os 3 grupos avaliados: o grupo controle, que não sofreu tratamentos, o grupo que sofreu o tratamento convencional (raspagem) e o grupo submetido a exposição ao jato de plasma



Legenda: *diferença estatística pouco significativa ($p < 0,5$), **diferença estatística significativa ($p < 0,05$), ***diferença estatística muito significativa ($p < 0,005$). Valor obtido $p < 0,001$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A aplicação da tecnologia do plasma frio sob pressão atmosférica nas áreas médicas é relativamente nova e, atualmente, é considerada uma ferramenta de grande potencial (Braný et al., 2020). Nas áreas médicas, o PBTPA já é utilizado como adjuvante no tratamento de feridas infectadas em pé diabético (Stratmann et al., 2020), na terapia antineoplásica (Tavares-da-Silva et al., 2021), na perfusão periférica (Martirosyan, 2021), na regeneração tecidual e indução de apoptose celular (Estarabadi et al., 2021; Jablonowski et al., 2019).

Especificamente, na odontologia o PBTPA tem mostrado potencial na aplicação em cariologia, implantodontia, endodontia, oncoterapia e no tratamento da candidose oral. Em periodontia, apesar de estudos serem reportados, ainda é limitado o número de trabalhos *in vivo*, tendo como área alvo de tratamento a região do periodonto, como o proposto neste trabalho. Assim, a utilização da técnica do plasma frio como adjuvante no tratamento da periodontite induzida torna-se uma das motivações na investigação de seu potencial na periodontia.

A etiologia das doenças periodontais continua sendo desafiadora devido seu caráter multifatorial, complexidade e alto custo no seu controle e tratamento, acometendo 11% da população mundial (Lee et al., 2020). A bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi selecionada para este estudo pois está presente tanto no estabelecimento como na manutenção da doença periodontal (Fine et al., 2021) induzindo resposta imunológica no hospedeiro, como ativação das cascatas inflamatórias, as quais levarão à destruição do ligamento periodontal, reabsorção óssea e consequente perda dentária (Fine et al., 2021).

Neste contexto, este estudo visa oferecer evidências científicas que embasem a sua aplicabilidade na clínica odontológica como adjuvante no tratamento das periodontites.

A raspagem supra e sub gengival ainda é utilizada no tratamento da periodontite inicial antes da abordagem cirúrgica no combate das doenças periodontais. Essas terapias são relativamente de baixo custo e exigem profissional menos especializado (Wong et al., 2021). No entanto, novas terapias são necessárias.

A manutenção do controle da doença é difícil e exige comprometimento do paciente nos cuidados, incorrendo em recidivas recorrentes da doença (Wong et al., 2021). Outro fator que dificulta o tratamento, mostrando a necessidade de novas terapias na área são as especificidades anatômicas da região do periodonto dificultando o acesso no momento da remoção manual do biofilme ou da biomassa de acúmulos bacterianos retidos na região supra e sub gengival (Akram et al., 2019). A antibioticoterapia quase sempre está associada ao tratamento periodontal tanto ao nível sistêmico como local, mas também há limitações como a dificuldade em atingir a área alvo, a impossibilidade da prescrição orientada por exames laboratoriais, alto custo na identificação do micro-organismo envolvido na patogenia e a questão da resistência antibacteriana cada vez mais presente na atualidade (Akram et al., 2019, Giannelli et al., 2018). Por isso, o plasma frio pode ser viável na periodontia e este trabalho foi desenvolvido com o intento de contribuir nesta área do conhecimento.

A hipótese de que o PBTPA pode ter ação inibitória sobre *A. actinomycetemcomitans* baseia-se na relatada ação do plasma frio sobre bactérias Gram-negativas (Laroussi, 2019; Laroussi et al., 2003). Esses estudos sugerem que o principal mecanismo de ação se faz pela diferença em espessura da parede celular das cepas Gram-negativas (Laroussi et al., 2003). A peroxidação de fosfolipídios e polissacarídeos da parede celular de bactérias Gram-negativas é facilitada em relação às Gram-positivas pela diferença na espessura da parede celular e disposição dos lipopolissacarídeos (Laroussi et al., 2003; Mai-Prochnow et al., 2016). Os lipopolissacarídeos na parede das Gram negativas estão mais expostos às forças moleculares, iônicas e de estresse provenientes das espécies reativas do plasma (Mai-Prochnow et al., 2016).

No presente estudo, verificou-se que o PBTPA gerado a partir de hélio mostrou atividade inibitória frente a *A. actinomycetemcomitans* após exposição a partir de 5 minutos. Este resultado está de acordo com estudos anteriores. Abonti et al. (2016) aplicou o plasma sobre cepas bucais de *A. actinomycetemcomitans*, semeados em placas de ágar ou aderidos ao cálculo gengival *ex vivo* em diferentes tempos. Após o período experimental, concluíram que o plasma foi eficiente em eliminar completamente os micro-organismos presentes na placa de ágar e no cálculo gengival em tempos e distâncias diferentes. Nesse experimento utilizaram um jato de plasma experimental, com mistura gasosa de oxigênio, nitrogênio e argônio (Abonti et al.,

2016). A efetividade do plasma na eliminação de biofilmes de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* formados em saliva também já foi observada com 100% de efetividade após 12 minutos de tratamento (Annunziata et al., 2016). O grupo utilizou uma metodologia diferente com câmara contendo gás argônio sobre os biofilmes. Os resultados foram estatisticamente significativos justificando a aplicação do PBTPA na eliminação de biofilmes de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* como foi proposto no nosso estudo, com o diferencial de que nosso equipamento utilizou o hélio em forma de jato sobre os biofilmes e no tempo de 5 minutos.

A metodologia selecionada para a indução da periodontite em ratos foi a ligadura retentiva, associada com inoculação por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Esta seleção levou em conta as similaridades anatômicas da região dental dos molares do animal em relação aos humanos e do padrão de perda óssea alveolar após infecção com *A. actinomycetemcomitans* (Oz, Puleo, 2011). O modelo murino escolhido é o mais empregado em estudos investigando os efeitos de novas terapias na periodontia. O rato pode desenvolver a doença periodontal naturalmente ou de forma induzida, seu tamanho permite fácil manuseio, a avaliação clínica é possível e o custo é acessível. Estudos em microbiologia e imunologia também consideram o rato um bom modelo para estudo de novas terapias pelo seu padrão de reprodutibilidade (Salavastru, Ovidiu, 2020). O dispositivo gerador de plasma utilizado neste estudo permite a variação dos parâmetros de aplicação conforme a amostra estudada e o tipo de efeito desejado. Modificações na distância, no tempo, no tipo de gás, na quantidade de energia oferecida para a produção do gás podem ser ajustadas manualmente (Martirosyan et al., 2021). Esses parâmetros variáveis do equipamento são vantagens que podem favorecer a prospecção de novas aplicações. No presente trabalho, o tempo e a distância foram determinados com base nos estudos conduzidos anteriormente pelo nosso grupo e outros da literatura científica onde a aplicação do plasma é investigada determinando-se principalmente a toxicidade sobre células eucarióticas (Chiodi et al., 2018; Delben et al., 2016; Hara, Adachi, 2021). Borges et al. (2018), utilizando o mesmo dispositivo deste estudo, relatou que os tempos de 3 e 5 minutos não foram tóxicos sobre células Vero. Delben et al. (2016) em estudo *in vitro* utilizou epitélio oral reconstrutivo EpiOralR® para avaliar a citotoxicidade do plasma de baixa temperatura e relatou nenhuma ou muito pouca

toxicidade. Estes autores também relataram que não foi detectada nenhuma alteração histológica no epitélio exposto ao plasma.

No presente trabalho, foi utilizado o gás hélio para geração do plasma, com tempo de tratamento de 5 minutos e com distância definida de 1,5 cm entre a saída do plasma e a região alvo. Os resultados mostraram diferença estatística significativa na redução da perda óssea alveolar do grupo tratado com plasma em relação ao grupo submetido à raspagem. É importante considerar a influência dos parâmetros de aplicação sobre os efeitos do plasma. Estudos recentes mostram que a distância do jato de plasma da amostra pode influenciar diretamente a quantidade de espécies reativas produzidas pelo hélio. (Kewitz et al., 2021, Kong et al., 2021). Os pesquisadores avaliaram vários parâmetros que podem interferir na produção e estabilidade da nuvem de plasma e concluíram que quanto maior a distância do jato de gás hélio da amostra, maior será o contato desse gás com o oxigênio e o nitrogênio atmosférico. Este contato diminui o nível de excitação das espécies reativas e facilita a redução nos níveis das mesmas e conseqüentemente suas interações biológicas (Kewitz et al., 2021, Kong et al., 2021).

A análise tomográfica computadorizada por feixe cônico foi utilizada para mensuração indireta da perda óssea alveolar dos animais estudados. A técnica foi desenvolvida e é utilizada principalmente na odontologia para análise tridimensional de estruturas ósseas e dentárias da face, justamente pelas especificidades anatômicas da região como a dos primeiros molares inferiores, região de interesse neste estudo (Assiri et al., 2020). Os dados obtidos na análise tomográfica mostraram que a perda óssea alveolar, medida expressa em milímetros da região entre a crista óssea alveolar e a junção esmalte-cimento, teve diferença estatística significativa entre os grupos plasma e raspagem e entre os grupos plasma e controle, o que reforça o uso da técnica na avaliação da perda óssea alveolar.

Observou-se no presente estudo que a diferença da perda óssea entre o grupo tratado com raspagem e o grupo controle sem tratamento foi significativa. Este resultado corrobora estudos anteriores (Ahram et al., 2019, Giannelli et al., 2018). A raspagem e aplainamento radicular tem sido o tratamento de escolha na terapia periodontal e sua efetividade pôde ser confirmada pelos resultados obtidos neste trabalho. No entanto, a recidiva é recorrente e o tratamento cirúrgico com abordagem medicamentosa são as escolhas no caso de intensificação da doença, com possíveis

efeitos sistêmicos e com maior desconforto para os pacientes (Ahram et al., 2019; Giannelli et al., 2018). Nosso resultado mostrou diferença significativa entre o grupo tratado com plasma e o grupo tratado com raspagem reforçando o potencial da técnica no tratamento da periodontia

As hipóteses para o efeito positivo do plasma, observado nos nossos resultados na diminuição da perda óssea nos grupos tratados com plasma podem ser o fato das espécies reativas presentes no plasma terem auxiliado na redução da invasão tecidual pelo *A. actinomycetemcomitans* ou favorecido a reparação tecidual através de efeitos na cascata inflamatória (Martirosyan et al., 2021; Motaln et al., 2021). Os mecanismos de ação do plasma sobre células do sistema imune ainda não estão bem elucidados, mas as evidências apontam que as espécies reativas do plasma podem alterar ou ativar de forma positiva o sistema de cascatas MAPK (Mitogen-activated protein kinase) modulando a resposta imunológica (Jungbauer et al., 2021). A MAPK é capaz de regular uma variedade de processos complexos relacionados com a homeostase celular, a diferenciação celular, proliferação e apoptose tanto no processo patológico como em condições de saúde (Estarabadi et al., 2021; Motaln et al., 2021).

A presença do micro-organismo no sulco gengival é capaz de estimular reações de resposta de defesa do hospedeiro, como os fibroblastos gengivais e células epiteliais e a aplicação do plasma pode ter reduzido a invasão tecidual. Bekeschus et al. (2016) através de citometria de fluxo conseguiu mostrar as alterações positivas das espécies reativas presentes na nuvem de plasma sobre células do sistema imune e sobre algumas citocinas produzidas durante o processo inflamatório *in vitro* (Hara, Adachi, 2021; Von Woedtke et al., 2019).

Outra hipótese a ser considerada para a diminuição da perda óssea na região do periodonto pode ter sido pela influência do plasma sobre as células do ligamento periodontal. Kleineidam et al. (2019), estudando a influência do plasma sobre células do ligamento periodontal observou efeito positivo na atividade celular, na produção de matriz extracelular, na proliferação celular e na degradação de genes.

Através deste trabalho pudemos avaliar a potencialidade do PBTPA no tratamento da doença periodontal com resultados favoráveis, mas muito ainda precisa ser feito para translar o conhecimento para clínica odontológica. Análises histológicas e de imuno-histoquímica precisam ser empregadas para avaliar os efeitos benéficos e de possível citotoxicidade da técnica no tecido do periodonto *in vivo*, como serão

realizadas na próxima fase deste estudo. Os trabalhos na literatura científica ainda estão concentrados em modelos animais que fornecem evidências, mas não mimetizam os efeitos no humano, essa limitação só será superada com novos estudos direcionando o emprego do PBTPA na clínica odontológica.

6 CONCLUSÃO

Foi possível determinar os parâmetros e avaliar os efeitos da terapia PBTPA como adjuvante no tratamento da periodontite induzida em modelo murino, a PBTPA reduziu a perda óssea alveolar nos casos de periodontite induzida por *A. actinomycetemcomitans* em modelo murino.

REFERÊNCIAS*

- Abonti TR, Kaku M, Kojima S, Sumi H, Kojima S, Yamamoto T, et al. Irradiation effects of low temperature multi gas plasma jet on oral bacteria. *Dent Mater J*. 2016;35(5):822-8. doi: 10.4012/dmj.2016-062.
- Akram Z, Raffat MA, Shafqat SS, Mirza S, Ikram S. Clinical efficacy of photodynamic therapy as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis among cigarette smokers: a systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;26: 334-41. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.027.
- 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*. 2012;65(2):381-84.
- Al-Maweri SA, Ibraheem WI, Al-Ak'hali MS, Shamala A, Halboub E, Alhadj MN. Association of periodontitis and tooth loss with liver cancer: a systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;103221. doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103221.
- Ando-Sugimoto ES, da Silva MP, Kawamoto D, Chen C, Di Rienzo JM, Mayer MPA. The cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production. *Cytokine*. 2014;66(1):46-53. doi.org/10.1016/j.cyto.2013.12.014.
- Annunziata M, Canullo L, Donnarumma G, Caputo P, Natri L, Guida L. Bacterial inactivation/sterilization by argon plasma treatment on contaminated titanium implant surfaces: in vitro study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016;21(1):e118. doi.org/10.4317%2Fmedoral.20845.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec 1;4(1):1-6. doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1.
- Arndt S, Schmidt A, Karrer S, von Woedtke T. Comparing two different plasma devices kINPen and Adtec SteriPlas regarding their molecular and cellular effects on wound healing. *Clin Plasma Med*. 2018;9:24-33. doi.org/10.1016/j.cpme.2018.01.002.
- Assiri H, Dawasaz AA, Alahmari A, Asiri Z. Cone beam computed tomography (CBCT) in periodontal diseases: a Systematic review based on the efficacy model. *BMC Oral Health*. 2020 Jul 8;20(1):191. doi: 10.1186/s12903-020-01106-6.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Avila-Campos MJ, Simionato MRI, Cai S, Mayer, MPA, De Lorenzo JL, Zelante F. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: other putative factors. *Pesqui Odontol Bras*. 2000;14(1):05-11. doi.org/10.1590/S1517-74912000000100002.
- Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontol* 2000. 2013;62(1):203-17. doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00450.x.
- Bekeschus S, Schmidt A, Weltmann KD, von Woedtke T. The plasma jet kINPen–A powerful tool for wound healing. *Clin Plasma Med*. 2016 Jul 1;4(1):19-28. doi.org/10.1016/j.cpme.2016.01.001.
- Belgacem ZB, Carré G, Charpentier E, Le-Bras F, Maho T, Robert E, Pouvesle JM, et al. Innovative non-thermal plasma disinfection process inside sealed bags: assessment of bactericidal and sporicidal effectiveness in regard to current sterilization norms. *PLoS One*. 2017 Jun 29;12(6):e0180183. doi.org/10.1371/journal.pone.0180183.
- Benso B. Virulence factors associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their role in promoting periodontal diseases. *Virulence*. 2017;8(2):111-4. doi.org/10.1080/21505594.2016.1235128
- Benz R. Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: basis of their biological activity. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2016 Mar 31;1858(3):526-37. doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.025.
- Blackert S, Haertel B, Wende K, von Woedtke T, Lindequist U. Influence of non-thermal atmospheric pressure plasma on cellular structures and processes in human keratinocytes (HaCaT). *J Dermatol Sci*. 2013;70(3):173-81. doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.01.012.
- Borges AC, Lima GMG, Nishime TMC, Gontijo AVL, Kostov KG, Koga-Ito CY. Amplitude-modulated cold atmospheric pressure plasma jet for treatment of oral candidiasis: in vivo study. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199832. doi.org/10.1371/journal.pone.0199832.
- Borges AC, Nishime TM, Kostov KG, Lima GD, Gontijo AV, de Carvalho JN, et al. Cold atmospheric pressure plasma jet modulates *Candida albicans* virulence traits. *Clin Plasma Med*. 2017;7:9-15. doi.org/10.1016/j.cpme.2017.06.002.
- 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.
- Bourke P, Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Gilmore BF. Microbiological interactions with cold plasma. *J Appl Microbiol*. 2017 Aug;123(2):308-24. doi.org/10.1111/jam.13429.

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 Aug 1;45(2):191-9. doi.org/10.1016/j.femsim.2005.03.011.

Boutaga K, Van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*. 2006;33(6):427-33. doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.00925.x.

Braný D, Dvorská D, Halašová E, Škovierová H. Cold atmospheric plasma: a powerful tool for modern medicine. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8):2932. doi.org/10.3390/ijms21082932.

Brelles-Mariño G. Challenges in biofilm inactivation: the use of cold plasma as a new approach. *J Bioprocess Biotech*. 2012;2:e107. doi.org/10.4172/2155-9821.1000e107.

Brun P, Russo V, Tarricone E, Corrao S, Deligianni V, Leonardi A, et al. Using helium-generated cold plasma to control infection and healing *Plasma Medicine*. *Plasma Med*. 2015;5:2-4. doi.org/10.1615/PlasmaMed.2016015761.

Campi P, Herrera BS, de Jesus FN, Napolitano M, Teixeira SA, Maia-Dantas A, et al. Endothelial dysfunction in rats with ligature-induced periodontitis: Participation of nitric oxide and cyclooxygenase-2-derived products. *Arch Oral Biol*. 2016 Mar;63:66-74. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.11.022.

Chen Z, Garcia JrG, Arumugaswami V, Wirz RE. Cold atmospheric plasma for SARS-CoV-2 inactivation. *Phys Fluids*. 2020;32(11):111702. doi.org/10.1063/5.0031332.

Chen Z, Wirz R. Cold Atmospheric Plasma for COVID-19. Preprints 2020. 2020040126. doi: 10.20944/preprints202004.0126.v1

Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Alvarez-Ordóñez A. New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Front Microbiol*. 2016;7:1641. doi.org/10.3389/fmicb.2016.01641.

Delben JA, Zago CE, Tyhovych N, Duarte S, Vergani C. Effect of atmospheric-pressure cold plasma on pathogenic oral biofilms and in vitro reconstituted oral epithelium. *PloS one*. 2016;11(5):e0155427. doi.org/10.1371/journal.pone.0155427.

Dey S, Phadke R, Mukherjee D, Mukhopadhyay D. To study the selective potentiality and anti-tumor activity of CAP in oral cancer treatment. *OSF Preprints*. 2021 Jan. doi:10.31219/osf.io/dh6qv.

Dharma S, Nagarathna DV. Nanotechnology-advancements in periodontal disease treatment: a review. *IAR J Med Sci*. 2021;2(1):87-93. doi:10.47310/iarjms.2021.v02i01.004.

Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys*. 2009;11(11):115020. doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115020.

Ebersole JL, Dawson III D, Emecen-Huja P, Nagarajan R, Howard K, Grady ME, et al. The periodontal war: microbes and immunity. *Periodontology* 2000. 2017 Oct;75(1):52-115. doi.org/10.1111/prd.12222.

Estarabadi H, Atyabi SA, Tavakkoli S, Noormohammadi Z, Gholami MR, Ghiaseddin A, et al. Cold atmospheric plasma induced genotoxicity and cytotoxicity in esophageal cancer cells. *Mol Biol Rep*. 2021 Feb;48(2):1323-33. doi.org/10.1007/s11033-021-06178.

Fine DH, Schreiner H, Velusamy SK. *Aggregatibacter*, a Low abundance pathobiont that influences biogeography, microbial dysbiosis, and host defense capabilities in periodontitis: The history of a bug, and localization of disease. *Pathogens*. 2020;9(3):179. doi.org/10.3390/pathogens9030179.

Flemmig TF, Rudiger S, Hofmann U, Schmidt H, Plaschke B, Stratz A, et al. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33:3102–05. doi.org/10.1128/jcm.33.12.3102-3105.1995.

Giannelli M, Materassi F, Fossi T, Lorenzini L, Bani D. Treatment of severe periodontitis with a laser and light-emitting diode (LED) procedure adjunctive to scaling and root planing: A double-blind, randomized, single-center, split-mouth clinical trial investigating its efficacy and patient-reported outcomes at 1 year. *Lasers Med Sci*. 2018;33(5):991-1002. doi.org/10.1007/s10103-018-2441-9.

Gorbanev Y, O'Connell D, Chechik V. Non-thermal plasma in contact with water: the origin of species. *Chemistry*. 2016 Mar 1;22(10):3496-505. doi.org/10.1002/chem.201503771.

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.org/10.1088/1367-2630/12/8/083037.

Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*. 2014;35(1):3. doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001.

Hara H, Adachi T. Molecular mechanisms of non-thermal atmospheric pressure plasma-induced cellular responses. *Jpn J Appl Phys*. 2021;60(2):020501. doi.org/10.35848/1347-4065/abd496.

Haubek D. The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: evolutionary aspects, epidemiology and etiological role in aggressive periodontitis. *APMIS Suppl*. 2010 Sep;130:1-53. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02665.x.

Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57(1):29-55. doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090908.

Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Mol Oral Microbiol*. 2016 Jun;31(3):207-27. doi: 10.1111/omi.12119.

Herrera BS, Coimbra LS, da Silva AR, Teixeira SA, Costa SK, Wallace JL, et al. The H₂S-releasing naproxen derivative, ATB-346, inhibits alveolar bone loss and inflammation in rats with ligature-induced periodontitis. *Med Gas Res*. 2015;5(1):1-9. doi.org/10.1186/s13618-015-0025-3.

Hirst AM, Frame FM, Arya M, Maitland NJ, O'Connell D. Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future. *Tumour Biol*. 2016 Jun;37(6):7021-31. doi: 10.1007/s13277-016-4911-7.

Hirst AM, Simms MS, Mann VM, Maitland NJ, O'Connell D, Frame FM. Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. *Brit J Cancer*. 2015 Apr 28;112(9):1536-45. doi.org/10.1038/bjc.2015.113.

Hui WL, Perrotti V, Laculli F, Piattelli A, Quaranta A. The Emerging role of cold atmospheric plasma in implantology: a review of the literature. *Nanomaterials*. 2020;10(8):1505. doi.org/10.3390/nano10081505.

Jablonowski L, Kocher T, Schindler A, Müller K, Dombrowski F, von Woedtke T, et al. Side effects by oral application of atmospheric pressure plasma on the mucosa in mice. *PLoS One*. 2019 Apr 9;14(4):e0215099. doi: 10.1371/journal.pone.0215099.

Jiang C, Chen MT, Gorur A, Schaudinn C, Jaramillo DE, Costerton JW, et al. Nanosecond pulsed plasma dental probe. *Plasma Process Polym*. 2009;6(8):479-83. doi.org/10.1002/ppap.200800133.

Jungbauer G, Moser D, Müller S, Pfister W, Sculean A, Eick S. The Antimicrobial effect of cold atmospheric plasma against dental pathogens—a systematic review of in-vitro studies. *Antibiotics*. 2021;10(2):211. doi.org/10.3390/antibiotics10020211.

Kachlany SC. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res*. 2010 Jun;89(6):561-70. doi.org/10.1177%2F0022034510363682.

Kang SK, Choi MY, Koo IG, Kim PY, Kim Y, Kim GJ, et al. Reactive hydroxyl radical Driven oral bacterial inactivation by radio frequency atmospheric plasma. *Appl Phys Lett*. 2011;98(14):143702. doi.org/10.1063/1.3574639.

- Kawamoto D, Ando-Sugimoto ES, Bueno-Silva B, DiRienzo JM, Mayer MP. Alteration of homeostasis in pre-osteoclasts Induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* CDT. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:33. doi.org/10.3389/fcimb.2016.00033.
- Kewitz T, Regula C, Fröhlich M, Ihde J, Kersten H. Influence of the nozzle head geometry on the energy flux of an atmospheric pressure plasma jet. *EPJ Tech Instrum.* 2021;8(1):1-9. doi.org/10.1140/epjti/s40485-020-00061-4.
- Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005 Oct 1;39(1):91-117. doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00118.x.
- Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Jun 22;3(1):1-1. doi.org/10.1038/nrdp.2017.38.
- Kleineidam B, Nokhbehshaim M, Deschner J, Wahl G. Effect of cold plasma on periodontal wound healing-an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2019 Apr;23(4):1941-50. doi: 10.1007/s00784-018-2643-3.
- Koban I, Matthes R, Hübner NO, Welk A, Meisel P, Holtfreter B, et al. Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. *New J Phys.* 2010;12(7):073039. doi.org/10.1088/1367-2630/12/7/073039.
- Kong D, Zhu P, He F, Han R, Yang B, Wang M, et al. Influence of nitrogen and oxygen admixture on the development of helium atmospheric-pressure plasma jet. *J Appl Phys.* 2021;129(10):103303. doi.org/10.1063/5.0031345.
- Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Van Dijk J, et al. Plasma medicine: an introductory review. *New J Phys.* 2009;11(11):115012. doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115012.
- Kostov KG, Borges AC, Koga-Ito CY, Nishime TMC, Prysiaznyi V, Honda RY. Inactivation of *Candida albicans* by cold atmospheric pressure plasma jet. *IEEE Trans Plasma Sci.* 2014;43(3):770-5. doi.org/10.1109/TPS.2014.2360645.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins bases patológicas das doenças.* 8.ed. Filadélfia: Elsevier; 2014. p.1464.
- Langmuir I. Oscillations in ionized gases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1928;14(8):627. doi.org/10.1073/pnas.14.8.627.
- Laroussi M, Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrom.* 2004;233(1-3):81–6. doi.org/10.1016/j.ijms.2003.11.016.
- Laroussi M, Lu X, Keidar M. Perspective: the physics, diagnostics, and applications of atmospheric pressure low temperature plasma sources used in plasma medicine. *J Appl Phys.* 2017 Jul 14;122(2):020901. doi.org/10.1063/1.4993710.

Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. Plasma interaction with microbes. *New J Phys.* 2003;5(1):41. doi.org/10.1088/1367-2630/5/1/341.

Laroussi M. Special issue on low temperature plasma jets. *Plasma.* 2019;2(3):339-40. doi.org/10.3390/plasma2030025.

Laroussi M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Trans Plasma Sci.* 1996;24:1188–91. doi.org/10.1109/27.533129.

Lee A, Lin A, Shah K, Singh H, Miller V, Gururaja Rao S. Optimization of non-thermal plasma treatment in an in vivo model organism. *PLoS One.* 2016 Aug 9;11(8):e0160676. doi: 10.1371/journal.pone.0160676.

Lee HA, Park MH, Song Y, Na HS, Chung J. Role of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced autophagy in inflammatory response. *J Periodontol.* 2020;91(12):1682-93. doi.org/10.1002/JPER.19-0639.

Lee JH, Kim KN. Effects of a Nonthermal atmospheric pressure plasma jet on human gingival fibroblasts for biomedical application. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2876916. doi: 10.1155/2016/2876916. Epub 2016 Aug 11. PMID: 27597959; PMCID: PMC4997061.

Li Y, Li Y, Mengist HM, Shi C, Zhang C, Wang B, et al. Structural basis of the pore-forming toxin/membrane interaction. *Toxins.* 2021;13(2):128. doi.org/10.3390/toxins13020128.

Lima GM, Corazza BJM, Moraes RM, de Oliveira FE, de Oliveira LD, Franco GCN, et al. The effect of an inhibitor of gut serotonin (LP533401) during the induction of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2016;51(5):661-8. doi.org/10.1111/jre.12346.

Lin A, Truong B, Patel S, Kaushik N, Choi EH, Fridman G, et al. Nanosecond-pulsed dbd plasma-generated reactive oxygen species trigger immunogenic cell death in a549 lung carcinoma cells through intracellular oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 2017 May 3;18(5):966. doi.org/10.3390/ijms18050966.

Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Tratado de periodontia clínica e implantologia.* 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p.105-71.

Liu D, Xiong Z, Du T, Zhou X, Cao Y, Lu X. Bacterial-killing effect of atmospheric pressure non-equilibrium plasma jet and oral mucosa response. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2017;31(6):852-6. doi.org/10.1007/s11596-011-0690-y.

Lunov O, Zablotskii V, Churpita O, Lunova M, Jirsa M, Dejneka A, et al. Chemically different non-thermal plasmas target distinct cell death pathways. *Sci Rep.* 2017 Apr;7(1):1-16. doi.org/10.1038/s41598-017-00689.

Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. *Microbiologia de Brock.* 14. ed. Porto Alegre: Artmed; 2016. p.1160.

Mahasneh A, Darby M, Tolle SL, Hynes W, Laroussi M, Karakas E. Inactivation of *Porphyromonas gingivalis* by low-temperature atmospheric pressure plasma. *Plasma Med.* 2011;1:3-4. doi:10.1615/PlasmaMed.2012002854.

Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong J, Murphy, AB. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci Rep.* 2016;1(6):1-11. doi.org/10.1038/srep38610.

Martirosyan D, Ghomi H, Ashoori MR, Rezaeinezhad A, Mirmiranpour H. The effect of cold plasma on antioxidant enzymes, minerals, and some of the levels of the biochemical parameters in the subjects with type 2 diabetes mellitus samples. *Bioact Compd Health Dis.* 2021;4(2):14-24. doi.org/10.31989/bchd.v4i2.783.

Maté SV, Mazón J, Piattelli P, Calvo-Guirado A, Mareque BJ, Granero MJ, et al. Comparison among the physical properties of calcium phosphate-based bone substitutes of natural or synthetic origin. *Int J Appl Ceram Technol.* 2018;15(4):930-7. doi.org/10.1111/ijac.12860.

Mayer MP, Bueno LC, Hansen EJ, Di Rienzo JM. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1999 Mar;67(3):1227-37. doi.org/10.1128/IAI.67.3.1227-1237.1999.

Mazhir SN, Hadi FW, Mazher AN, Alobaidy LH. Texture analysis of smear of leukemia blood cells after exposing to cold plasma. *Baghdad Sci J.* 2017;14:2. doi.org/10.21123/bsj.2017.14.2.0403.

Mohades S, Laroussi M, Maruthamuthu V. Moderate plasma activated media suppresses proliferation and migration of MDCK epithelial cells. *J Phys D Appl Phys.* 2017 Apr 7;50(18):185205. doi.org/10.1088/1361-6463/aa678a.

Morfill GE, Kong MG, Zimmermann JL. Focus on plasma medicine. *New J Phys.* 2009 Nov 26;11(11):115011. doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115011.

Motaln H, Recek N, Rogelj B. Intracellular responses triggered by cold atmospheric plasma and plasma-activated media in cancer cells. *Molecules.* 2021 Mar 2;26(5):1336. doi: 10.3390/molecules26051336.

Newman N. Carranza periodontia clínica. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. p.880.

Neyts EC, Brault P. Molecular dynamics simulations for plasma-surface interactions. *Plasma Process Polym.* 2017 Jan 1;14:1-2. doi.org/10.1002/ppap.201600145.

Nishime TMC, Borges AC, Koga-Ito CY, Machida M, Hein LRO, Kostov KG. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. *Surf Coat Technol.* 2017;312:19-24. doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.07.076.

Nissum M, Foucher AL. Analysis of human plasma proteins: a focus on sample collection and separation using free-flow electrophoresis. *Expert Rev Proteomics*. 2008 Aug;5(4):571-87. doi: 10.1586/14789450.5.4.571.

Norskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(9):2135-46. doi.org/10.1099/ijs.0.64207-0.

Oscarsson J, Claesson R, Lindholm M, Höglund-Åberg C, Johansson A. Tools of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* to evade the host response. *J Clin Med*. 2019;8(7):1079. doi.org/10.3390/jcm8071079.

Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:754857. doi: 10.1155/2011/754857.

Pan J, Sun K, Liang Y, Sun P, Yang X, Wang J, et al. Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *J Endod*. 2013;39(1):105-10. doi.org/10.1016/j.joen.2012.08.017.

Paolillo FR, Romano RA, de Matos L, Rodrigues PGS, Panhóca VH, Martin AA, et al. Fluorescence spectroscopy of teeth and bones of rats to assess demineralization: In vitro, in vivo and ex vivo studies. *J Photochem Photobiol B*. 2016;165:291-7. doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.10.035.

Papapanou PN, Susin C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? *Periodontol 2000*. 2017 Oct 1;75(1):45-51. doi.org/10.1111/prd.12200.

Paturel L, Casalta JP, Habib G, Nezri M, Raoult D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Feb 1;10(2):98-118. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00794.x.

Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol*. 2005;76(12):2187-93. doi.org/10.1902/jop.2005.76.12.2187.

Poulsen K, Tettelin H, Kilian M. The *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* genome: diversity of pathogenic potential. *Oral Microbial Communities*. *Am Soc Microbiol*. 2011;1:103-17. doi.org/10.1128/9781555817107.ch8.

Pourhajbagher M, Monzavi A, Chiniforush N, Monzavi MM, Sobhani S, Shahabi S, et al. A. Real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis of expression stability of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* fimbria-associated gene in response to photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;18:78-82. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.02.009.

Prakasam A, Elavarasu SS, Natarajan RK. Antibiotics in the management of aggressive periodontitis. J Pharm Bioallied Sci. 2012 Aug;4(2):S252. doi.org/10.4103%2F0975-7406.100226.

Preoteasa EA, Preoteasa ES, Suci I, Bartok R N. Atomic and nuclear surface analysis methods for dental materials: a review. AIMS Mater Sci. 2018;5(4):781-844. doi.10.3934/matensci.2018.4.781.

Puligundla P, Mok C. Potential applications of non-thermal plasmas against biofilm-associated microorganisms in vitro. J Appl Microbiol. 2017;122(5):1134-48. doi.org/10.1111/jam.13404.

Rupf S, Lehmann A, Hannig M, Schäfer B, Schubert A, Feldmann U, et al. Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. J Med Microbiol. 2010;59(2):206-12. doi.org/10.1099/jmm.0.013714-0.

Sabour S. A common mistake in assessing the diagnostic value of a test: failure to account for statistical and methodologic issues. J Nucl Med. 2017;58(7):1182-83. doi.org/10.2967/jnumed.115.156745.

Salavastru DI, Ovidiu R. Considerations regarding the use of experimental animal models in dental medicine-a literature review. AgroLife Sci J. 2020;9(1):288-95.

Schacher B, Baron F, Roßberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. J Clin Periodontol. 2007;34(7):566-73. doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01080.x.

Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Vollmar B, Woedtke T. A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. Exp Dermatol. 2017 Feb 1;26(2):156-62. doi.org/10.1111/exd.13156.

Schreiner H, Li Y, Cline J, Tsiagbe VK, Fine D H. A comparison of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) virulence traits in a rat model for periodontal disease. PloS One. 2013;8(7):e69382. doi.org/10.1371/journal.pone.0069382.

Schreiner HC, Sinatra K, Kaplan JB, Furgang D, Kachlany SC, Planet PJ, et al. Tight adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(12):7295-300. doi.org/10.1073/pnas.1237223100.

Seker BK, Ozdemir H. Assessment of pain perception after conventional frenectomy with application of cold atmospheric plasma. East J Med. 2020 Oct 1;25(4):558-64. doi. 10.5505/ejm.2020.37029.

Shetty B, Divakar DD, Al-Kheraif AA, Alharbi AO, Almutairi MST, Alanazi MM. Role of PDT as an adjunct to SRP on whole salivary RANKL and OPG ratio in type-2 diabetic and normoglycemic individuals with chronic periodontitis. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2021 Feb 18;34:102220. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102220.

Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull.* 1979;86(2):420. doi/10.1037/0033-2909.86.2.420.

Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol.* 1990 Aug;17:479-93. doi.org/10.1111/j.1365-2710.1992.tb01220.x.

Stratmann B, Costea TC, Nolte C, Hiller J, Schmidt J, Reindel J, et al. Effect of Cold Atmospheric Plasma Therapy vs Standard Therapy Placebo on Wound Healing in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open.* 2020 Jul;3(7):e2010411- e2010411. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.10411.

Tasaki T, Ohshima T, Usui E, Ikawa S, Kitano K, Maeda N, et al. Plasma-treated water eliminates *Streptococcus mutans* in infected dentin model. *Dent Mater J.* 2017;36(4):422-28. doi.org/10.4012/dmj.2016-358.

Tavares-da-Silva E, Pereira E, Pires AS, Neves AR, Braz-Guilherme C, Marques IA, et al. Cold Atmospheric Plasma, a Novel Approach against Bladder Cancer, with Higher Sensitivity for the High-Grade Cell Line. *Biology.* 2021 Jan;10(1):41. doi.org/10.3390/biology10010041.

Tonetti MS, Bottenberg P, Conrads G, Eickholz P, Heasman P, Huysmans MC, et al. Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing—Consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2017;44:S135-S44. doi.org/10.1111/jcpe.12681.

Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. *J Clin Periodontol.* 2005;32:210-3. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00822.x.

Tsai CC, Ho YP, Chou YS, Ho KY, Wu YM, Lin YC. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* leukotoxin and human periodontitis—A historic review with emphasis on JP2. *Kaohsiung J Med Sci.* 2018;34(4):186-93. doi.org/10.1016/j.kjms.2018.01.014.

Tsuzukibashi O, Takada K, Saito M, Kimura C, Yoshikawa T, Makimura M, et al. A novel selective medium for isolation of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J Periodontol Res.* 2008 Oct 1;43(5):544-8. doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.01074.x.

Van der Paal J, Verheyen C, Neyts EC, Bogaerts A. Hampering effect of cholesterol on the permeation of reactive oxygen species through phospholipids bilayer: possible explanation for plasma cancer selectivity. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-11. doi.org/10.1038/srep39526.

- Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species—bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev*. 2013 Nov 1;37(6):955-89. doi.org/10.1111/1574-6976.12026.
- Von Woedtke T, Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Weltmann KD. Plasma Medicine: A field of applied redox biology. *In Vivo*. 2019;33(4):1011-26. doi.org/10.21873/invivo.11570.
- Weltmann KD, von Woedtke T. Plasma medicine—current state of research and medical application. *Plasma Phys Control Fusion*. 2017 Nov 3;59(1):014031. doi.org/10.1088/0741-3335/59/1/014031.
- Winkelhoff AJ, Slots J. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in nonoral infections. *Periodontol 2000*. 1999 Jun;20(1):122-35. doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00160.x.
- Wong LB, Yap AU, Allen PF. Periodontal disease and quality of life: umbrella review of systematic reviews. *J Periodontal Res*. 2021;56(1):1-17. doi. 10.1111/jre.12805.
- Xu D, Liu D, Wang B, Chen C, Chen Z, Li D, et al. In situ OH generation from O₂⁻ and H₂O₂ plays a critical role in plasma-induced cell death. *PLoS One*. 2015 Jun 5;10(6):e0128205. doi.org/10.1371/journal.pone.0128205.
- Yamamoto K, Ohshima T, Kitano K, Noriyasu-Hosoya DM. The efficacy of plasma treated water as a root canal irrigant. *J APDSA (Tokyo)*. 2017 Jan;17(1):23-30.
- 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. doi.org/10.4012/dmj.2010-190.
- Yang B, Chen J, Yu Q, Li H, Lin M, Mustapha A, et al. Oral bacterial deactivation using a low-temperature atmospheric argon plasma brush. *J Dent*. 2011;39(1):48-56. doi.org/10.1016/j.jdent.2010.10.002.
- Yang Y, Guo J, Zhou X, Liu Z, Wang C, Wang K, et al. A novel cold atmospheric pressure air plasma jet for peri-implantitis treatment: An in vitro study. *Dental Mat J*. 2017;37(1):157-66. doi.org/10.4012/dmj.2017-030.
- Yoshida A, Bouziane A, Erraji S, Lakhdar L, Rhissassi M, Miyazaki H, et al. Etiology of aggressive periodontitis in individuals of African descent. *Jpn Dent Sci Rev*. 2021;57:20-6. doi.org/10.1016/j.jdsr.2020.12.001.
- Zhou W, Xiong Z, Liu Y, Yao C, Li C. Low voltage irreversible electroporation induced apoptosis in HeLa cells. *J Cancer Res Therapeut*. 2012 Jan 1;8(1):80. doi.10.4103/0973-1482.95179.

ANEXO —Certificado CEUA – Comissão de ética no uso de animais.



CERTIFICAMOS que o protocolo registrado sob o nº 01/2018, intitulado: - "Efeitos do plasma frio sob pressão atmosférica como adjuvante no controle da periodontite experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*." sob a responsabilidade de **CRISTIANE YUMI KOGA ITO**, tendo como colaboradores **GERALDO MAGNO ALVES DE ABREU** e **GABRIELA DE GÓLVEA LIMA** e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 06/04/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	06/04/2018 A 30/04/2021
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de Animais	30
Resilidade	6-8 semanas de idade, peso de 150-150 gramas
Sexo	MACHO
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 06 de abril de 2018

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