



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

MARIA ALCIONÉIA CARVALHO DE OLIVEIRA E CAMPOS

**APLICAÇÃO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA SOB
PRESSÃO ATMOSFÉRICA NO CONTROLE DE BIOFILMES
E REPARO INICIAL DE FERIDAS INFECTADAS**

2020

MARIA ALCIONÉIA CARVALHO DE OLIVEIRA E CAMPOS

**APLICAÇÃO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA SOB
PRESSÃO ATMOSFÉRICA NO CONTROLE DE BIOFILMES
E REPARO INICIAL DE FERIDAS INFECTADAS**

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: Patologia. Linha de pesquisa: Inflamação e reparação tecidual.

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

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. 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).

Campos, Maria Alcioneia Carvalho de Oliveira E

Aplicação do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica no controle de biofilmes e reparo inicial de feridas infectadas. / Maria Alcioneia Carvalho de Oliveira E Campos. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.

67 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, 2020.

Orientador: Cristiane Yumi Koga-ito

Coorientador: Gabriela de Moraes Gouvêa Lima

1. Biofilme. 2. Gases em plasma. 3. Ferida. I. Koga-ito, Cristiane Yumi , orient. II. Gouvêa Lima, Gabriela de Moraes , 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 (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profª Tit. Janete Dias Almeida

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profª Assoc. Mônica Fernandes Gomes

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Antonio Carlos Victor Canettieri

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Campus Urbanova

Profª. Dra. Marcia Hiromi Tanaka

Universidade de Santo Amaro (Unisa)

São José dos Campos, 13 de fevereiro de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, à minha orientadora, aos meus animais, aos meus amigos e ao meu marido, por ter me dado todo o apoio necessário para eu chegasse aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Titular Cristiane Yumi Koga Ito, por fazer de mim uma pessoa cada dia melhor, com muita competência, simplicidade e amor.

À minha co-orientadora Dra. Gabriela Moraes Gouvêa-Lima, por me auxiliar na realização desse trabalho.

Ao CNPQ pela concessão do Auxílio à Pesquisa, processo 405653/2016-6.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia/UNESP pela oportunidade.

Ao Departamento de Pós Graduação, Bruno Tanaka, Carolina Rei e Sandra Cordeiro, por sempre estarem dispostos a nos ajudar com respeito e carinho.

Aos amigos do laboratório Genoma, por todo o apoio.

Às minhas amigas “Genômicas” que a vida me agraciou Aline Sampaio e Sabrina Rovetta, por ensinar, ajudar, acolher e me fazer rir.

À minha amiga Clélia Aparecida, por estar sempre disponível para ajudar e também para acolher.

À Profa. Mônica Fernandes Gomes, por ter aberto as portas do mundo científico, e mesmo depois de tantos anos, continua iluminando a minha vida.

Ao servidor do biotério Sr. Toninho pela ajuda e apoio.

A todos, que de alguma forma me incentivaram ou ajudaram no cumprimento desta etapa.

"Lembre-se as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento "

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.1.1 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Caracterização do dispositivo do plasma	20
3.2 Avaliação do efeito do LTAPP sobre biofilmes relacionados a feridas.....	22
3.2.1 Avaliação do efeito do LTAPP sobre biofilmes monoespécie relacionados às feridas (Determinação das condições físicas efetivas)	22
3.2.2 Avaliação do efeito do LTAPP sobre biofilmes polimicrobianos relacionados às feridas	23
3.3 Avaliação dos efeitos citotóxicos <i>in vitro</i> do LTAPP.....	25
3.4 Avaliação dos efeitos genotóxicos <i>in vitro</i> do LTAPP.....	26
3.5 Avaliação <i>in vivo</i> do LTAPP em modelo de infecção polimicrobiana de feridas.....	28
3.5.1 Modelo murino de ferida	28
3.5.2 Modelo de úlcera dermal em coelhos.....	30
3.6 Avaliação histológica e imuno-histoquímica dos tecidos da região da ferida e tecidos adjacentes.....	32
3.7 Análise dos Resultados.....	33
4 RESULTADO	34
4.1 Avaliação do efeito do LTAPP sobre biofilmes monoespécie relacionados a feridas crônicas.....	34
4.2 Avaliação do efeito do LTAPP sobre biofilmes polimicrobianos relacionados às feridas crônicas.....	37
4.3 Avaliação dos efeitos citotóxicos <i>in vitro</i> do LTAPP.....	39

4.4 Avaliação dos efeitos genotóxicos in vitro do LTAPP	40
4.5 Avaliação <i>in vivo</i> do LTAPP em modelo de infecção polimicrobiana de feridas.....	42
4.6 Avaliação histológica e imuno-histoquímica dos efeitos do LTAPP sobre os tecidos da região da ferida e tecidos adjacentes.....	45
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático do dispositivo gerador de plasma frio de pressão atmosférica (LTAPP) a ser utilizado	20
Figura 2 – Jato de plasma (LTAPP) de plasma	21
Figura 3 – Biofilme multiespécie em membrana de colágeno suíno.....	24
Figura 4 – Análise de índice de DNA em células coradas por Feulgen.....	27
Figura 5 – Etapas da formação e tratamento das feridas com plasma.....	29
Figura 6 – Formação de feridas em modelo de úlcera dermal.....	31
Figura 7 – Delineamento experimental dos ensaios <i>in vivo</i> para avaliação do efeito de aplicações do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica como adjuvante no tratamento de feridas.....	32
Figura 8 – Média e desvio padrão do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>S. aureus</i> meticilina resistente por biofilme, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos.....	35
Figura 9 – Média e desvio padrão dos valores de unidades formadora de colônia (UFC) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / biofilme, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos.....	36
Figura 10 – Média e desvio padrão dos valores de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Enterococcus faecalis</i> / biofilme, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos.....	36

Figura 11 – Média e desvio padrão dos valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de <i>S. aureus</i> metilicina resistente, isolados a partir de biofilme multiespécie, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos.....	37
Figura 12 – Média e desvio padrão dos valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , isolados a partir de biofilme multiespécie, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos	38
Figura 13 – Média e desvio padrão dos valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de <i>Enterococcus faecalis</i> , isolados a partir de biofilme multiespécie, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos.....	39
Figura 14 – Análise da citotoxicidade do LTAPP expressa pelo percentual de viabilidade celular dos fibroblastos da linhagem 3T3 expostas por 1, 3, 5 e 7 minutos ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica. A avaliação da viabilidade celular foi avaliada imediatamente, após 24 e 48 horas após a exposição ao LTAPP.....	40
Figura 15 – Histograma de distribuição dos ID obtidos x número de células correspondentes.....	42
Figura 16 – Gráfico das médias dos valores de ID obtidos x tempo de tratamento com plasma.....	42
Figura 17 – Imagens representativas da análise macroscópica das feridas em camundongos, analisadas em diferentes períodos.....	44
Figura 18 – Imagens representativas da análise macroscópica das feridas em modelo de úlcera dermal em coelhos, analisadas em diferentes períodos.....	45

Figura 19 – Diminuição percentual da área da superfície da ferida em diferentes dias de período de reparação	45
Figura 20 – Diminuição percentual da área da superfície da ferida em diferentes dias de período de reparação em modelo de úlcera dermal em coelhos.....	46
Figura 21 – Cortes histológicos da região de ferida dos grupos analisados corados em HE, fotografados em microscópio óptico com aumento de 100x.....	48
Figura 22 – Cortes histológicos da região de ferida em coelhos, corados em HE, fotografados em microscópio óptico com aumento de 50x.....	49
Figura 23 – Cortes histológicos da região de ferida em coelhos (reação imuno-histoquímica com anticorpo anti Ki-67) fotografados em microscópio óptico com aumento de 200x.....	50

Campos MACO. Aplicação do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica no controle de biofilmes e reparo inicial de feridas infectadas [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

O manejo clínico e tratamento das feridas crônicas têm sido considerados grandes desafios nas áreas médicas. Infecções por biofilmes em feridas crônicas afetam milhões de pessoas no mundo a cada ano e muitas mortes ocorrem como consequência. O plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (LTAPP) é uma mistura gasosa contendo partículas carregadas, radicais livres e radiação. As ações biológicas das espécies reativas geradas concomitantemente, em particular antimicrobiana, anti-inflamatória e indutora de reparação tecidual, mostram-se altamente promissoras dentro do contexto do controle das feridas crônicas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos LTAPP frente a biofilmes monoespécie e multiespécies de micro-organismos frequentemente isolados de feridas crônicas. Além disso, objetivou-se avaliar estudar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do LTAPP nos parâmetros físicos eficazes para o controle dos biofilmes. A seguir, o protocolo eficaz e seguro foi avaliado *in vivo* utilizando modelo murino e modelo de úlcera dermal em coelhos. O LTAPP foi capaz de reduzir as UFC/mL de biofilmes monoespécie e mutiespécie a partir de 5 minutos de exposição. O LTAPP, nos parâmetros efetivos antibiofilme, apresentou-se seguro para uso em ensaios *in vivo*, pois não foi cito ou genotóxico. O tratamento com LTAPP levou à maior redução da área da ferida quando comparado ao grupo controle, em ambos os modelos de ferida com infecção polimicrobiana. Redução da resposta inflamatória foi observada no modelo de úlcera dermal no tempo de 8 dias. Não houve evidências de que o LTAPP aumente significativamente a proliferação celular. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o LTAPP acelera o processo de reparação de feridas, porém o mecanismo de ação ainda precisa ser elucidado.

Palavras-chave: Biofilme. Gases em plasma. Ferida.

Campos MACO. Application of low temperature plasma under atmospheric pressure in biofilm control and wound infected repair initial [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

The clinical management and treatment of chronic wounds have been considered one of the main challenges in the medical area. Biofilm infections in chronic wounds affect millions of people worldwide each year and many deaths occur as consequence. LTAPP is a gas containing charged particles, free radicals and radiation. The biological actions of the reactive species generated concomitantly, anti-inflammatory and tissue repair inducing, are highly promising within the context of chronic wound control. The aim of the present project is to evaluate the effects of low temperature plasma under atmospheric pressure (LTAPP) on mono and multispecies biofilms frequently isolated from chronic wounds. The cyto and genotoxic effects of LTAPP in the effective parameters were also assessed. The effective and safe protocol was tested in vivo using a murine model and a rabbit dermal ulcer model. LTAPP was able to reduce significantly the mono and multispecies biofilm after 5 minutes exposure. In the anti-biofilm effective parameters, LTAPP was not cyto or genotoxic. Treatment with LTAPP reduced significantly the wound area when compared to control in both animal models. Anti-inflammatory effect was observed in dermal ulcer model at 8 days. No evidences of increase in cell proliferation caused by LTAPP were noted. According to the results, it could be concluded that LTAPP enhanced the wound repair process, however the mechanism of action must be still elucidated.

Keywords: Biofilm. Plasma gases. Wound.

1 INTRODUÇÃO

O plasma é descrito como o quarto estado da matéria. O plasma pode ser gerado por diferentes tipos de gases, como gás nobre, gás molecular ou ainda uma mistura de gasosa. Nos sistemas geradores de plasma o gás passa entre eletrodos, nos quais é aplicada uma alta tensão, produzindo assim uma descarga elétrica (Laroussi, 2003). Assim, é possível gerar partículas carregadas, radicais livres e radiação onde o gás ionizado é composto de íons, por espécies reativas, partículas e moléculas neutras e elétrons, bem como átomos e moléculas excitados (Fridman et al., 2008; Gay-Mimbrera et al., 2016), resultando em danos de lipídios, proteínas e DNA, bem como o aumento de espécies reativas intracelulares (Laroussi et al., 2018).

O plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (LTAPP) tem sido o mais estudado, com a vantagem de operar a temperatura ambiente ou próxima a esta (Laroussi, 2009), tendo implicações positivas em estudos biológicos.

O plasma ganhou muito interesse nos últimos anos devido às aplicações em diversas áreas. Inicialmente, foi aplicado na descontaminação de biomateriais e equipamentos médicos (Kostov et al., 2010; O'Connor et al., 2014). Em seguida, começou a ser testado para aplicação direta em tecidos animais, tanto para assepsia, como tratamento de doenças cutâneas (Isbary, et al., 2012; Ulrich et al., 2015; Chatraie et al., 2018), neoplasias (Panngom et al., 2013; Gay-Mimbrera et al., 2016; Yan et al., 2017), além de aplicações odontológicas (Babington et al., 2015; Kim et al., 2014), obtendo resultados altamente promissores.

O papel de cada componente gerado pelo plasma na atividade biológica ainda permanece sendo alvo de estudos. Sugere-se que a atividade do plasma é dada por uma associação de fatores, sendo que os principais são o calor, radiação UV e espécies reativas neutras, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), cada fator influenciando em maior ou menor grau de acordo com os parâmetros utilizados (Weltmann et al., 2011).

De maneira geral, a eficácia do LTAPP dependerá do design do dispositivo, além dos parâmetros operacionais, como composição de gás, vazão, umidade, temperatura, tensão e frequência utilizada. (Dobrynin et al. 2009; Winter et al. 2011).

As diversas ações biológicas das espécies reativas geradas pelo plasma, concomitantemente, em particular as atividades antimicrobiana (Hoffmann et al., 2013; Bernhardt et al., 2019), anti-inflamatória e indutora de reparação tecidual (Chatraie et al., 2018), são extremamente promissoras no controle de diversas condições patológicas.

O efeito antimicrobiano foi observado sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras de interesse médico (Ermolaeva et al., 2012; Klämpfl et al., 2012; Delben et al., 2014; Kostov et al., 2015; Borges et al. 2018). Atividades antimicrobianas sobre biofilme monoespécie de *Streptococcus sanguinis* (Gorynia et al., 2013), *Enterococcus faecalis* (Li et al., 2013; Ureyen et al., 2014) e *Escherichia coli* (Han et al., 2015) já foram relatadas. A redução das colônias de *Pseudomonas aeruginosa* foi observada em tempos relativamente curtos de tratamento (Gabriel et al., 2016). Redução de biofilmes de *Candida albicans* (Kostov et al., 2015; Borges et al., 2018). e *Staphylococcus aureus* (Delben et al., (2014) foram relatados em estudos anteriores.

Com relação à atividade anti-inflamatória, Arndt et al. (2013, 2015) observaram elevação nos níveis de peptídeos antimicrobianos da família das β -defensinas em queratinócitos e fibroblastos e aumento na indução de colágeno do tipo I e proteína MCP-1 após tratamento com plasma frio gerado por um sistema MicroPlaSter β plasma torch system operando com argônio. Outra evidência de que o plasma pode possivelmente contribuir na inibição da cascata inflamatória que leva à destruição tecidual e ainda auxiliar a reparação local é mostrada em estudo de Brun et al. (2014). Esses autores demonstraram aumento da migração e proliferação de fibroblastos após tratamento com plasma frio gerado com hélio, em resposta ao estímulo na produção de ROS com consequente aumento na expressão de (PPAR)- γ , receptor nuclear modulador da resposta inflamatória. No entanto, não foi observada elevação nos níveis de interleucina (IL)-1 β , Fator de necrose tumoral (TNF)- α e Fator de crescimento transformador (TGF)- β . Recentemente, foi relatado o efeito do plasma de baixa temperatura com efeito positivo na microcirculação cutânea, aumentando a saturação de oxigênio tecidual e fluxo sanguíneo radial (Kisch et al., 2016).

O manejo clínico e tratamento das feridas crônicas têm sido considerados grandes desafios nas áreas médicas. Feridas crônicas são definidas como qualquer

lesão com solução de continuidade onde não ocorra reparação da integridade anatômica e funcional no período de três meses (Unasus, 2010). As úlceras de pé diabético, úlceras de perna e úlceras de pressão são as mais prevalentes (Frykberg, Banks, 2015). Estas úlceras têm duração média de 12 a 13 meses, tem recidiva em 60 a 70% dos pacientes, levam a perda de função e de qualidade de vida e são causa significativa de morbidade (Frykberg, Banks, 2015). Calcula-se que 2 a 3% dos investimentos em saúde nos países desenvolvidos sejam destinados ao tratamento dessa condição (Frykberg, Banks, 2015). O processo de reparação cutânea é altamente complexo, dependente de uma interação simultânea entre vários fatores altamente regulados (Karinja, Spector, 2018).

Estima-se que 1 a 2 % da população de países desenvolvidos terão ao menos uma ferida crônica durante a sua vida. Este número é crescente devido ao aumento da idade da população, do índice de massa corporal e da incidência de doenças associadas, como o diabetes e doenças cardiovasculares (Gottrup, 2004; Bjarnsholt, 2013; Brackman, Coenye, 2015). No Brasil, estudos apontam alta prevalência e incidência de feridas em pessoas idosas residentes em instituições e durante a internação hospitalar (Vieira et al., 2018).

Segundo Bjarnsholt (2013) e Julák et al. (2018), infecções por biofilmes em feridas crônicas afetam milhões de pessoas no mundo a cada ano e muitas mortes ocorrem como consequência. Assim, os biofilmes têm aparecido como um tópico de discussão crescente no tratamento de feridas crônicas (Kim, Steinberg, 2012; Chatraie et al., 2018). O ambiente úmido e constante suprimento de nutrientes na região da ferida representa um ambiente ideal para o crescimento microbiano (Brackman, Coenye, 2015). A presença de biofilmes afeta significativamente a reparação e o sucesso do tratamento de feridas (Wolcott, 2015; Bjarnsholt, 2013). Além disso, destaca-se a resistência aos antimicrobianos convencionais e a elevada capacidade de evadir das defesas imunológicas do hospedeiro (Bjarnsholt, 2013). O controle do biofilme é considerado fator crítico para o sucesso de alternativas terapêuticas mais recentes no tratamento de feridas, tais como o uso de tecidos alternativos obtidos por bioengenharia (Kim, Steinberg, 2012; Julák et al., 2018).

Os micro-organismos que infectam as feridas têm diferentes fontes exógenas (como o solo e a água) e endógenas (como pele, saliva, urina e fezes) (Brackman, Coenye, 2015). As infecções de feridas são geralmente de natureza

polimicrobiana (Gjodsbol et al., 2006). No entanto, os estudos sugerem que a diversidade de espécies é relativamente baixa, sendo *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* as espécies mais prevalentes (Fazli et al., 2009; Rhoads et al., 2012; Bjarnsholt, 2013). Outras espécies como *Acinetobacter baumannii*, *E. faecalis* (Craven et al., 2016) e *Klebsiella pneumoniae* também foram isoladas de feridas (Leung et al., 2014). A presença de determinadas espécies parece estar relacionada com a evolução clínica da ferida (Gjodsbol et al., 2006).

As alternativas terapêuticas têm focado na redução ou erradicação dos biofilmes por meio de técnicas de desbridamento, terapias tópicas, terapia de pressão negativa e ultrassom (Wolcott et al., 2015; Han, 2016; Tort et al., 2019). Mais recentemente, outros métodos de cobertura de feridas impregnadas com substâncias ou compostos com efeito antimicrobiano têm sido sugeridos, tais como violeta de genciana e azul de metileno (Edwards, 2016), mel (Oryan et al., 2016), *Aloe vera* (Panahi et al., 2015), polímero liberador de óxido nítrico (Craven et al., 2016), polihexametileno-biguanidas (Napavichayanun et al., 2016) e EDTA (Finnegan, Percival, 2015). A associação entre as técnicas de desbridamento e os antissépticos tem um importante papel no tratamento de feridas, porém a crescente incidência de infecções por espécies multirresistentes como as causadas por estafilococos meticilina resistente preocupam os sistemas de saúde. (Haertel et al., 2014; Edwards, 2016). Assim, estudos recentes indicam a urgência na busca por alternativas terapêuticas para o controle de biofilmes formados por patógenos comumente encontrados em feridas, visando melhor evolução destes quadros clínicos (Wolcott et al., 2015; Craven et al., 2016).

O sinergismo entre os efeitos antimicrobianos e sobre os fatores reguladores do processo de inflamação e reparação tecidual do LTAPP nos levam à hipótese de que o plasma possa ser aplicado com efeitos positivos no tratamento de feridas crônicas. Esta hipótese também foi citada anteriormente em revisões de literatura publicadas por Haertel et al. (2014) e Von Woedtke et al. (2014). Acredita-se que os efeitos antissépticos, estimulares da proliferação e migração celulares e os efeitos pró-angiogênicos do plasma podem ser promissores e aplicáveis no tratamento de feridas. No entanto, até o momento, existem poucos dados publicados sobre a ação do LTAPP na reparação de feridas. Autores sugerem que definição de parâmetros para tratamento padronizado e seguro é necessária. A potencial aplicação do

plasma para o controle de infecção em feridas é reforçada pelos estudos de Ermolaeva et al. (2012) e Han (2017), que avaliaram o efeito do plasma gerado por equipamento comercial e (MicroPlaSter β device) operado com argônio sobre biofilmes, formados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, de diferentes espécies comumente envolvidas neste quadro clínico.

A toxicidade é um fator essencial a ser estudado no estabelecimento de novas terapias. Porém, poucos estudos avaliaram o efeito do jato de plasma frio sobre tecidos do hospedeiro. Liu et al. (2011) não observaram alterações patológicas na mucosa bucal, por meio de análise histopatológica, depois de tratamento com um dispositivo gerador de plasma. Daeschlein et al. (2012) utilizaram um dispositivo gerador de plasma frio em pressão atmosférica para avaliar a capacidade de assepsia de pele, observando diminuição significativa na microbiota residente e contaminada experimentalmente, com boa tolerância dos voluntários ao tratamento (quanto à dor e calor). Todavia, há poucos relatos na literatura sobre o potencial genotóxico do jato de plasma. Ma et al. (2014) avaliou as propriedades genotóxicas do jato de plasma sobre células normais de fígado; que foram expostas ao plasma por 30 minutos e avaliadas por aproximadamente 20 gerações, não apresentando nenhuma instabilidade genômica. Em outro estudo, Wende et al. (2016) avaliou a exposição do plasma de argônio por 30 segundos sob queratinócitos humanos (HaCat) e fibroblastos (MRC5) concluindo que o que o tratamento com o plasma não apresentou potencial mutagênico. Sabe-se que lesões no DNA promovidas tanto por agentes físicos, químicos ou biológicos podem ser a etapa inicial de várias doenças crônico-degenerativas (Coppedè, Migliore, 2009; Boffeta, Islami, 2013; Leandro et al., 2013), dessa forma avaliar o potencial genotóxico dos protocolos de aplicação do LTAPP é essencial para embasar seu potencial de uso clínico.

Assim, o novo protocolo terapêutico pode ser proposto pois a hipótese de que o LTAPP tem importante efeito antimicrobiano sobre os biofilmes com potencial de infectar feridas crônicas, associado a efeito anti-inflamatório e indutor de reparação tecidual, sem causar danos às células normais, um novo protocolo terapêutico pode ser proposto. O entendimento dos mecanismos de ação e possível toxicidade e assim como a padronização e das condições físicas do plasma, são

essenciais para que estes novos e promissores achados possam ser aplicados na clínica em futuro próximo.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* e *in vivo* os efeitos do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (LTAPP) como adjuvante no controle de feridas agudas infectadas, visando estabelecer protocolos seguros e efetivos, verificar sua ação frente aos biofilmes microbianos e os tecidos do hospedeiro.

2.1.1 Objetivos específicos

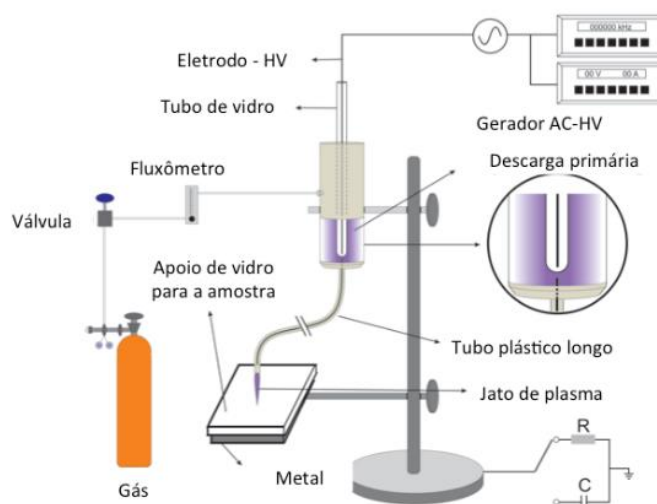
- a) estabelecer os parâmetros físicos de operação do LTAPP gerado com Hélio que apresentem efetividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* sobre biofilmes monoespécie e multi-espécies relacionados à infecção de feridas;
- b) avaliar os efeitos do LTAPP no controle do biofilme de feridas infectadas *in vivo*;
- c) avaliar os efeitos do LTAPP sobre os tecidos na região da ferida e adjacente;
- d) estudar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do LTAPP nos parâmetros físicos efetivos para o controle das feridas agudas infectadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização do dispositivo do plasma

O dispositivo de LTAPP empregado neste estudo consiste num equipamento não comercial desenvolvido e validado pelo grupo de plasma da UNESP, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (Kostov et al., 2015). Trata-se de um equipamento dielétrico, onde uma pequena pluma de plasma é gerada no final do tubo de plástico flexível. No interior deste tubo, há um tubo de cobre. Esse conjunto, tubo e fio são conectados ao reator primário, no qual a alta tensão está localizada. O sistema é mantido por uma Fonte de alimentação CA (Minipuls 4, GBS Elektronik GmbH, Alemanha). Um diagrama esquemático do arranjo experimental é apresentado na Figura 1.

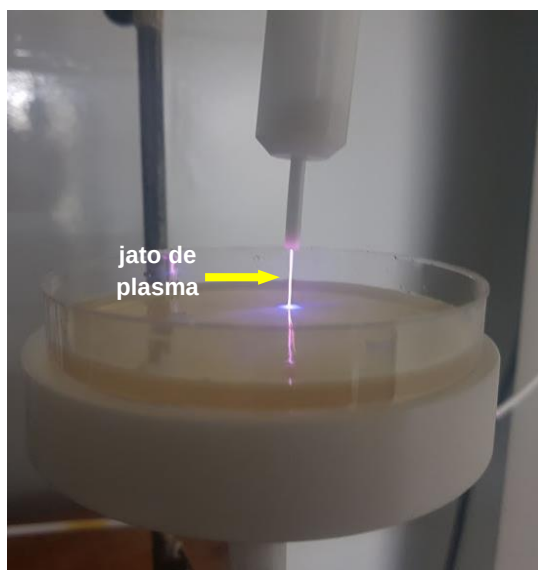
Figura 1 – Desenho esquemático do dispositivo gerador de plasma frio de pressão atmosférica (LTAPP) a ser utilizado



Fonte: Kostov et al., 2015.

O dispositivo apresenta uma haste de cobre conectada a uma fonte de alta tensão servindo como eletrodo de alta tensão. Esta haste metálica é envolvida por um tubo de quartzo. O plasma é gerado na região do eletrodo de alta tensão sendo direcionado para fora por meio do fluxo de gás hélio (Figura 2).

Figura 2 – Jato de plasma (LTAPP) de plasma



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os parâmetros físicos do plasma (frequência, tensão, modulação do sinal, fluxo do gás e distância entre o bocal de saída do plasma e a amostra) efetivos foram determinados durante os experimentos de avaliação da efetividade antimicrobiana e toxicidade. Assim, o jato de plasma foi operado na frequência de 31,0 kHz e amplitude de tensão de 13,0 kV para todos os tratamentos. A distância entre o gás e amostra foi de 1,5 cm entre o bocal e a amostra, o fluxo de gás foi mantido constante em 2.0 SLM.

3.2 Avaliação do efeito do LTAPP sobre biofilmes relacionados a feridas

Os seguintes micro-organismos foram incluídos neste estudo: *Staphylococcus aureus* sensível à metilina (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Todos os micro-organismos foram mantidos em caldo Tryptic soy acrescido de 20% de glicerol a -80°C até o momento da utilização.

3.2.1 Avaliação do efeito do LTAPP sobre biofilmes monoespécie relacionados às feridas (Determinação das condições físicas efetivas)

Para obtenção dos biofilmes monoespécies, culturas frescas de cada micro-organismo foram incubadas a 37°C em ágar TSB por 24 horas. Após o período de incubação, as células foram suspensas em solução salina (NaCl 0,9%) para obtenção de suspensões padronizadas por espectrometria (Micronal AJX-1600). Os valores de densidade óptica e concentração utilizados estão apresentados no quadro 1. Em seguida foram diluídas em caldo TSB, padronizando o inóculo em 10^6 células por mililitro.

Quadro 1 – Padronização e valores de leitura dos micro-organismos

Micro-organismo	Células por mililitro	λ	Densidade óptica
<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à metilina (ATCC 6538)	10^8	600	0,462
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	10^8	600	0,115
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212).	10^8	760	1,278

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os biofilmes monoespécies foram formados em placa de 96 poços. Assim, 200 µl (microlitros) do inóculo padronizado em 10^6 células por mL (mililitro) foram transferidos para as placas. Os biofilmes foram formados em poços intercalados, para evitar interferências na fase do tratamento. As placas foram incubadas a 37°C por 90 min (minutos) em shaker rotário a 120 rpm (rotação por minuto), para realização da pré-adesão. Em seguida, o meio foi substituído e as placas incubadas a 37°C por 48h (horas), com substituição do meio de cultura, após 24 h do início da incubação.

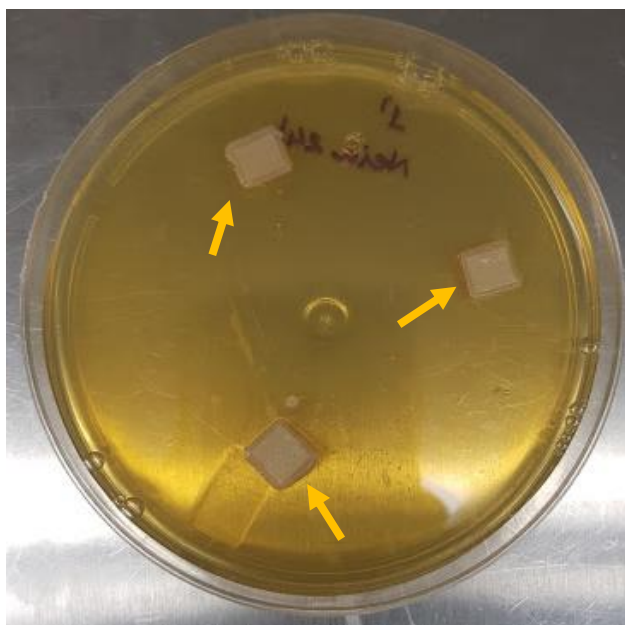
Após a incubação, os biofilmes foram lavados e expostos ao plasma nos tempos de 1, 3, 5 e 7 min. Foi incluído no estudo um grupo controle negativo, onde não foi exposto ao tratamento. Após o tratamento, o biofilme foi desprendido com 1 mL de NaCl, diluído e plaqueado em ágar BHI. As placas foram incubadas por 24 horas para verificar o crescimento e determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes.

3.2.2 Avaliação do efeito do LTAPP sobre biofilmes polimicrobianos relacionados às feridas

A metodologia desta etapa foi baseada nas metodologias de Werthén et al. (2010) e Hammond et al. (2011). Amostras de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (ATCC 33591), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram utilizadas. As cepas foram incubadas a 37°C em meio de cultura e tempo específicos para cada espécie. Após o período de incubação, foram preparadas suspensões padronizadas com concentração de 10^6 UFC por mililitro em solução fisiológica NaCl 0,9%, por espectrofotometria, conforme procedimento previamente descrito. Os inóculos foram misturados em tubo tipo Falcon em igual proporção. Em seguida, três amostras de membranas de colágeno suíno (Geistlich Bio-Gide®), previamente padronizadas em 25 mm², foram posicionadas na superfície de placas contendo ágar Tryptic Soy acrescido de solução SWF (50% de soro fetal bovino + 50% de solução fisiológica NaCl 0,9%) em

proporção 1:1. As membranas foram inoculadas com 10 µl da suspensão microbiana (Figura 3). Esta etapa objetiva mimetizar as condições observadas em feridas, utilizando um meio de cultura com constituição próxima ao exsudato associado à disponibilização do nutriente por difusão em fluxo de baixo para cima. Com este posicionamento, o modelo também mimetiza as condições interface ar-ferida-líquido observado *in vivo*. O conjunto foi incubado a temperatura de 37°C por 24 horas. O biofilme polimicrobiano foi exposto ao LTAPP por 1, 3, 5 e 7 minutos. Foi incluído no estudo um grupo controle negativo, onde os biofilmes não foram expostos ao tratamento. Após o tratamento, o biofilme foi disperso em 1 mL de solução fisiológica NaCl, diluído e plaqueado em ágar BHI. As placas foram incubadas por 24 horas para verificar o crescimento e determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em 3 experimentos diferentes.

Figura 3 – Biofilmes multiespécies formados sobre membranas de colágeno suíno



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Avaliação dos efeitos citotóxicos *in vitro* do LTAPP

Para avaliação dos efeitos celulares da aplicação do plasma sobre as células conjuntivas *in vitro*, foram cultivados fibroblastos da linhagem NIH-3T3 normais de pele. As células foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado por calor e suplementado com penicilina/estreptomicina 1% mantidos em câmara úmida a 90% com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após atingirem 80% de subconfluência, as células foram tripsinizadas, verificadas quanto à viabilidade celular e semeadas (1x10⁶ células) em placas de 96 poços. Esse procedimento foi realizado 24 h antes da aplicação do plasma. Após esse período de incubação, o meio de cultura foi retirado e 30µL de HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) foram adicionados em cada poço semeado com as células. Em seguida, essas células foram expostas ao LTAPP nos tempos de 1, 3, 5 e 7 min. Um grupo controle (não tratado) foi incluído no ensaio. As aplicações foram realizadas em triplicata e reproduzidas por 2 vezes.

A viabilidade celular foi avaliada em três grupos diferentes: imediato, 24 h (horas) e 48 h, após a exposição ao LTAPP. As análises foram realizadas pelo método colorimétrico MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Para os grupos 24 h e 48 h, após a aplicação do plasma, foram inseridos nos poços 200 µL de meio DMEM+SFB e esse conjunto incubado a 37 °C, 5 % CO₂ durante 24 ou 48 h. Para o grupo imediato, após a aplicação do plasma o grupo foi submetido imediatamente ao ensaio de MTT.

Para o ensaio de MTT, as células foram lavadas com HBSS e tampão aspirados foram inseridos 100 µL de solução de MTT a 5mg/ml e, em seguida, incubados por 4 horas. Após a incubação, a solução de formazan foi substituída por 50µL de DMSO (dimetilsulfóxido) com o objetivo de dissolver os cristais de formazan. Os valores de absorbância (570 nm) foram determinados, assim como a porcentagem de viabilidade celular considerando a absorbância do grupo não exposto ao jato de plasma como 100%.

Os percentuais de viabilidade celular foram classificados como não citotóxico (>90% de viabilidade celular), levemente citotóxico (60-90% de viabilidade celular) moderadamente citotóxico (59-30% de viabilidade celular) e severamente citotóxico

(29-0% de viabilidade celular) sendo o controle negativo considerado como 100 % de viabilidade celular (ISO 10993).

3.4 Avaliação dos efeitos genotóxicos in vitro do LTAPP

Para avaliação da genotoxicidade, foram analisadas a ploidia do DNA celular. As células da linhagem NIH-3T3 foram cultivadas seguindo a metodologia de Felisbino et al. (2011), com algumas modificações.

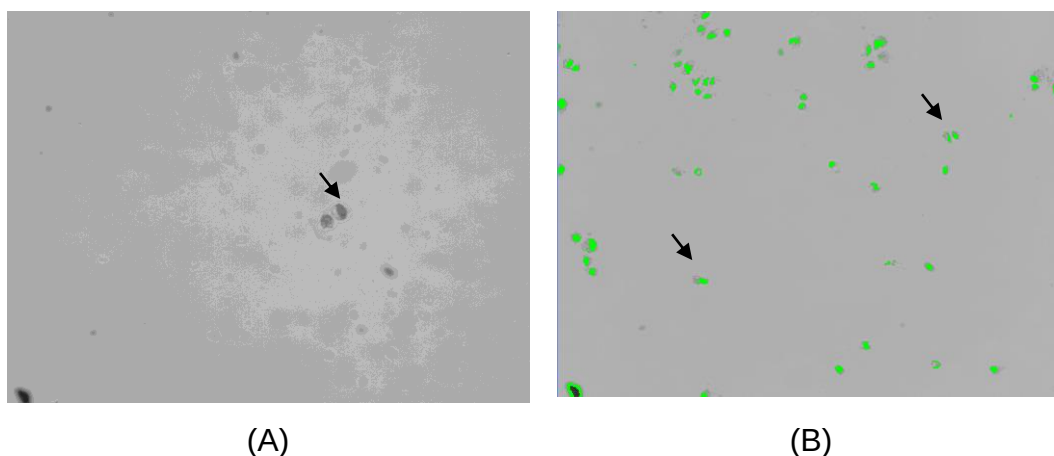
Assim, 5×10^4 células por mililitro foram semeadas em placas de 96 poços, por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com LTAPP por 1, 3, 5 e 7 min, em triplicata, incluindo o controle como grupo não tratado.

A avaliação da genotoxicidade do LTAPP foi realizada pela análise de ploidia celular utilizando-se o método de citometria estática. Para tanto, foram semeados cerca de 4 mil fibroblastos (3T3) e por poço, em placa de 96 poços. Para cada tempo de tratamento, as células foram semeadas em triplicata e mantidas no meio específico por 24 horas, a 37°C em estufa de CO₂. Transcorrido esse tempo, as células foram lavadas com 100 µl de HBSS, e em seguida foram adicionados 50 µl de HBSS em cada poço para o tratamento com plasma. As células foram então tratadas com plasma frio de He por 1, 3, 5 ou 7 minutos. Foi incluído um grupo não tratado. Após o tratamento, o meio HBSS residual foi retirado e adicionados 200 µl do meio específico para cada célula. As placas permaneceram na estufa de CO₂ por 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados e as células tratadas com tripsina. Em seguida, foram fixadas com formol a 4% e transferidas para lâminas de vidro. Depois de secas, as lâminas foram coradas pelo método de Feulgen. Brevemente, foi realizada a hidrólise celular através de HCl 5N, por 5 min em temperatura ambiente, seguida por coloração com Reagente de Shiff, por 90 min a 4°C, as células foram então desidratadas e após imersão em xilol, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck Millipore) e lamínula de vidro.

A obtenção da IOD (densidade óptica integrada) do núcleo celular foi realizada citometria estática. As imagens foram digitalizadas através de câmera Olympus QColor3 em aumento de 400x. Em seguida, o sistema de análise de

imagem Carl Zeiss e o software KS300 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) foram utilizados. As imagens foram capturadas e analisadas em branco e preto utilizando-se filtro específico para Feulgen que possibilita leitura da OD em comprimento de onda de 570 nm. A obtenção da IOD é equivalente, porém não idêntica ao conteúdo de DNA. Foi analisado um total de 100 células.

Figura 4 – Análise de índice de DNA em células coradas por Feulgen e analisadas pelo programa KS 300



Legenda: (A) Imagens com filtro de Feulgen evidenciando o núcleo celular. (B) Imagem analisadas no programa KS 300.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Posteriormente, foi obtido o índice de DNA (ID) usando-se a IOD de linfócitos humanos usados como controle diplóide. Os linfócitos foram obtidos de sangue periférico em lâminas de vidro e posteriormente analisados pelo mesmo sistema de imagem e condições das demais células analisadas. Para se chegar ao ID celular dos linfócitos, foi atribuído IOD igual a 1 para a média da IOD de 20 linfócitos (célula controle) e a partir dela obtido o ID das células analisadas dividindo-se o IOD da célula deste pela média IOD dos linfócitos. O ID desse pico foi então classificado como diplóide ($ID = 0.9-1.1$), aneuploidia leve ($ID = 1.2-1.4$), aneuploidia moderada ($ID = 1.5-1.7$) e aneuploidia severa ($ID > 1.8$), baseados no estudo de Lima et al (2017).

A partir dos valores de ID x o número de células foram obtidos histogramas da frequência de distribuição dos valores de ID por grupo.

3.5 Avaliação *in vivo* do LTAPP em modelo de infecção polimicrobiana de feridas

Esta etapa foi realizada utilizando dois modelos experimentais diferentes: um modelo murino de ferida crônica (Dalton et al., 2011) e outro modelo de úlcera dermal em coelhos (Gurjala et al., 2011; Leung et al., 2014). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Local em Pesquisa com animais (09/2017).

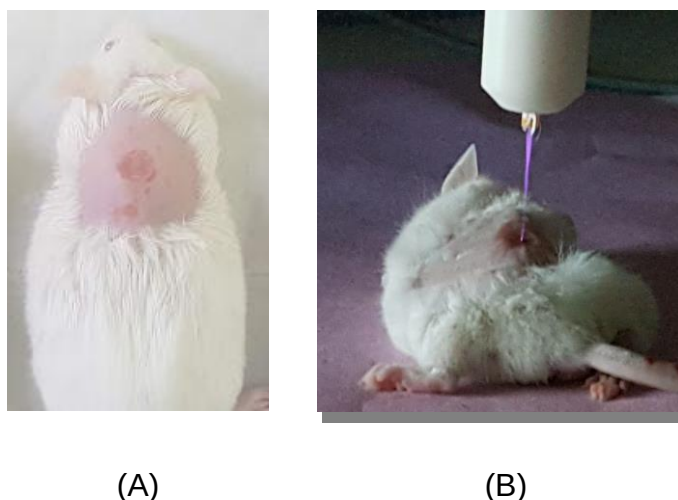
3.5.1 Modelo murino de ferida

Para o modelo murino de ferida crônica (Dalton et al., 2011), 40 camundongos *Mus musculus*, com peso aproximado de 30 g e 60 dias de idade, foram anestesiados com solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3tiazina (Rompum, Bayer) associada a ketamina base (Dopalen, Agribrands do Brasil Ltda), na proporção de 1:0,5 ml/100 g de peso do animal.

Os animais foram higienizados com álcool 70% e em seguida submetidos à tricotomia. No dorso do animal, foi realizada a marcação da área da ferida, com auxílio de um punch de 6 mm de diâmetro. A área demarcada foi excisionada com auxílio de instrumentos cirúrgicos (Figuras 5a e 5b).

Os animais foram aleatoriamente classificados em quatro grupos: LTAPP 4 dias (n=10; tratados com plasma após a indução da ferida em parâmetros de tempo e intensidade obtidos nos experimentos anteriores); controle 4 dias (n=10, sem tratamento); LTAPP 8 dias (n=10; tratados com plasma após a indução da ferida em parâmetros de tempo e intensidade obtidos nos experimentos anteriores); controle 8 dias (n=10, sem tratamento) (Figura 7).

Figura 5 – Etapas da formação e tratamento das feridas com LTAPP



Legenda: (A) Feridas em modelo murino; (B) Aplicação do LATPP sobre a ferida.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Previamente, biofilmes multiespécie crescidos em membrana de colágeno suíno foram preparados, conforme descrição anterior. Os biofilmes foram pesados e quantidades padronizadas foram posicionadas em cima da ferida (Figura 3) Para estabelecer a infecção, os biofilmes permaneceram por 24 horas sob a ferida, antes do início do tratamento. Para confirmação da presença das espécies microbianas inoculadas, uma amostra do biofilme presente na ferida foi coletada com auxílio de um swab, e em seguida semeada em meios seletivos para identificação de cada micro-organismo. O período após 24 horas da indução da ferida, foi considerado o dia 0, e o processo de reparação foi avaliado, do dia 1 ao dia 8º. As feridas foram observadas e avaliadas diariamente a partir do dia 0 para verificar o processo de reparação

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente de biotério com temperatura e ciclos de luz controlados com água e ração ad libitum. As feridas foram cobertas com curativos Tegaderm sem Pad Nexcare®. Os animais foram medicados com dipirona 200mg/kg, durante as 24 horas iniciais após a confecção da ferida. Os animais foram examinados diariamente para verificação da evolução clínica da ferida e manutenção dos curativos.

No grupo tratado com plasma, as feridas foram tratadas com aplicação de plasma 1 vez ao dia durante 3 dias consecutivos. O tempo de exposição de

aplicação foi selecionado de acordo com os resultados obtidos frente a atividade antimicrobiana. A distância entre a superfície da ferida e a saída do bocal do dispositivo gerador de LTAPP foi de 1,5 cm.

As feridas foram fotografadas nos dias 1, 4 e 8, de acordo com cada grupo. A área da superfície foi calculada usando o software de análise de imagem ImageJ 1.49. A taxa de fechamento da ferida foi calculada de acordo com Chatraie et al., 2018:

$$\left[1 - \left(\frac{\text{área da ferida } T_f}{\text{área da ferida } T_0}\right)\right] \times 100$$

Nos tempos 4 e 8 dias, grupos de 10 animais foram eutanasiados pela administração de dose excessiva de anestésicos (Figura 7). Nos períodos citados, foram analisados a porcentagem de fechamento da ferida. Foram realizadas medidas imediatamente após a formação da ferida e antes da eutanásia de cada grupo.

3.5.2 Modelo de úlcera dermal em coelhos

Dez coelhas fêmeas brancas New Zealand (de 3 a 6 meses, com peso aproximado de 3 quilos) foram mantidas em condição de biotérios com temperatura e ciclo de luz controlados, com água e alimento ad libitum. Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de ketamina (22,5 mg/kg) e xilazina (3,5 mg/kg) antes da cirurgia. As orelhas foram tricotomizadas, seguindo-se anti-sepsia com álcool 70%.

Os animais foram aleatoriamente classificados em quatro grupos. Foram confeccionadas 2 feridas por orelha. Na orelha contra-lateral, foi submetida apenas ao fluxo de gás He não ionizado (controle negativo). Foram estabelecidos os seguintes grupos: LTAPP 4 dias (n=5; tratados com plasma após a indução da ferida em parâmetros de tempo e intensidade obtidos nos experimentos anteriores);

controle 4 dias (n=5, sem tratamento); LTAPP 8 dias (n=5; tratados com plasma após a indução da ferida em parâmetros de tempo e intensidade obtidos nos experimentos anteriores); controle 8 dias (n=5, sem tratamento) (Figura 7), sendo que em cada orelha foi realizado duas feridas. Feridas dermais de espessura total com 5 mm de diâmetro foram criadas na área central da região ventral da orelha até o pericôndrio.

As feridas foram inoculadas biofilmes multiespécies contendo *S. aureus* metilicina resistente (ATCC 33591), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *E. faecalis* (ATCC 29212) obtidos *in vitro*, como descrito anteriormente. Após a cirurgia, as feridas foram cobertas com Tegaderm sem Pad Nexcare®.

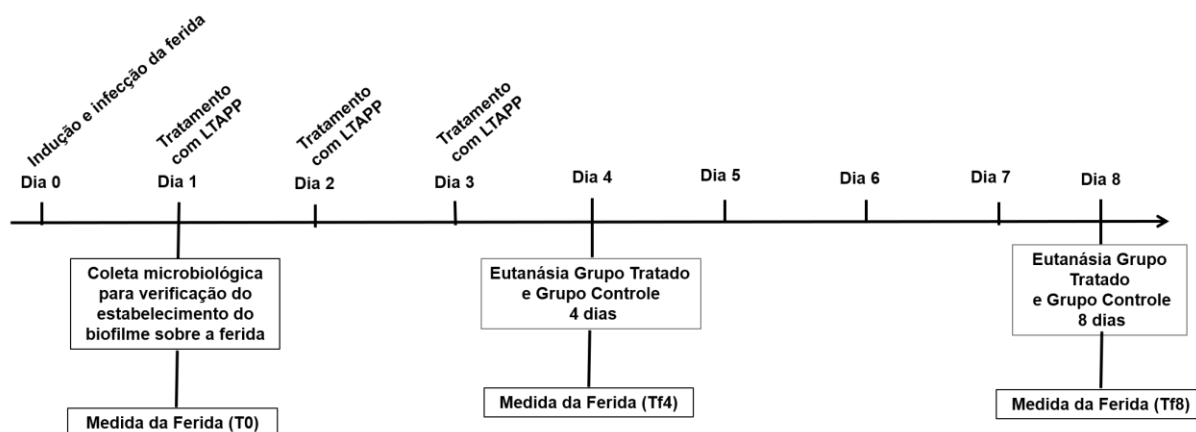
Os animais foram mantidos por 24 horas para o estabelecimento dos biofilmes antes da aplicação do tratamento. O período após 24 horas da indução da ferida, foi considerado o dia 0, e o processo de reparação foi avaliado, do dia 1 ao dia 8º. Os animais foram examinados diariamente para verificação da evolução clínica da ferida e manutenção dos curativos, conforme descrito anteriormente para o modelo murino de ferida.

Figura 6 – Formação de feridas em modelo de úlcera dermal em coelhos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Delineamento experimental dos ensaios *in vivo* (modelo murino e modelo de úlcera dermal) para avaliação do efeito de aplicações do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica como adjuvante no tratamento de feridas



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Avaliação histológica e imuno-histoquímica dos tecidos da região da ferida e tecidos adjacentes

Os tecidos da ferida e região adjacente tratados ou não com LTAPP foram removidos no momento do sacrifício e mantidos em álcool 70% após fixação em paraformaldeído a 4% por 48 horas. A seguir, foram processados e incluídos em Paraplast e posteriormente cortadas em fatias de 5 µm colocadas em lâminas de vidro. Três lâminas de cada animal foram coradas em HE (hematoxilina-eosina) para avaliação descritiva das estruturas teciduais, presença, tipo e intensidade de infiltrado inflamatório.

Para análise imunohistoquímica, cortes de 3-µm foram posicionados em 3 lâminas silanizadas. Foram utilizados o anticorpo primário anti- Ki-67(Abcam) na diluição de 1:100, para avaliação da proliferação celular e o anticorpo secundário o sistema EnVision™ Flex (Dako, Dinamarca). A recuperação antigênica foi feita em tampão citrato em panela de Pascal por 30 segundos a 125°C. A área da lesão e subjacente foi delimitada usando a ferramenta de desenho em Axiovision 4.7

software program (Carl Zeiss Vision Imaging Systems; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany, Germany).

3.7 Análise dos Resultados

Os dados obtidos nos ensaios foram analisados estatisticamente com auxílio do programa GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Para empregar o teste mais adequado, foi realizado um teste de normalidade da distribuição amostral. Em seguida os resultados foram analisados através do teste Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

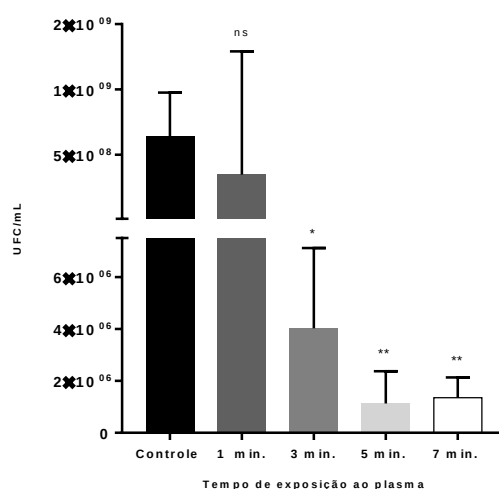
4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito do LTAPP sobre biofilmes monoespécie relacionados a feridas crônicas

Os biofilmes monoespécies de 48 horas foram tratados com o LTAPP em diferentes tempos de aplicação de exposição. Os resultados mostraram que houve significativa diminuição das contagens de UFC por mL em relação ao controle não tratado.

Para o biofilme de 48 horas monoespécie de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), as análises mostraram que houve redução significativa na contagem de células viáveis durante a exposição de 3 ($p = 0,0140$), 5 ($p < 0,0001$) e a 7 minutos ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle (Figura 8).

Figura 8 – Média e desvio padrão do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente por biofilme, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos.

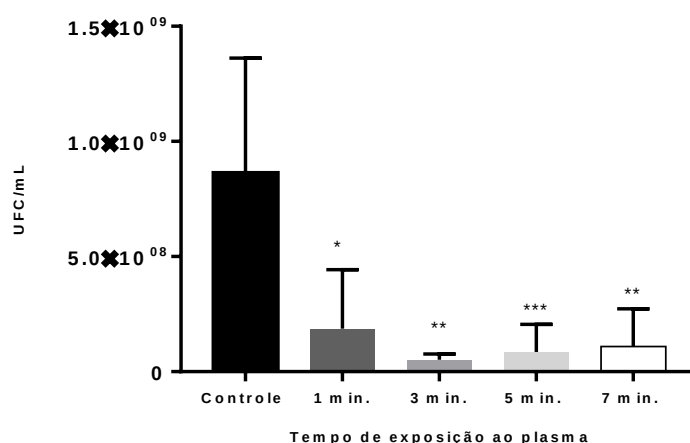


Legenda: Diferença significativa quando comparada ao controle (* $p = 0,0140$; ** $p > 0,0001$); ns: não significativo

Fonte: Elaborado pelo autor.

O mesmo efeito foi observado para o biofilme de *Enterococcus faecalis*, onde nos tempos de 1, 3 5 e 7 ($p=0,0187$, $p=0,0063$, $p=0,0006$, $p=0,0046$, respectivamente) minutos de exposição ao plasma, houve redução significativa das UFC/ml quando comparadas ao grupo controle (Figura 9). Para os biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, as análises confirmaram redução significativa de UFC/mL em relação ao controle não tratado no tempo de exposição de 7 minutos ($p=0,0441$) (Figura 10).

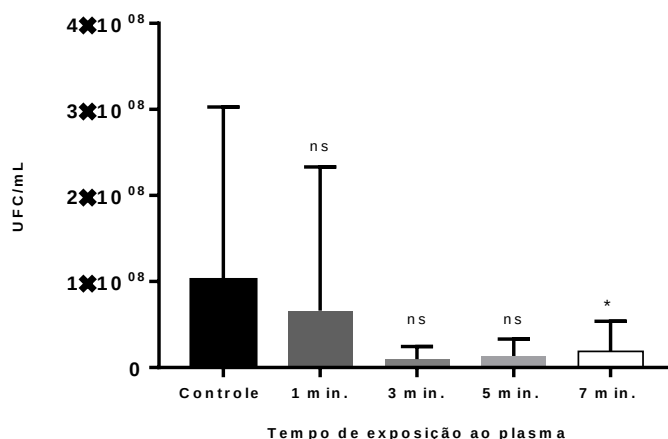
Figura 9 – Média e desvio padrão dos valores de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Enterococcus faecalis* / biofilme, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos



Legenda: Diferença significativa quando comparada ao controle (* $p=0,0187$; ** $p=0,0063$; *** $p=0,0046$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Média e desvio padrão dos valores de unidades formadora de colônia (UFC) de *Pseudomonas aeruginosa* / biofilme, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3 , 5 e 7 minutos



Legenda: Diferença significativa quando comparada ao controle (* p= 0,0441); ns:não significativo
 Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Avaliação do efeito do LTAPP sobre biofilmes polimicrobianos relacionados às feridas crônicas

Os biofilmes multiespécies de 24 horas foram tratados com o LTAPP em diferentes tempos de aplicação de exposição. Os biofilmes multiespécies compostos por *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (ATCC 33591), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram expostos ao LTAPP por 1, 3, 5 e 7 minutos, levando à redução significativa do número de células viáveis das três espécies quando comparado ao grupo controle não tratado. O tempo de 5 minutos promoveu a maior redução nas contagens microbianas.

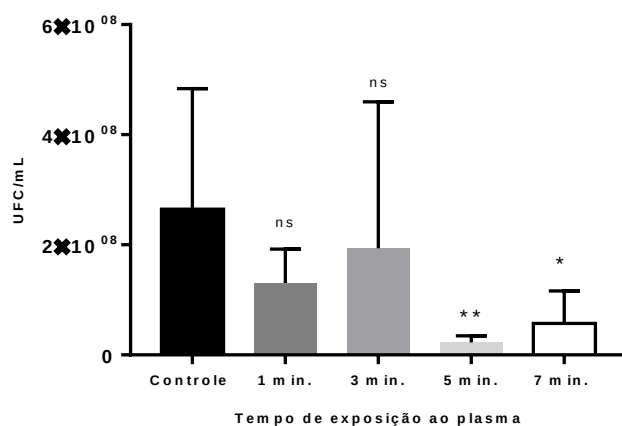
Analisando individualmente as espécies microbianas que compuseram o biofilme multiespécies, verifica-se que para *S. aureus* metilicina resistente houve redução significativa na contagem de unidades formadoras de colônia/mL após exposição ao LTAPP por 5 e 7 minutos (p=0,0001 e p= 0,0180) (Figura 11).

Quando *P. aeruginosa* foi isolada a partir do biofilme multiespécie, verificou-se redução significativa na contagem de unidades formadoras de colônia /mL após

exposição ao LTAPP por 5 minutos em relação ao grupo controle não exposto ($p=0,006$) (Figura 12).

Para *E. faecalis*, houve redução significativa na contagem de unidades formadoras de colônia /mL em todos os tempos de tratamento .

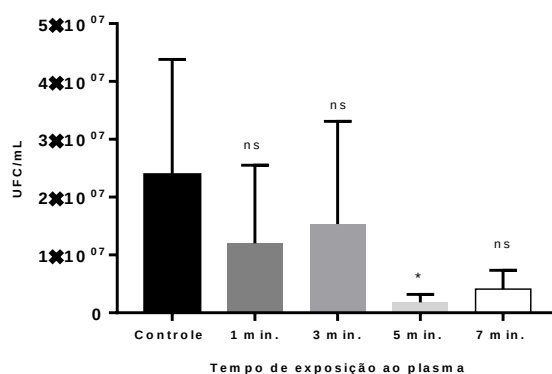
Figura 11 – Média e desvio padrão dos valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de *S. aureus* meticilina resistente, isolados a partir de biofilme multiespécie, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos



Legenda: Diferença significativa quando comparada ao controle (* $p < 0,0001$, ** $p = 0,00180$); ns: não significativo

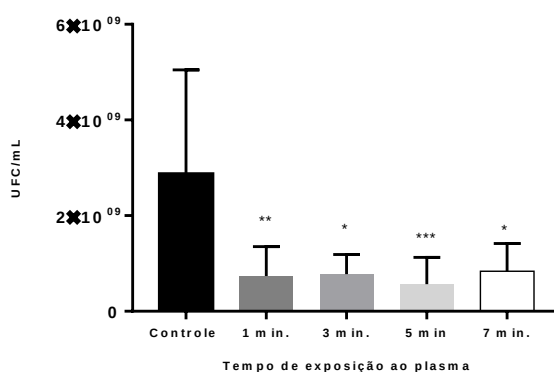
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Média e desvio padrão dos valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de *Pseudomonas aeruginosa*, isolados a partir de biofilme multiespécie, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos



Legenda: Diferença significativa quando comparada ao controle (* p = 0,0006); ns:não significativo
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Média e desvio padrão dos valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de *Enterococcus faecalis*, isolados a partir de biofilme multiespécie, após exposição ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica por 1, 3, 5 e 7 minutos



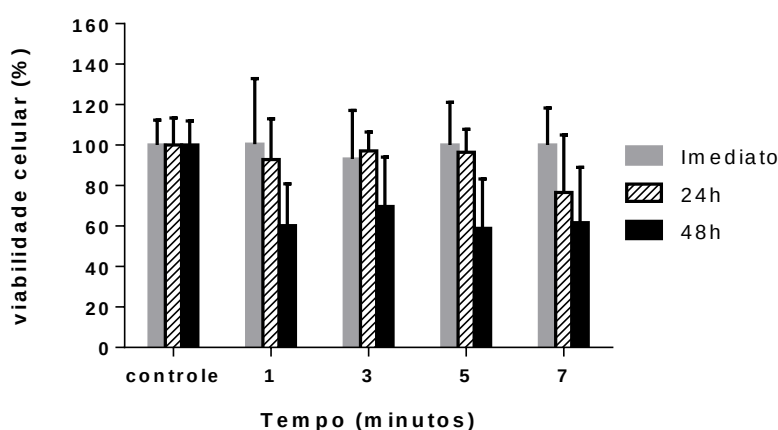
Legenda: Diferença significativa quando comparada ao controle (* p = 0,0186; ** p=0,0069, *** p=0,0006); ns:não significativo
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Avaliação dos efeitos citotóxicos *in vitro* do LTAPP

Fibroblastos da linhagem 3T3 foram expostas ao jato de plasma durante 1, 3, 5 e 7 minutos. A viabilidade celular analisada imediatamente após a exposição ao plasma foi classificada como não citotóxica, pois apresentou 100% de viabilidade celular quando comparada ao controle não-exposto. Após 24 horas da exposição ao plasma, manteve-se a viabilidade celular classificada como não citotóxica durante o tempo de aplicação de 1 a 5 minutos. A exposição por 7 minutos, manteve 80% de viabilidade celular, sendo classificado como levemente citotóxico.

Após 48 horas da exposição ao plasma, em todos os tempos analisados, a viabilidade celular foi classificada como levemente citotóxico (Figura 14).

Figura 14 – Análise da citotoxicidade do LTAPP expressa pelo percentual de viabilidade celular dos fibroblastos da linhagem 3T3 expostas por 1, 3, 5 e 7 minutos ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica. A avaliação da viabilidade celular foi avaliada imediatamente, após 24 e 48 horas após a exposição ao LTAPP



Legenda: não citotóxico (>90% de viabilidade celular), levemente citotóxico (60-90% de viabilidade celular) moderadamente citotóxico (59-30% de viabilidade celular) e severamente citotóxico (29-0% de viabilidade celular)

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Avaliação dos efeitos genotóxicos in vitro do LTAPP

De acordo com os resultados obtidos, para as células 3T3, todos os grupos poderiam ser classificados com aneuploidia leve ($ID \geq 1,2$), no entanto, como mesmo o grupo não tratado (NT) apresentou ID média de 1,27, podemos considerar que o tratamento com plasma não foi genotóxico. Pela análise estatística (Kruskal-Wallis) da dispersão, apenas os grupos tratados por 3 e 5 minutos apresentaram diferença significativa em relação ao controle não tratado (Quadro 2), tendo, porém, os valores de mediana dentro do intervalo de aneuploidia leve.

Nas Figuras 15 e 16 vemos o histograma de distribuição dos ID obtidos x número de células e a média dos valores de ID obtidos x tempo de tratamento com plasma, respectivamente, para as células 3T3.

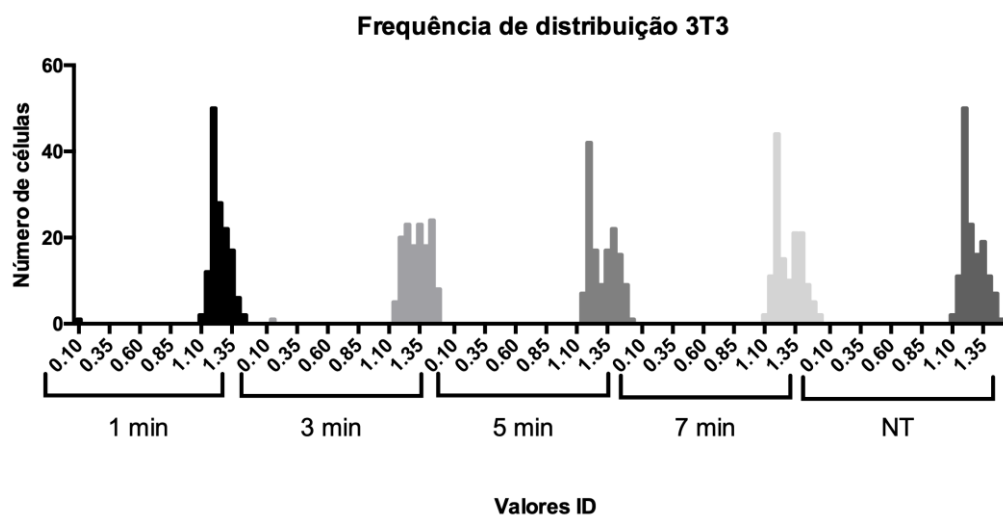
Quadro 2 – Média e Desvio padrão do índice de DNA (ID) obtido por análise de citometria estática dos núcleos de células 3T3 (fibroblastos), tratadas com LTAPP por 1 minuto (P1), 3 minutos (P3), 5 minutos (P5) e 7 minutos (P7)

	P1	P3	P5	P7	NT	valor de p
Mediana	1,24	1,33*	1,30*	1,27	1,24	< 0,001
Média	1,25	1,32	1,31	1,29	1,27	
Desvio padrão	0,12	0,14	0,11	0,11	0,09	

Legenda:* Diferença significativa em relação ao grupo controle não tratado (NT)

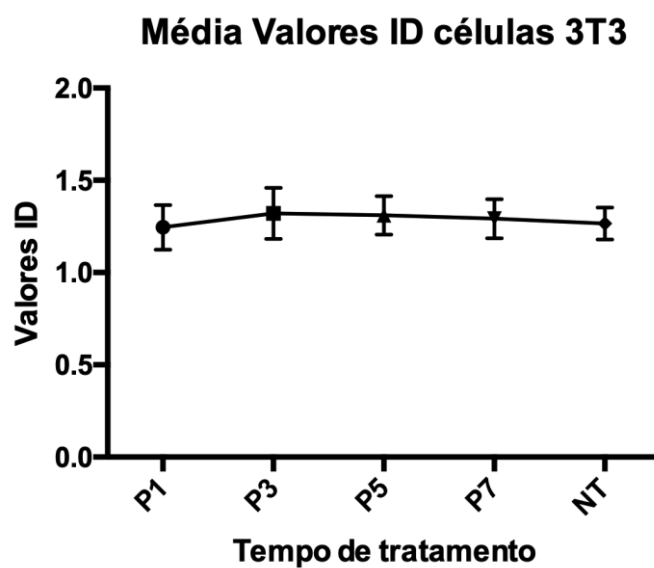
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Histograma de distribuição dos índices de DNA (ID) obtidos x número de células correspondentes



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Gráfico das médias dos valores de índice de DNA (ID) obtidos x tempo de tratamento com plasma



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Avaliação clínica *in vivo* do LTAPP em modelo de infecção polimicrobiana de feridas

A partir dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, foi selecionado o tempo de exposição ao LTAPP de 5 minutos, devido à comprovada atividade antimicrobiana e baixa toxicidade.

As Figuras 17 e 18, ilustram essas avaliações. Observa-se que houve grande variação nas superfícies das feridas entre os grupos tratado e controle tanto para o modelo urinho, quanto para o modelo de úlcera dermal. A variação também ocorreu na análise do tamanho das feridas durante o período de reparação.

A área da ferida e a diminuição percentual no tamanho da ferida foram calculadas e relatadas nas Figuras 17 e 18. Não foram detectadas diferenças significativas na área das feridas entre grupos tratados com plasma e controle no dia 4. No dia 8, as áreas das feridas do grupo tratado com LTAPP foram significativamente menores que as do grupo controle ($p < 0,05$).

No modelo urinho, para o grupo tratado com LTAPP 4 dias, a medida da área da ferida, após 24 horas da sua indução foi de $40,14 \pm 8,75$ mm, observando-se redução para $24,81 \pm 8,38$ mm. No grupo não tratado com LTAPP, as feridas mediam inicialmente de $28,73 \pm 18,90$ mm e ao final de 4 dias $19,64 \pm 9,38$ mm. O grupo exposto ao LTAPP levou à maior redução da área da ferida quando comparado ao grupo controle, sendo que a diferença entre os dois grupos foi de 21%.

Para o grupo tratado com LTAPP 8 dias, após 24 horas da indução da ferida a área da ferida era $37,67 \pm 15,49$ mm, observando-se redução para $16,81 \pm 10,58$ mm. No grupo não tratado com LTAPP, as feridas mediam inicialmente de $33,97 \pm 10,11$ mm e ao final de 8 dias $26,49 \pm 7,68$ mm. O grupo exposto ao LTAPP levou à maior redução da área da ferida quando comparado ao grupo controle, sendo que a diferença entre os dois grupos foi de 58%. O grupo não tratado ao LTAPP apresentou um aumento do tamanho da ferida em relação à mensuração após 24 horas de sua indução.

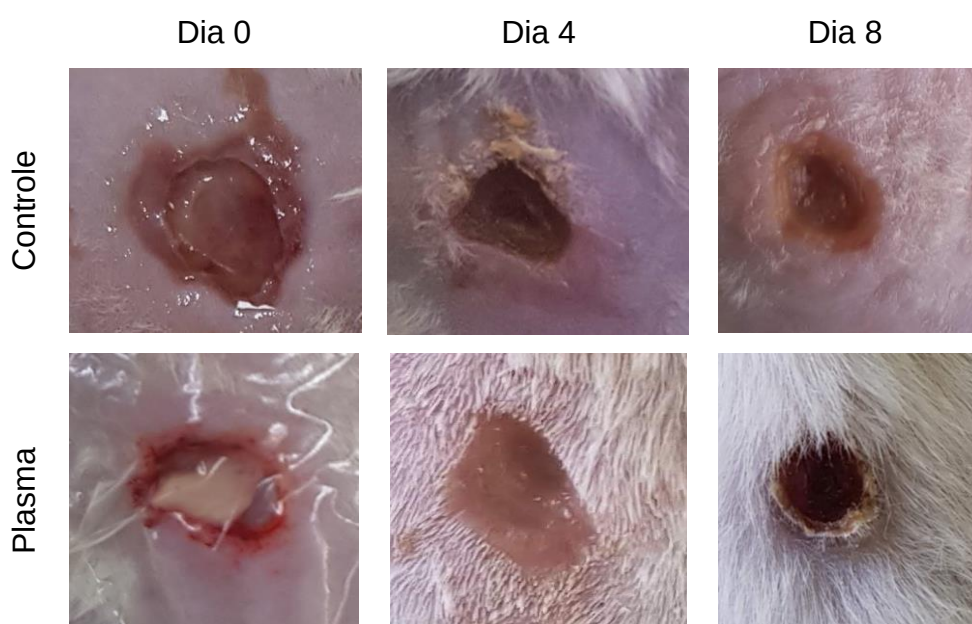
No modelo de úlcera dermal, o tamanho médio da área inicial da ferida, no grupo 4 dias, era 28 ± 0 mm, observando-se uma redução para $25 \pm 1,58$ mm no grupo

controle. Já no grupo exposto ao LTAPP a redução foi em torno de 38%, onde a ferida inicial apresenta uma área de $28 \pm 0,33$ mm com redução para $16 \pm 1,30$ mm.

Para o grupo tratado com LTAPP 8 dias, foram observados redução da área da ferida de $28 \pm 1,1$ mm para 15 ± 10 . No grupo controle a medida inicial era de 28 ± 1 mm reduzindo para 20 ± 8 mm.

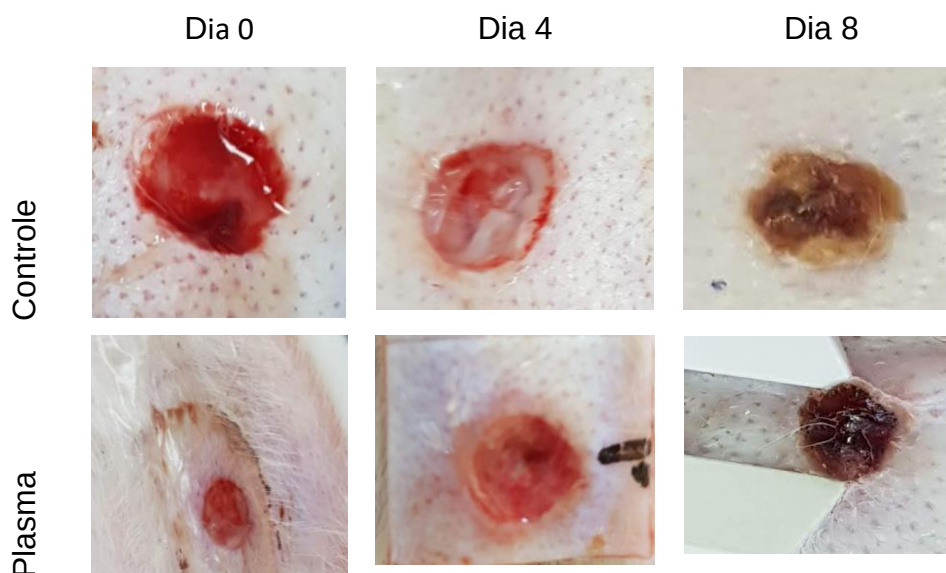
Assim, verifica-se que houve redução do tamanho do diâmetro da ferida em todos os grupos, no decorrer do tempo no grupo tratado com LTAPP em relação ao grupo controle. As feridas tratadas com LTAPP foram significativamente menores do que as do grupo controle negativo ($p < 0,05$).

Figura 17 – Imagens representativas da análise clínica (macroscópica) das feridas em camundongos, analisadas em diferentes períodos



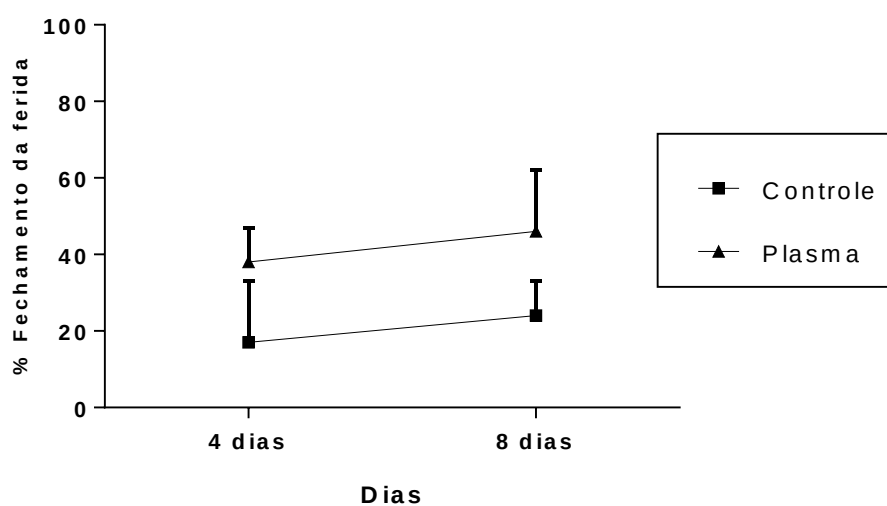
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Imagens representativas da análise clínica (macroscópica) das feridas em modelo de úlcera dermal em coelhos, analisadas em diferentes períodos



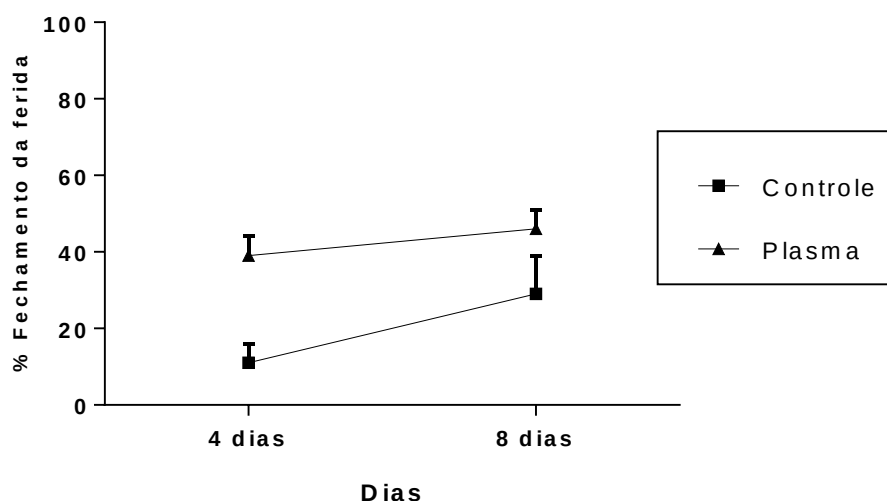
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 – Diminuição percentual da área da superfície da ferida em diferentes dias de período de reparação



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 - Diminuição percentual da área da superfície da ferida em diferentes dias de período de reparação em modelo de úlcera dermal em coelhos



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Avaliação histológica e imuno-histoquímica dos efeitos do LTAPP sobre os tecidos da região da ferida e tecidos adjacentes

Os cortes histológicos dos tratados e grupo controle o dorso de camundongo, corados com hematoxilina e eosina, mostram que a epiderme próxima a região de ferida sofre alterações inflamatórias sendo comum observar hiperplasia epitelial, espongiose, hiperqueratose e exocitose. Na região de ferida há descontinuidade do epitélio de revestimento, que é substituído por membrana fibrino-purulenta que se continua em direção ao tecido conjuntivo (derme), dando lugar a intenso infiltrado inflamatório misto, mono e polimorfonuclear, que se difunde pela derme profunda, inclusive camada muscular. Na região de derme é possível observar edema, maior na região subepitelial, numerosos vasos sanguíneos dilatados e áreas de hemorragia.

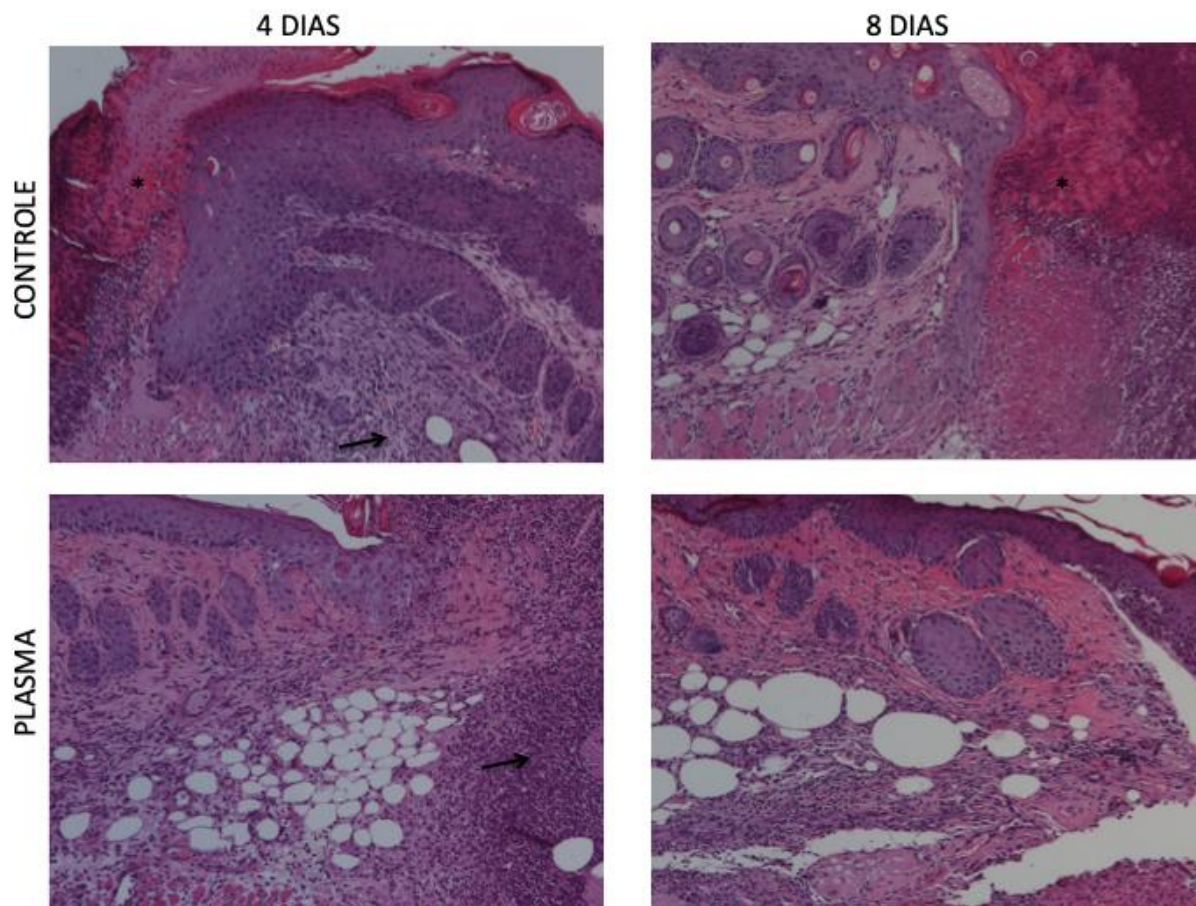
Aos 8 dias, o tecido se mostra em reorganização, sendo que o infiltrado inflamatório se apresenta mais profundo na derme e é possível observar fibroblastos ativos, principalmente na região subepitelial. Ainda, o infiltrado inflamatório

apresenta maior número de células mononucleares. A membrana fibrino-purulenta ainda recobre a região de ferida. O plasma frio parece não ter mudado a condição do tecido nos cortes de pele tratados com LTAPP, não é possível observar membrana fibrino-purulenta nítida como nos controles, porém acredita-se que isso deva-se à técnica de preparação das amostras, uma vez que tanto epiderme como derme se mostram em condições muito similares aos controles, tanto aos 4 como aos 8 dias.

Os cortes corados com anticorpo anti-Ki-67 por técnica imuno-histoquímica não apresentaram marcação em nenhum dos grupos, o que atribuímos à técnica durante a reação, já que o processo proliferativo é contínuo na região da camada basal do epitélio.

Os cortes histológicos das feridas em orelha de coelho mostram quadro semelhante ao dorso de camundongos, com ferida recoberta por membrana fibrino-purulenta que se continua na profundidade da derme com infiltrado inflamatório, predominantemente polimorfonuclear. A inflamação se estende até a região de cartilagem de suporte da orelha. Diferentemente do dorso de camundongos, a região de epiderme que circunda a ferida, mostra sinais inflamatórios mais amenos, como degeneração hidrópica, acantose e exocitose. Na região de derme pode-se observar grandes fibroblastos ativos desde os 4 dias e o processo de remodelação parece mais lento que nos camundongos, sendo que o infiltrado inflamatório ainda é intenso aos 8 dias, desde a região subepitelial até a profundidade do tecido. Não se observa edema marcante como na ferida dos camundongos, mas sim numerosos vasos sanguíneos dilatados e áreas de hemorragia. O LTAPP parece não ter mudado a condição do tecido aos 4 dias, porém aos 8 dias, o infiltrado inflamatório subepitelial é menos marcante e concentra-se principalmente circundando a região de cartilagem, de maneira menos intensa.

Figura 21 – Cortes histológicos da região de ferida dos grupos analisados corados em HE, fotografados em microscópio óptico com aumento de 100x

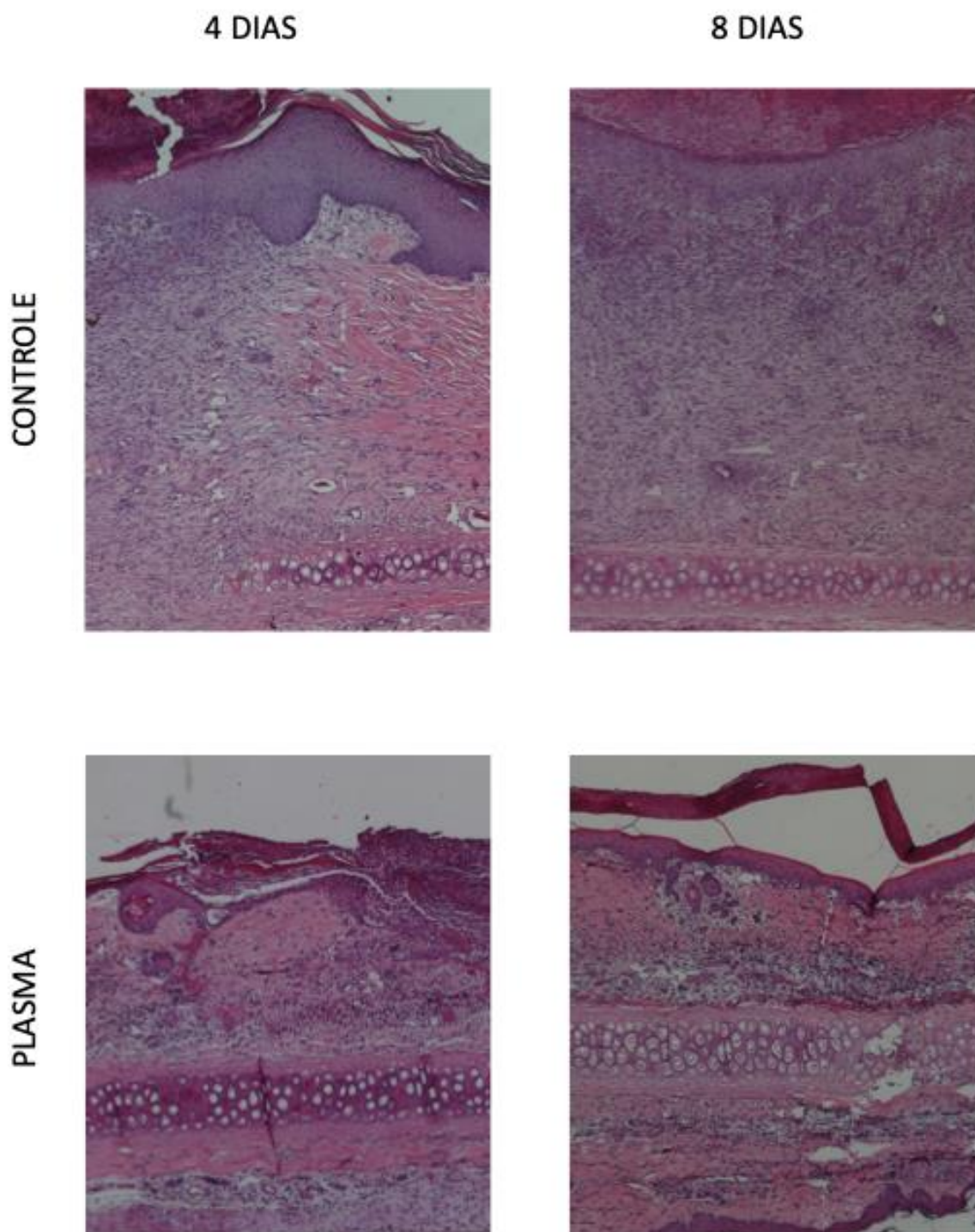


Legenda: * Membrana fibrino-purulenta; seta: infiltrado inflamatório misto circundando vasos sanguíneos dilatados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

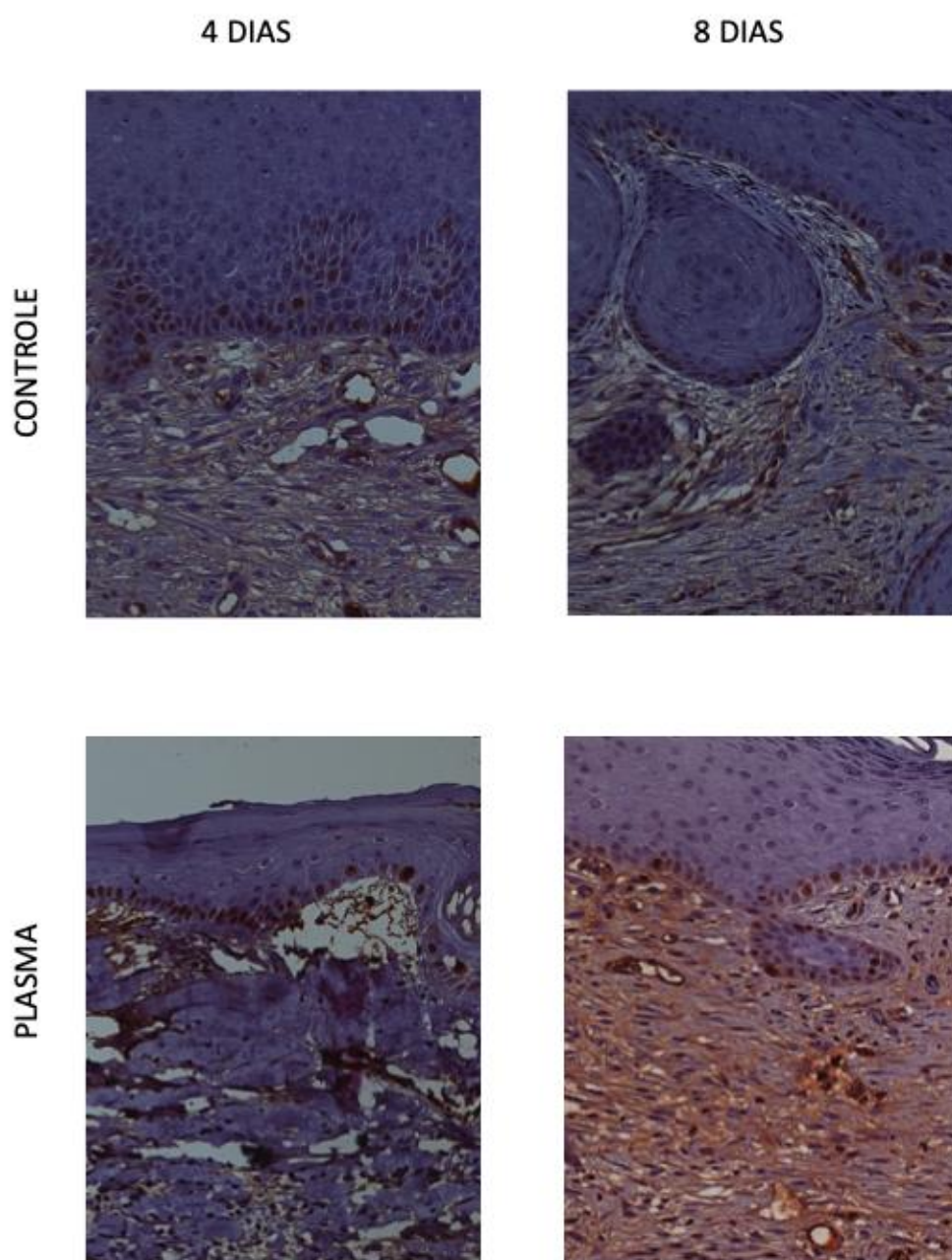
Os cortes corados com anticorpo anti-Ki-67 por técnica imuno-histoquímica mostram proliferação fisiológica na camada basal do epitélio que não foi alterada com o uso do plasma em nenhum dos tempos estudados. O padrão de marcação permanece similar nos grupos tratados e não tratados, como pode-se observar na Figura 23, demonstrando que o LTAPP não influencia no processo proliferativo epitelial.

Figura 22 – Cortes histológicos da região de ferida em coelhos, corados em HE, fotografados em microscópio óptico com aumento de 50x



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Cortes histológicos da região de ferida em coelhos (reação imuno-histoquímica com anticorpo anti Ki-67) fotografados em microscópio óptico com aumento de 200x



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o LTAPP é um método de tratamento seguro, que contribui positivamente para o processo de reparação de feridas. Neste estudo, foi realizada inicialmente a padronização *in vitro* da potência, tensão de entrada e a distância da saída do jato à superfície a ser tratada para obtenção de efetiva ação antibiofilme. Após a verificação da efetividade antimicrobiana, o protocolo foi avaliado quanto à toxicidade para células eucarióticas para permitir a aplicação *in vivo*. Por fim, esse protocolo foi aplicado em experimentos *in vivo* a fim de analisar macro e microscopicamente os efeitos teciduais do plasma no tratamento de feridas contaminadas experimentalmente.

Os diferentes dispositivos de plasma, assim como diferenças de parâmetros de tratamento e metodologia, como potência de entrada, vazões de gás e tempo de aplicação e frequência, a distância entre o alvo e dispositivo de plasma e as densidades celulares utilizadas, podem levar a diferentes ações biológicas (von Woedtke, 2014), enquanto alguns tipos de células são particularmente mais suscetíveis para o tratamento do que outros. Dessa forma, a padronização inicial das condições físicas do plasma é essencial para qualquer estudo biológico.

O primeiro objetivo deste estudo foi demonstrar que o dispositivo gerador de LTAPP poderia reduzir a infecção microbiana presentes em feridas crônicas. Para tanto, foram selecionados três micro-organismos (*S. aureus* resistente à metilicina, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*) para formação de biofilme de multi-espécies. A seleção baseou-se na prevalência em infecções crônicas de feridas (Fazli et al., 2009; Rhoads et al., 2012; Bjarnsholt, 2013). Não foram detectados estudos anteriores sobre a ação do LTAPP em biofilmes multi-espécies associados a feridas.

Embora essas espécies sejam frequentemente detectadas associadas em infecções de feridas, existem poucos estudos demonstrando essas espécies em forma de biofilme multiespécie. A maioria dos estudos, se concentra em analisar infecções relacionadas ao biofilme de uma única espécie microbiana. Estudos anteriores demonstram uma promissora aplicação do plasma frio para o tratamento frente a biofilmes monoespécies. Alkawareek et al. (2012) utilizou plasma de gás Hélio e oxigênio, frente a biofilme de *P. aeruginosa* e observou que na exposição por

10 segundos, levou à redução no número de células viáveis; Bayliss et al. (2013), realizou pré-tratamento do *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) com plasma por 30 segundos seguido de exposição aos antibióticos e observou redução da viabilidade celular em 0,5 log. Gabriel et al. (2016) demonstrou a eficácia antimicrobiana com uma redução de 5 log na população de *P. aeruginosa* após exposição por 90 segundos.

Em nosso estudo, foi demonstrada redução das unidades formadoras de colônias de *S. aureus* meticilina resistente após exposição ao LTAPP. A redução da viabilidade do biofilme, foi estatisticamente significativa para a exposição ao plasma por 5 e 7 minutos. Resultados similares foram descritos por Brun et al. (2018) que analisaram a eficácia na inativação bacteriana em biofilmes de *S. aureus* meticilina resistente, crescidos por 5 dias, expondo ao plasma de gás Hélio associado a antibióticos, obtendo taxas de morte mais rápida, do que os aplicados aos antibióticos isoladamente. Em outro estudo, com plasma de pressão atmosférica N₂, Wang et al. (2018), demonstrou redução das populações bacterianas após 5 minutos de exposição ao plasma frente a biofilmes de *S. aureus*.

P. aeruginosa é uma bactéria formadora de biofilmes complexos com quantidades significativas de material da matriz. É conhecida por sua patogenicidade diversa, sendo um patógeno oportunista que causa uma ampla variedade de infecções agudas e persistentes em humanos. Além disso, é resistente a tratamentos antibióticos de amplo espectro Alkawareek et al., 2012. Em nossos resultados, não foi observada redução significativa da viabilidade de biofilme monoespécie de *P. aeruginosa* após exposição ao LTAPP. Esse resultado pode ser associado à permeabilidade reduzida da parede celular desse micro-organismo, à similaridade do que se observa para a resistência frente aos antimicrobianos convencionais (Barraud et al., 2006).

No presente estudo, a viabilidade do biofilme monoespécie (48 h) de *E. faecalis* foi reduzida após exposição ao LTAPP a partir de 1 minuto. Esse resultado difere de estudos anteriores que relataram efetividade do plasma em reduzir a viabilidade de biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212) após 10 minutos de exposição Theinkom et al. (2019). As diferenças entre as efetividades podem estar relacionadas a diferentes configurações do equipamento gerador de plasma, assim como o gás e a cepa utilizada.

Os resultados mostraram que o LTAPP tem ação antimicrobiana frente a biofilmes multiespécies frequentemente encontrados em feridas, do que qual por ser um método alternativo e seguro, para tratamento nessas feridas. O tempo suficiente para fechamento completo da ferida, ainda deve ser estudado, entretanto observou-se que após 8 dias de observação após a indução da ferida, o LTAPP conseguiu reduzir a área da ferida e a quantidade de micro-organismo presente nas feridas.

Os resultados desse estudo demonstraram que o LTAPP reduziu a infecção bacteriana frequentemente presente nas feridas, o que sugere potencial significativo para aplicação clínica. Modic et al. (2017) em um estudo de biofilmes polimicrobianos (*S. aureus* metilicina resistente, *P. aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*) sugere que *P. aeruginosa* é a espécie que mais se beneficia da cultura de espécies mistas, por ocupar um nicho mais protegido no biofilme ou que suas defesas oxidativas são ativadas mais fortemente nesses biofilmes do que em sistemas de espécies únicas. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo apontaram *Enterococcus faecalis* como o microrganismo mais suscetível dentro de biofilmes multiespécies.

O modelo de biofilme polimicrobiano obtido sobre membrana de colágeno suíno forneceu fortes evidências de que configurações definidas de LTAPP podem reduzir a infecção bacteriana de forma altamente eficaz em modelos complexos. Entretanto, em estudos futuros, é importante compreender qual é a arquitetura dos biofilmes multiespécies e a relação de dependência de cada microrganismo dentro dele (Modic et al., 2017). Essa análise detalhada poderá trazer informações importantes para aprimoramento do protocolo utilizado.

A ação antimicrobiana do plasma atmosférico frio é produto de uma ampla variedade de espécies reativas, tais como ozônio, espécies reativas de oxigênio e dióxido de nitrogênio (Wang et al., 2018). Essas espécies reativas derivadas do plasma são geradas de maneira livre de contato e não são diferenciadas frente às diferentes cepas bacterianas. Assim, o amplo espectro é uma grande vantagem em comparação com antibióticos que visam apenas estruturas alvo específicas (Brun et al., 2018). Nesse sentido, sugere-se que o LTAPP pode ter ação superior aos antibióticos e antissépticos tradicionais, os quais estão se tornando ineficientes devido aos mecanismos de resistência. A hipótese é de que a chance do desenvolvimento de resistência ao LTAPP é menor, já que nenhum alvo específico

parece estar ativo, mas sim vários alvos simultâneos (Jacofsky et al., 2014; Matthes et al 2014). No entanto, estudos futuros devem ser realizados para esclarecer os mecanismos moleculares da ação do LTAPP e possíveis mecanismos de desenvolvimento de resistência.

Na segunda parte deste estudo, foram avaliados a citotoxicidade e genotoxicidade do LTAPP. Os estudos publicados sobre a segurança biológica do plasma são limitados e a ausência de uma definição padrão da aplicação do plasma, bem como diversidade de parâmetros, são algumas dificuldades para comparação dos resultados (Boehm et al., 2018). O efeito citotóxico foi estudado sobre fibroblastos da linhagem 3T3, o LTAPP apresentou baixa citotoxicidade quanto aplicado nos tempos de 1 a 7 minutos de exposição ao LTAPP, com viabilidade celular superior a 80%. De acordo com a ISO 10993, ensaios que apresentam viabilidade celular acima de 70% não apresentam potencial citotóxico (Borges et al., 2018). Em estudos anteriores, Gumbel et al. (2017) demonstrou que as células conseguem se regenerar, após 24 h e 48 h após a exposição ao plasma. Resultados similares foram observados nesse estudo.

Os resultados obtidos corroboram com os ensaios realizados por Borges et al (2018) onde a viabilidade celular do LTAPP foi testada sob células Vero, em apresentado viabilidade celular foi superior a 70% para as condições testadas.

Para analisar a genotoxicidade, o ensaio de micronúcleo *in vitro* é frequentemente utilizado. Kaushik et al. (2012) expôs células de neoplasia maligna do cérebro humano a plasma DBD por 30 e 240 segundos e verificou aumento tempo-dependente na formação de micronúcleos. Em um experimento *in vivo* utilizando ovos de galinha para micronúcleos, Kluge et al. (2016) não encontraram aumento na formação de micronúcleos em célula do sangue, em qualquer tempo de tratamento com plasma por 90 a 300 segundos. Os autores utilizaram os sistemas de plasma kINPen MED, jato de argônio e concluíram que o seu uso não apresentava riscos mutagênicos. Em outro ensaio de citometria de imagem para analisar os efeitos mutagênicos do plasma atmosférico frio em linfócitos de camundongo, Bekeschus et al. (2018) usando o jato de plasma kINPen, não observou formação de micronúcleos em qualquer tempo de exposição.

Analisar os resultados de toxicidade celular e genotoxicidade, é fundamental para aplicações em medicina e saúde. Assim, os resultados obtidos confirmaram a

segurança biológica para uso deste equipamento e permitiram a realização dos ensaios *in vivo*. Dessa forma, os resultados apresentados de baixa citotoxicidade *in vitro* associada à atividade anti-biofilme, determinaram as configurações do equipamento e tempo de exposição que foram utilizadas nos experimentos *in vivo*.

A maioria dos modelos de feridas tem sido realizada apenas com biofilme monoespécie. Entretanto, é importante salientar a importância dos estudos utilizando biofilmes multiespécies, já que a resposta frente a infecção polimicrobiana difere da resposta do biofilme monoespécie (Dalton et al. 2011). Dentro desse contexto, infecções polimicrobianas demonstraram ser mais virulentas do que infecções causadas por espécies únicas, tanto em humanos como em animais (Mastropaolo et al., 2005). Assim, optamos em nosso estudo, por um modelo *in vivo* de infecções de feridas polimicrobianas. Nesse sentido, o objetivo inicial foi estabelecer a infecção polimicrobiana composta por micro-organismos Gram positivos e Gram negativos, presentes em feridas. O desafio a seguir foi garantir que essa infecção polimicrobiana pudesse ser estabelecida de forma eficaz no modelo *in vivo* antes do período de exposição ao LTAPP.

Nossas primeiras tentativas de estabelecer infecções polimicrobianas infectando *in vitro*, através de uma mistura bactérias planctônicas não tiveram sucesso. Conseguimos contornar esses problemas utilizando membranas de colágeno suíno como base para crescimento do biofilme multiespécie (Werthén et al., 2010; Hammond et al., 2011) e transplantando esses biofilmes polimicrobianos pré-formados para feridas dos camundongos e coelhos.

Nesse estudo, utilizamos dois modelos de reparo de feridas: modelo murino e modelo de úlcera dermal. O primeiro modelo utilizou camundongos e permitiu a visualização de vários parâmetros clínicos e utilização de biofilme multiespécie padronizado obtido previamente *in vitro*, segundo Dalton et al. (2011). Já o modelo de úlcera dermal em coelhos, reconhecido pelo FDA (Food and Drug Administration) como modelo para reparo de feridas tem como vantagens a reparação por epitelização e granulação, similar às feridas humanas; prevenção da contratura tecidual devido à presença do arcabouço cartilaginoso da orelha; possibilidade de controles contra-laterais, possibilitando maior padronização e possibilidade de inoculação de células planctônicas, mimetizando o processo natural de contaminação de feridas. Assim, os dois modelos foram associados a fim de mitigar

as limitações de cada um e aproveitar os potenciais de cada uma das técnicas a fim de resultados mais fidedignos.

Nossas observações no desenvolvimento do estudo apontaram para limitações do modelo experimental murino. Observou-se uma grande quantidade de variáveis que atuam nesse modelo, tais como: alargamento fisiológico do diâmetro da ferida após a sua indução devido à grande movimentação dos camundongos e perda constante dos curativos. Verificou-se que essas variáveis interferem sobremaneira nas medidas do tamanho da ferida. Já o modelo de úlcera dermal em coelhos permitiu maior precisão na análise do percentual de fechamento da ferida, tendo em vista a presença do arcabouço cartilaginoso da orelha, possibilitando menos variáveis e mais padronização.

A análise histológica dos tecidos da ferida em modelo murino, não demonstrou diferenças no infiltrado inflamatório ao longo do período experimental. No quarto dia após a confecção da ferida, os processos inflamatórios nos animais tratados com LTAPP e controle eram similares, sugerindo-se que o plasma pode não ter efeito sobre o estágio inicial da inflamação. Observação similar foi reportada por Chatraie et al., 2018, o qual analisou o processo de reparação de feridas, tratadas com plasma frio de NO₂, durante períodos de 3 a 21 após a criação da ferida, observando que o plasma frio causa diminuição do processo inflamatório, apenas na fase tardia da inflamação (após 14 e 21 dias).

Nas feridas da derme de coelho, no entanto, observou-se redução da inflamação nos grupos tratados com plasma, no período de 8 dias, indicando ação anti-inflamatória. Resultados semelhantes foram relatados anteriormente por Nasruddin et al. (2014). Entretanto, pode-se observar que o tratamento com plasma é significativamente eficaz para a aceleração da re-epitelização. Em vários estudos, foi relatado que a aplicação tópica de plasma acelerou significativamente a reparação de feridas, seguida por menos inflamação, promovendo a re-epitelização e angiogênese (Georgii et al., 2011). Com base nos resultados obtidos, o LTAPP gerado a partir de Hélio pode ser sugerido como uma estratégia promissora para mediar a inflamação na fase tardia e assim melhorar o tratamento de feridas.

Analizando os dados de reparo das feridas, expressos pelo porcentual de reparação, o presente estudo sugere aceleração das fases de reparo pelo tratamento com LTAPP. A taxa de reparação foi superior no grupo exposto ao

plasma analisando-se o período do dia 4 para o 8. Jacofsky et al. (2014) relataram que o tratamento com plasma frio de Hélio acelerou a taxa de reparação de feridas em um modelo de murino diabético. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com plasma frio teve um efeito positivo no processo de reparação de feridas crônicas em ensaios clínicos (Brehmer et al., 2015). No entanto, cabe salientar que nos estudos citados as feridas não eram infectadas.

Os resultados desse estudo demonstraram que além de contribuir com o processo de reparo da ferida, o LTAPP demonstra efeito antimicrobiano associado, o que pode ter efeito potencializador no reparo tecidual. Considerando que a presença de biofilmes afeta significativamente a reparação e o sucesso do tratamento de feridas (Wolcott, 2015; Bjarnsholt, 2013), os efeitos simultâneos observados podem ser de grande valia para aplicação clínica. Ademais, esses efeitos ocorreram com baixa cito e genotoxicidade para células eucarióticas, o que aponta para uma potencial aplicação clínica futura.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o LTAPP apresentou atividade antimicrobiana frente a biofilmes monoespécies e multiespécies associados à infecção de feridas, em tempo de exposição de 5 minutos. Nas condições efetivas, não se mostrou citotóxico ou genotóxico. Em modelo *in vivo*, o LTAPP auxiliou no processo de reparo de feridas.

REFERÊNCIAS*

- 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. 2012;7(8):e44289. doi:10.1371/journal.pone.0044289. PMID: 22952948.
- Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, et al. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing *in vitro* and *in vivo*. PLoS One. 2013 Nov; 8(11): e79325. doi:10.1371/journal.pone.0079325. PMID: 24265766.
- Arndt S, Landthaler M, Zimmermann JL, Unger P, Wacker E, Shimizu T, et al. Effects of cold atmospheric plasma (CAP) on β -defensins, inflammatory cytokines, and apoptosis-related molecules in keratinocytes *in vitro* and *in vivo*. PLoS One. 2015 Mar;10(3): e0120041. doi:10.1371/journal.pone.0120041. PMID: 25768736.
- Babington P, Rajjoub K, Canady J, Siu A, Keidar M, Sherman JH. Use of cold atmospheric plasma in the treatment of cancer. Biointerphases. 2015 Jun 19;10(2):029401-5. doi:10.1116/1.4915264. PMID: 25791295.
- Barraud N, Hassett DJ, Hwang SH, Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2006;188(21):7344-53. doi:10.1128/JB.00779-06. PMID: 17050922.
- Bayliss DL, Shama G, Kong MG. Restoration of antibiotic sensitivity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following treatment with a non-thermal atmospheric gas plasma. Int J Antimicrob Agents. 2013;41(4):398-9. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.12.005. PMID: 23380582.
- Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS Suppl. 2013;(136):1-51. doi:10.1111/apm.12099. PMID: 23635385.
- Bernhardt T, Semmler ML, Schäfer M, Bekeschus S, Emmert S, Boeckmann L. Plasma medicine: applications of cold atmospheric pressure plasma in dermatology. Oxid Med Cell Longev. 2019 Sep 3;33873928:10-3. doi:10.1155/2019/3873928. PMID: 31565150.
- Boehm D, Bourke P. Safety implications of plasma-induced effects in living cells - a review of *in vitro* and *in vivo* findings. Biol Chem. 2018 Dec 19;400(1):3-17. doi:10.1515/hsz-2018-0222. PMID: 30044756.
- Boffeta P, Islami F. The contribution of molecular epidemiology to the identification of human carcinogens: current status and future perspectives. Ann Oncol. 2013 Apr;24(4):901-8. doi:10.1093/annonc/mds543. PMID: 23136234.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 2019]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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 Jun 27;13(6):e0199832. doi:10.1371/journal.pone.0199832. PMID: 29949638.

Brackman G, Coenye T. *In Vitro* and *in vivo* biofilm wound models and their application. Adv Exp Med Biol. 2015;21(1):5-11. doi:10.1007/5584_2015_5002. PMID: 26563304.

Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Görlitz A, et al. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm®) VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015;29(1):148-55. doi:10.1111/jdv.12490. PMID: 24666170.

Brun P, Pathak S, Castagliuolo I, Palu G, Brun P, Zuin M, et al. Helium generated cold plasma finely regulates activation of human fibroblast-like primary cells. PLoS One. 2014 Oct;9(8):1-9. doi.org/10.1371/journal.pone.0104397. PMID: 25127477.

Brun P, Bernabè G, Marchiori C, Scarpa M, Zuin M, Cavazzana R, et al. Antibacterial efficacy and mechanisms of action of low power atmospheric pressure cold plasma: membrane permeability, biofilm penetration and antimicrobial sensitization. J Appl Microbiol. 2018;125(2):398-408. doi:10.1111/jam.13780. PMID: 29655267.

Chatraie M, Torkaman G, Khani M, Salehi H, Shokri B. *In vivo* study of non-invasive effects of non-thermal plasma in pressure ulcer treatment. Sci Rep. 2018 Apr 4;8(1):5621. doi:10.1038/s41598-018-24049-z. PMID: 29618775.

Coppedè F, Migliore L. DNA damage and repair in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 2009 Feb;6(1):36-47. doi.org/10.2174/156720509787313970. PMID: 19199873.

Craven M, Kasper SH, Canfield MJ, Diaz-Morales RR, Hrabie JA, Cady NC, et al. Nitric oxide-releasing polyacrylonitrile disperses biofilms formed by wound-relevant pathogenic bacteria. J Appl Microbiol. 2016 Apr;120(4):1085-99. doi:10.1111/jam.13059. PMID: 26784529.

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. 2012 Jul;10(7):509-15. doi:10.1111/j.1610-0387.2012.07857. PMID: 22405534. German.

Dalton T, Dowd SE, Wolcott RD, Sun Y, Watters C, Griswold JA, et al. An *in vivo* polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. PLoS One. 2011 Nov 11;6(11): e27317. doi:10.1371/journal.pone.0027317. PMID: 22076151.

Delben J, Zago C, Tyhovych N, Vergani C, Duarte S. Atmospheric pressure cold plasma: a tissue-tolerable approach against oral biofilms. *Braz Oral Res*. 2014 May; 28(1):31. doi:10.1371/journal.pone.0155427.

Dobrynin AV, Carrillo JM. Swelling of biological and semiflexible polyelectrolytes. *J Phys Condens Matter*. 2009 Oct 21;21(42):424112. doi:10.1088/09538984/21/42/424112. PMID: 21715847.

Edwards K. New twist on an old favorite: gentian violet and methylene blue antibacterial foams. *adv wound care (New Rochelle)*. 2016;5(1):11-8. doi:10.1089/wound.2014.0593. PMID: 26858911.

Ermolaeva SA, Sysolyatina EV, Kolkova NI, Bortsov P, Tuhvatulin AI, Vasiliev MM. Non-thermal argon plasma is bactericidal for the intracellular bacterial pathogen *Chlamydia trachomatis*. *J Med Microbiol*. 2012 Jun;61(6):793-9. doi:10.1099/jmm.0.038117-0. PMID: 22361459.

Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Jorgensen B, Andersen AS, et al. Krogfelt KA, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec; 47:4084–9. doi:10.1128/JCM.01395-09. PMID: 19812273.

Felisbino MB, Tamashiro WM, Mello ML. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS One*. 2011;6(12):1-11. doi.org/10.1371/journal.pone.0029144. PMID: 22206001.

Finnegan S, Percival SL. EDTA: an antimicrobial and antibiofilm agent for use in wound care. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015 Jul 1;4(7):415-21. doi: 10.1089/wound.2014.0577. PMID: 26155384.

Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied plasma medicine. *Plasma Process Polym*. 2008;5(6):503–33. doi.org/10.1002/ppap.20070 0154.

Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015 Sep;4(9):560-82. PMID: 26339534.

Gabriel AA, Ugay MCCF, Siringan MAT, Rosario LMD, Tumlos RB, Ramos HJ. Atmospheric pressure plasma jet inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on stainless steel surfaces. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2016;36:311-9. doi. org/10.1016/j.ifset .2016.07.015.

Gay-Mimbrera J, García MC, Isla-Tejera B, Roderio-Serrano A, García-Nieto AV, Ruano J. Clinical and biological principles of cold atmospheric plasma application in skin cancer. *Adv Ther*. 2016;33(6):894-909. doi:10.1007/s12325-016-0338-1. PMID: 27142848.

Georgii JL, Amadeu TP, Seabra AB, de Oliveira MG, Monte-Alto-Costa A. Topical S-nitrosoglutathione-releasing hydrogel improves healing of rat ischaemic wounds. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5(8):612-9. doi:10.1002/term.353. PMID: 21774084.

Gjodsbol K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jorgensen B, Klein BM, Krogfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J*. 2006 Sep;3:225–31. doi: 10.1111/j.1742-481X.2006.00159.x. PMID: 16984578.

Gorynia S, Koban I, Matthes R, Welk A, Gorynia S, Hübner NO, et al. In vitro efficacy of cold atmospheric pressure plasma on *S. sanguinis* biofilms in comparison of two test models. *GMS Hyg Infect Control*. 2013 Abr; 8(1). doi:10.3205/dgkh000201. PMID: 23967387.

Gottrup F. A specialized wound healing center concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds. *Am J Surg*. 2004 May; 87:38S-43S. doi:10.1016/S0002-9610(03)00303-9. PMID: 15147991.

Gümbel D, Suchy B, Wien L, Gelbrich N, Napp M, Kramer A, et al. Comparison of cold atmospheric plasma devices' Efficacy on osteosarcoma and fibroblastic *in vitro* cell models. *Anticancer Res*. 2017 Oct;37(10):5407-14. PMID: 28982850.

Gurjala AN, Geringer MR, Seth AK, Hong SJ, Smeltzer MS, Galiano RD, et al. Development of a novel, highly quantitative *in vivo* model for the study of biofilm-impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*. 2011 May-Jun;19(3):400-10. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00690. PMID: 21518094.

Hammond AA, Miller KG, Kruczek CJ, Dertien J, Colmer-Hamood JA, Griswold JA, et al. An *in vitro* biofilm model to examine the effect of antibiotic ointments on biofilms produced by burn wound bacterial isolates. *Burns*. 2011;37(2):312-21. doi:10.1016/j.burns.2010.09.017. PMID: 21130579.

Han L, Patil S, Boehm D, Milosavljević V, Cullen PJ, Bourke P. Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Oct 30;82(2):450-8. doi: 10.1128/AEM.02660-15. PMID: 26519396.

Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther*. 2017;34(3):599-610. doi:10.1007/s12325-017-0478-y. PMID: 28108895.

Haertel B, von Woedtke T, Weltmann KD, Lindequist U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014;22(6):477-90. doi:10.4062/biomolther.2014.105. PMID: 25489414.

Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold atmospheric plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med Gas Res*. 2013 Oct 1;3(1)21:1-15. doi:10.1186/2045-9912-3-21. PMID: 24083477.

Isbary G, Heinlin J, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill G, Schmidt HU, et al. Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2012;167(2):404-10. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10923.x. PMID: 22385038.

Jacofsky MC, Lubahn C, McDonnell C, Seepersad Y, Fridman G, Fridman FA, et al. Spatially resolved optical emission spectroscopy of a helium plasma jet and its effects on wound healing rate in a diabetic murine model. *Plasma Med*. 2014;4:177-91. doi:10.1615/PlasmaMed.2015012190.

Julák J, Scholtz V, Vaňková E. Medically important biofilms and non-thermal plasma. *World J Microbiol Biotechnol*. 2018 Nov 19;34(12):178:1-15. doi:10.1007/s11274-018-2560-2. PMID: 30456518.

Karinja SJ, Spector JA. Treatment of infected wounds in the age of antimicrobial resistance: contemporary alternative therapeutic options. *Plast Reconstr Surg*. 2018;142(4):1082-92. doi:10.1097/PRS.0000000000004799. PMID: 30252823.

Kim PJ, Steinberg JS. Wound care: biofilm and its impact on the latest treatment modalities for ulcerations of the diabetic foot. *Semin Vasc Surg*. 2012 Jun;25(2):70-4. doi: 10.1053/j.semvascsurg.2012.04.008. PMID: 22817855.

Kim JH, Lee MA, Han GJ, Cho BH. Plasma in dentistry: a review of basic concepts and applications in dentistry. *Acta Odontol Scand*. 2014;Jan;72(1):1-12. doi:10.3109/00016357.2013.795660. PMID: 24354926.

Kisch T, Helmke A, Schleusser S, Song J, Liodaki E, Stang FH, et al. Improvement of cutaneous microcirculation by cold atmospheric plasma (CAP): Results of a controlled, prospective cohort study. *Microvasc Res*. 2016 Mar;04:55-62. doi: 10.1016/j.mvr.2015.12.002. PMID: 26655582.

Kaushik NK, Kim HS, Chae YJ, Lee YN, Kwon GC, Choi EH, et al. Synthesis and anticancer activity of di(3-thienyl) methanol and di(3-thienyl)methane. *Molecules*. 2012 Sep 27;17(10):11456-68. doi: 10.3390/molecules171011456. PMID: 23018921.

Klämpfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li YF, Zimmermann JL, Stolz W, et al. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(15):5077-82. doi:10.1128/AEM.00583-12. PMID: 22582068.

Kluge S, Bekeschus S, Bender C, Benkhail H, Sckell A, Below H, et al. Investigating the mutagenicity of a cold argon-plasma jet in an HETMN model. *PLoS ONE*. 2016;11(9):e0160667. doi:10.1371/journal.pone.0160667. PMID: 27584003.

Kostov KG, Rocha V, Koga Ito CY, Matos BM, Algatti MA, Honda RY, et al. Bacterial sterilization by a dielectric barrier discharge in air. *Surface & Coatings*. 2010 Jun;204:2954-9. doi.org/10.1016/j.surfcoat.2010.01.052.

Kostov KG, Nishime TM, Machida M, Borges AC, Prysiashyny V, Koga-Ito CY. Cold atmospheric plasma jet at the end of flexible plastic tube for microbial decontamination. *Plasma Proc Polym* 2015 Oct; 12(12):1383-91. <https://doi.org/10.1002/ppap.201500125>.

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

Laroussi M. Low-temperature plasmas for medicine? *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2009 Jun. 37(6), 714-25. doi:10.1109/TPS.2009.2017267.

Laroussi M. Plasma medicine: A Brief Introduction. *Plasma*. 2018;1:47-60. doi:10.3390/plasma1010005.

Leandro GS, Lobo RR, Oliveira DV, Moriguti JC, Sakamoto-Hojo ET. Lymphocytes of patients with Alzheimer's disease display different DNA damage repair kinetics and expression profiles of DNA repair and stress response genes. *Int J Mol Sci*. 2013 Jun;14(6):12380-400. doi:10.3390/ijms140612380. PMID: 23752274.

Leung KP, D'Arpa PD, Seth AK, Geriner MR, Marti Jett, Wei Xu et al. Dermal wound transcriptomic responses to Infection with *Pseudomonas aeruginosa* versus *Klebsiella pneumonia* in a rabbit ear wound model. *BMC Clin Pathol*. 2014 May;14(1):1-14. doi:10.1186/1472-6890-14-20. PMID: 25035691.

Lima CF, Alves MGO, Carvalho BFDC, Lima TA, Camillo CMC, Soares FA et al. Is DNA ploidy related to smoking? *J Oral Pathol Med*. 2017;46(10):961-6. doi:10.1111/jop.12616. PMID: 28730665.

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*. 2011;31(6):852-56. doi:10.1007/s11596-011-0690-y. PMID: 22173512.

Li YF, Taylor D, Zimmermann JL, Bunk W, Monetti R, Isbary G, et al. *In vivo* skin treatment using two portable plasma devices: comparison of a direct and an indirect cold atmospheric plasma treatment. *Clin Plasma Med*. 2013;1:35–9. doi:10.1016/j.cpme.2013.09.001

Ma Y, Ha CS, Hwang SW, Lee HJ, Kim GC, Lee KW, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma preferentially induces apoptosis in p53-mutated cancer cells by activating ROS stress-response pathways. *PLoS One*. 2014 Apr 23;9(4):e91947. doi:10.1371/journal.pone.0091947. PMID: 24759730.

Mastropaolo MD, Evans NP, Byrnes MK, Stevens AM, Robertson JL, Melville SB. Synergy in polymicrobial infections in a mouse model of type 2 diabetes. *Infect Immun*. 2005;73(9):6055-63. doi:10.1128/IAI.73.9.6055-6063.2005. PMID: 16113326.

Matthes R, Assadian O, Kramer A. Repeated applications of cold atmospheric pressure plasma does not induce resistance in *Staphylococcus aureus* embedded in biofilms. *GMS Hyg Infect Control*. 2014 Sep 30;9(3):Doc17. doi:10.3205/dgkh000237.eCollection 2014. PMID: 25285261.

Modic M, McLeod NP, Sutton JM, Walsh JL. Cold atmospheric pressure plasma elimination of clinically important single- and mixed-species biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(3):375-8. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.11.022. PMID: 28161488.

Napavichayanun S, Yamdech R, Aramwit P. The safety and efficacy of bacterial nanocellulose wound dressing incorporating sericin and polyhexamethylene biguanide: *in vitro*, *in vivo* and clinical studies. *Arch Dermatol Res*. 2016;308(2):123-32. doi:10.1007/s00403-016-1621-3. PMID: 26796543.

Nasruddin N, Nakajima Y, Kanae M, Heni S, Esti R, Muhammad N, et al. Cold plasma on full-thickness cutaneous wound accelerates healing through promoting inflammation, re-epithelialization and wound contraction. *Clin Plasma Med*. 2014 Jul;2(1):28-35.

O'Connor N, Cahill O, Daniels S, Galvin S, Humphreys H. Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? *J Hosp Infect*. 2014 Oct;88(2):59-65. doi:10.1016/j.jhin.2014.06.015. PMID: 25146226.

Unasus Unifesp [Internet]. São Paulo (SP): Universidade federal de São Paulo [cited 2017 02 15]. Available from: <http://www.unasus.unifesp.br>

Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. *J Tissue Viability*. 2016 Jan 25(2):98-118. doi:10.1016/j.jtv.2015.12.002. PMID: 26852154.

Panahi Y, Izadi M, Sayyadi N, Rezaee R, Jonaidi-Jafari N, Beiraghdar F, et al. Comparative trial of Aloe vera/olive oil combination cream versus phenytoin cream in the treatment of chronic wounds. *J Wound Care*. 2015 Oct;24(10):459-60, 462-5. doi:10.12968/jowc.2015.24.10.459. PMID: 26488737.

Panngom K, Baik KY, Nam MK, Han JH, Rhim H, Choi EH. Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma. *Cell Death Dis*. 2013 May 23;4(5):642-8. doi:10.1038/cddis.2013.168. PMID: 23703387.

Rhoads DD, Wolcott RD, Sun Y, Dowd SE. Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds. *Int J Mol Sci*. 2012 Feb; 13(3):2535–50. doi:10.3390/ijms13032535. PMID: 22489109.

Theinkom F, Singer S, Cieplik F, Cantzler S, Weilemann H, Cantzler M, et al. Antibacterial efficacy of cold atmospheric plasma against *Enterococcus faecalis* planktonic cultures and biofilms *in vitro*. *PLoS One*. 2019 Nov 26;14(11):1-15. doi.org/10.1371/journal.pone.0223925. PMID: 31770390.

Tort S, Demiröz FT, Coşkun Cevher Ş, Sarıbaş S, Özoğul C, Acartürk F. The effect of a new wound dressing on wound healing: Biochemical and histopathological evaluation. *Burns*. 2020;46(1):143-55. doi:10.1016/j.burns.2019.02.013. PMID: 31862280.

Ureyen KB, Kececi AD, Güldaş HE, Cetin ES, Ozturk T, Oksuz L, et al. Efficacy of endodontic applications of ozone and low-temperature atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Lett Appl Microbiol*. 2014;58(1):8-15. doi:10.1111/lam.12148. PMID: 23980743.

Ulrich C, Kluschke F, Patzelt A, Vandersee S, Czaika VA, Richter H, et al. Clinical use of cold atmospheric pressure argon plasma in chronic leg ulcers: A pilot study. *J Wound Care*. 2015;24(5):196-203. doi:10.12968/jowc.2015.24.5.196. PMID: 25970756.

von Woedtke T, Metelmann HR, Weltmann KD. Clinical plasma medicine: state and perspectives of *in vivo* application of cold atmospheric plasma. *Contrib Plasm Phys* 2014;54:104–17. doi.org/10.1002/ctpp.201310068

Vieira CPB, Araújo TME. Prevalence and factors associated with chronic wounds in older adults in primary care. *Rev Esc Enferm USP*. 2018;52: e03415. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S1980-220X2017051303415. PMID: 30569961.

Wang J, Yu Z, Xu Hu, LI Y, Qiuchen C, Xiaoxia Z, et al. Antimicrobial mechanism and the effect of atmospheric pressure N₂ plasma jet on the regeneration capacity of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Biofouling*. 2018;34(8):935-49. doi:10.1080/08927014.2018.1530350. PMID: 30477343.

Wang M, Holmes B, Cheng X, Zhu W, Keidar M, Zhang LG. Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells. *PLoS One*. 2013 Sep 11;8(9):e73741. doi:10.1371/journal.pone.0073741. PMID: 2404005.

Weltmann KD, von Woedtke T. Basic requirements for plasma sources in medicine. *Eur Phys J-AppL Phys*. 2011;55(1):1-27. doi:10.1051/epjap/2011100452ff. fffhal00719809.

Wende K, Bekeschus S, Schmidt A, Jatsch L, Hasse S, Weltmann KD, et al. Risk assessment of a cold argon plasma jet in respect to its mutagenicity. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016;798-99:48-54. doi:10.1016/j.mrgentox.2016.02.003. PMID: 26994493

Winter T, Winter J, Polak M, Kusch K, Kusch K, Mäder U, et al. Characterization of the global impact of low temperature gas plasma on vegetative microorganisms. *Proteomics*. 2011;11(17):3518-30. doi:10.1002/pmic.201000637. PMID: 21751354

Wolcott R. Disrupting the biofilm matrix improves wound healing outcomes. *J Wound Care*. 2015;24(8):366-71. doi:10.12968/jowc.2015.24.8.366. PMID: 26562379

Yan X, Meng Z, Ouyang J, Qiao Y, Yuan F. New Application of an atmospheric pressure plasma jet as a neuro-protective agent against glucose deprivation-induced Injury of SH-SY5Y Cells. *J Vis Exp*. 2017 Oct 9;(128):56323. doi:10.3791/56323. PMID: 29053683

Yan X, Meng Z, Ouyang J, Qiao Y, Li J, Jia M, et al. Cytoprotective effects of atmospheric-pressure plasmas against hypoxia-induced neuronal injuries. *J Phys D Appl Phys*. 2018;51(8):085401.doi:10.1088/1361-6463/aaa867

ANEXO A —Certificado do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos



Instituto de Ciência e Tecnologia
São José dos Campos
UNESP

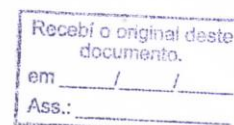
CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 09/2017, intitulado:- "**Aplicação do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica no controle de biofilme e reparo de feridas crônicas.**" sob a responsabilidade de **CRISTIANE YUIMI KOGA ITO**, tendo como colaboradoras **MARIA ALCIONÉIA CARVALHO DE OLIVEIRA E CAMPOS**, **GABRIELA GOUVÊA LIMA** e **CLÉLIA APARECIDA DE PAIVA** 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 10/01/2020
Espécie/linhagem/raça	40 Camundongos/Mus musculus e 20 Coelho/New Zeland
Nº de Animais	40 Camundongos e 20 Coelhos
Peso/Idade	(Camundongos 30 g/ 35 dias) (Coelhos de 3 a 6 meses/3 Kilos)
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 06 de abril de 2018

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



Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
Fax (12) 3947-9010 / gudes@fosjc.unesp.br/komori@fosjc.unesp.br