



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAL

JOELMA GOMES DA SILVA ROCHA

**USO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO NO PROCESSO DE REPARO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM PORQUINHOS DA INDIA**

MOSSORÓ

2023

JOELMA GOMES DA SILVA ROCHA

**USO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO NO PROCESSO DE REPARO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM PORQUINHOS DA INDIA**

Tese de Doutorado em ciências animais do
Programa de Pós-Graduação em ciências
animais da Universidade Federal Rural do
Semi-Árido como requisito para obtenção do
título de Doutor em ciências animais.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
biotecnologia animal
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra
de Moura

MOSSORÓ

2023

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

RR672 Rocha, Joelma Gomes da Silva.
u Uso do plasma atmosférico a frio no processo
de reparo de feridas cutâneas em porquinhos da
índia / Joelma Gomes da Silva Rocha. - 2023.
73 f. : il.

Orientador: Carlos Eduardo Bezerra de Moura.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2023.

1. Medicina do plasma. 2. plasma não térmico.
3. cicatrização de feridas. 4. fibroblastos. I. de
Moura, Carlos Eduardo Bezerra, orient. II.
Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

JOELMA GOMES DA SILVA ROCHA

**USO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO NO PROCESSO DE REPARO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM PORQUINHOS DA INDIA**

Tese de Doutorado em ciências animais do
Programa de Pós-Graduação em ciências
animais da Universidade Federal Rural do
Semi-Árido como requisito para obtenção do
título de Doutor em ciências animais.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
biotecnologia animal.

Defendida em: 23 / 12 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)
Presidente

Profa. Dra. Cibele dos Santos Borges (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza (UFRN)
Membro Examinador

Prof. Dr. Clodomiro Alves Junior (UFRN)
Membro examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOELMA GOMES DA SILVA ROCHA, nasceu em Mossoró/RN no dia 11/10/1988. Concluiu o ensino médio no ano de 2005 e ingressou no ensino superior no ano de 2006. É bacharel em Fisioterapia pela Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, com ano de conclusão em 2011. Desde então atua de maneira autônoma como Fisioterapeuta. Ainda em 2011 iniciou sua pós graduação *lato sensu* na Universidade Federal do Rio Grande do Norte em Fisioterapia Traumato- ortopédica e desportiva. Logo após, em 2012 iniciou seu mestrado na Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, concluindo em 2014. Nesse tempo, ingressou na docência do ensino superior, no ano de 2013, profissão que atua desde então. A primeira faculdade que atuou como professora foi a Faculdade do Vale do Jaguaribe onde permaneceu por 5 anos e no último ano atuou também na Universidade da Bahia. Em 2019, passou a ter dedicação exclusiva na Faculdade de enfermagem nova esperança de Mossoró, onde desempenha o cargo de coordenadora do curso de Fisioterapia e é docente na instituição. Vínculo que mantém até hoje. Continua atuando na assistência, e faz parte do banco de avaliadores do INEP.

Dedico este trabalho ao meu
esposo David Darlan Rocha
Gomes e ao meu Filho Davi
Pietro Gomes Rocha que nunca
soltaram a minha mão.

AGRADECIMENTOS

Passei meus últimos quatro anos pensando em como escrever meus agradecimentos e quem incluir aqui. Porém hoje, já na reta final, me pego com dificuldade de colocar em palavras tanto sentimento e citar tantas pessoas que foram essenciais nesta etapa da minha vida. Eu sonhei com este doutorado ainda na graduação e nos planos tinha a pretensão de ser doutora antes dos 30 anos. Porém, como cita provérbios 16.1 “Ao homem pertencem os planos do coração, mas do Senhor vem a resposta certa.” Por isto, começo agradecendo a Ele, pois nada do que aconteceu na minha vida até hoje teria de fato se concretizado se não fosse pela sua graça derramada na minha vida. “Deus, eu não mereço! Mas o Senhor é bom em todo tempo.”

Preciso agradecer a minha base de vida, minha família. Nunca esquecerei da minha mãe, Margarida Gomes, que me alfabetizou e me ensinou a gostar tanto de estudar. Além de me ensinar as letras, ela me deu o maior exemplo de força que uma mulher poderia me dá. “Mãe, sua filha agora é doutora e tem muito da senhora nisso.” Agradeço também ao meu pai, Josué Gomes, que a seu modo e com seu cuidado sempre sem limites e sem medir esforços foi meu suporte durante todos meus processos de aprendizados. Meus irmãos, sobrinhos e cunhadas; tem um pouco de vocês aqui também.

E por falar em família, eu preciso agradecer a duas pessoas que estão na minha vida há um tempo. Meu esposo, David Darlan Rocha Gomes, que caminha comigo há 11 anos e é meu maior incentivador. Ele pode não ser expert em metodologia científica, pode não saber aplicar experimentos, mas de todas as pessoas que precisei contar, ele foi aquele que sempre me disse: “O que eu posso fazer para ajudar minha filha?” Foi praticamente um IC na minha pesquisa. Cuidou dos animais junto comigo, viajou, levou e trouxe ferramenta, células, cuidou muito do nosso filho para que eu pudesse produzir... se eu foi enumerar tudo que ele fez para que esse trabalho chegasse na fase de conclusão me estenderia muito, então meu filho, só quero dizer que se sou forte e posso ser uma mulher que faz a diferença no mundo, tem muito de você.

Gratidão ao meu amor, que me faz melhor todos os dias, Davi Pietro. Sabe, dentro dos meus planos eu pretendia ter um filho após o doutorado, mas Deus sabia que eu iria precisar de você para não desistir e por isso me fez a maior e melhor surpresa da minha vida. Obrigada por ser tão pequeno e compreender tanto a mamãe. Por orar por isto aqui, por acompanhar o processo, por se preocupar comigo. Você é gigante meu filho! Nunca saberei como te recompensar por “segurar as pontas” junto comigo. A Gabriel, nosso segundo filho que

chegou no meio disso tudo e me impulsionou de alguma forma para terminar. Mamãe também precisava de você aqui.

Agradeço também ao meu orientador, professor Dr. Carlos Eduardo. Eu bati em muitas portas até chegar nesta. Mas quando cheguei, Deus me fez entender que seria aqui que eu precisaria de fato repousar. Ele é tão perfeito que escolheu um homem de Deus para me conduzir neste processo. Obrigada por fazer esse momento ser mais leve. Por compreender as muitas vezes que precisei e por me ensinar tanto. A pós-graduação precisa de muitos Cadu's para que saiam doutores não só no que estuda, mas tenha também uma formação pessoal. Parabéns por ser tão gigante professor!

A minha amiga e IC que me acompanhou e me escutou tanto. Thaynara Amaral. Amiga, obrigada por ter segurado minha mão. A minha amiga Ana Caroline que despretensiosamente abriu as portas do laboratório para mim e me ensinou tanto. Foi lá, pegou na minha mão e não soltou. Através delas, agradeço a toda equipe que de alguma forma contribuiu na coleta.

Professor Moacir, muito obrigada. O serviço público precisa de mais professores como o senhor. Obrigada por abrir as portas do CEMAS, do laboratório e principalmente por estar lá sempre. Tem muito do senhor neste trabalho.

Agradeço aos meus amigos de trabalho: Andrea Fagundes, Emanuelle Louyde, Livia da Mata, Lidiane Mendonça, Ana Paula, Emanuel Santos que a seu modo foram peças tão importantes nesse processo. Me apoiaram, me escutarem, seguraram as pontas quando precisei. Sou muito feliz por tê-los em minha vida. Estendo meus agradecimentos a FACENE/RN na pessoa da diretora Maria da conceição, Tetê para todos. Dona Tetê, obrigada por investir tanto nos seus recursos humanos.

Aos meus alunos e equipe de professores. Todos vocês de alguma forma têm parte nisto aqui e se quis ser doutora um dia é porque a docência me chamou e se tornou minha missão de vida. Esse doutorado é para servir a educação e poder continuar contribuindo para transformar vidas.

A todos meus amigos, não tenho como citá-los, pois, preciso finalizar esse texto. Mas enquanto escrevo lembro de cada um e da importância que tiveram para que meu processo se concretizasse. Gratidão!

RESUMO

O plasma atmosférico a frio (CAP) surgiu recentemente e se difundiu como possibilidade terapêutica por ser bem tolerado pelos tecidos vivos. Dentre suas aplicações, destacam-se as relacionadas a afecções cutâneas e seu potencial no estímulo a regeneração e/ou cicatrização da pele. Diante disto o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do plasma atmosférico frio obtido em DBD no reparo de feridas cutâneas em porquinhos da índia, durante o processo de reparo tecidual. Para isto foram realizados dois experimentos: um estudo *in vivo* com 24 porquinhos da índia e por meio do tratamento de feridas agudas limpas e outro *in vitro* com fibroblastos da linhagem 3T3. Ambos os estudos apontam para resultados positivos sobre o uso do CAP no processo de cicatrização de feridas, com direcionamentos importantes na definição de alguns parâmetros, a saber: modo de aplicação, tempo escolhido e frequência. Assim, encontrou-se que o modo contínuo mostrou resultados superiores com relação a organização tecidual e produção de colágeno. Já com relação as células a aplicação feita de modo direto e por 10 segundos se apresentou como aquela mais favorável para os fibroblastos. Diante disto, conclui-se que o quando há uma definição criteriosa dos parâmetros apontados, o CAP se apresenta como tecnologia promissora para o processo de cicatrização de feridas.

Palavras-chaves: Medicina do plasma; plasma não térmico; cicatrização de feridas; fibroblastos.

ABSTRACT

Cold atmospheric plasma (CAP) recently emerged and became widespread as a therapeutic possibility because it is well tolerated by living tissues. Among its applications, those related to skin disorders and their potential to stimulate skin regeneration and/or healing stand out. In view of this, the present work aimed to evaluate the effect of cold atmospheric plasma obtained in DBD on the repair of skin wounds in guinea pigs, during the tissue repair process. For this, two designs were carried out: an *in vivo* study with 24 guinea pigs and through the treatment of clean acute wounds and another *in vitro* with 3T3 fibroblasts. Both studies point to positive results on the use of CAP in the wound healing process, with important directions in defining some parameters, namely: mode of application, chosen time and frequency. Thus, it was found that the continuous mode showed superior results in relation to tissue

organization and collagen production. Regarding cells, the application made directly and for 10 seconds was the most favorable for fibroblasts. In view of this, it is concluded that when there is a careful definition of the parameters mentioned, CAP presents itself as a promising technology for the wound healing process.

Keywords: Plasma medicine; non-thermal plasma; wound healing; fibroblasts.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	ARTIGOS	17
4	PERSPECTIVAS DA APLICAÇÃO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS	17
5	USE OF COLD ATMOSPHERIC PLASMA TO TREAT SKIN WOUNDS: A SYSTEMATIC REVIEW.....	36
6	EFEITO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	53
7	COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES TEMPOS E MÉTODOS DE APLICAÇÃO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO EM FIBROBLASTOS: UM ESTUDO <i>IN VITRO</i>	74
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo, estando em contato direto com o meio externo e, portanto, propensa a lesões. Toda descontinuidade desse tecido, independente da etiologia, pode ser considerada uma ferida. E uma vez que se instaura, existem dois mecanismos principais de reparação: a regeneração, com substituição do tecido lesionado por um novo; e a cicatrização, caracterizada pela deposição do colágeno (MARCHESINI; RIBEIRO; 2020; FREITAS et al. 2021).

No que diz respeito a cicatrização sabe-se que é um processo que envolve componentes da matriz extracelular, mediadores de natureza lipídica e proteica, células residentes e de defesa, podendo ser dividido em três fases: inflamatória, que dura de 48 a 72 horas e se caracteriza pelo aparecimento dos sinais flogísticos. Em seguida, vem a fase fibroblástica com deposição da matriz extracelular que dura um média de 12 a 14 dias com intensa migração celular, angiogênese e produção de colágeno. E a última fase é a de remodelamento do tecido onde ocorre remodelação do colágeno que confere maior força tênsil a cicatriz e pode durar de meses a anos (MARTELI; ANDRADE; SANTOS, 2018).

Dentre essas fases, muitos mediadores promovem migração celular, além de ocorrer a proliferação dos fibroblastos, síntese e maturação de colágeno, estímulo do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiogênese, e granulação do tecido da ferida. Entretanto, mesmo tendo todo o seu ciclo definido, o tratamento de feridas ainda se apresenta como um desafio, desde sua epidemiologia até mesmo seu tratamento, devido aos muitos fatores intervenientes, tanto intrínsecos, relacionados ao indivíduo como extrínsecos, ligados ao meio externo (SÁ et al., 2020).

Nesse contexto, os esforços na busca de tratamentos eficazes vem se desenvolvendo ao longo dos anos e dentre estes, têm-se o uso do plasma atmosférico a frio gerado em barreira dielétrica (DBD). Esse tratamento é caracterizado por descargas entre dois eletrodos divididos por uma barreira dielétrica isolante que energiza o ar para gerar o plasma. Dentre suas vantagens, têm-se o baixo custo, além da possibilidade de utilização de diversos gases que o torna mais versátil, sendo os mais utilizados o argônio e hélio (CHUPRADI et al., 2023).

Portanto, na terapêutica da cicatrização de feridas cutâneas, o uso desse dispositivo vem sendo avaliado, dentre os procedimentos não invasivos, indolor e com benefícios na fase

aguda por promover estímulo dentro do processo de regeneração e cicatrização de tecidos, com efeitos na proliferação de células endoteliais que apontam para a possibilidade de impactos positivos na angiogênese mediada por essas células. Além disso, alguns estudos relatam para a fácil aplicação desta terapêutica e a boa aceitação por parte dos pacientes (BOLGEO et al., 2023).

Nessa perspectiva, o uso do plasma DBD desperta o interesse das ciências médicas, apresentando-se promissor para uso em aplicações clínicas. No entanto, estudos adicionais ainda são necessários para delimitar de maneira mais exata o seu mecanismo de ação, além da necessidade de comprovação da sua segurança e eficácia, determinação de parâmetros e sua ação no tecido, no sentido de trazer mais confiança para seu uso clínico (WELZEN et al., 2021; TAN et al., 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do plasma atmosférico frio obtido em DBD no reparo de feridas cutâneas em porquinhos da índia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar dois modos de aplicação do plasma atmosférico a frio no processo de cicatrização de feridas;
- Analisar a viabilidade, morfologia e expressão de óxido nítrico em fibroblastos tratados pelo jato de plasma na forma direta e indireta;
- Observar o comportamento de fibroblastos submetidos a diferentes tempos de aplicação do plasma atmosférico a frio;
- Mensurar a taxa de retração da ferida macroscopicamente tratadas pelo jato de plasma com gás hélio;
- Identificar a densidade de volume do tecido de granulação no tratamento com plasma atmosférico frio;
- Analisar a orientação, organização e quantidade das fibras de colágeno no tecido tratado com plasma atmosférico frio;
- Avaliar o processo inflamatório dos tecidos

REFERÊNCIAS

- BOLGEO T. et al. The Role of Cold Atmospheric Plasma in Wound Healing Processes in Critically Ill Patients. **J Pers Med.** v. 13, n. 5, p. 736, 2023
- CHUPRADI S et al. Recent advances in cold atmospheric plasma (CAP) for breast cancer therapy. **Cell Biol Int.** v. 47, n. 2, p. 327-340, 2023.
- FREITAS K.A.B. da .S. Efeitos da fotobiomodulação (laser de baixa intensidade) na cicatrização de feridas: revisão integrativa. **Research, Society and Development.** v. 10, n. 11, e362101119821, 2021.
- MARCHESINI B.F, RIBEIRO S.B. Efeito da ozonioterapia na cicatrização de feridas. **Fisioter Bras.** v.21, n.3, p. 281-8, 2020.
- MARTELLI, A., ANDRADE, T. A. M. de, SANTOS, G. M. T. dos. Perspectivas na utilização de fitoterápicos na cicatrização tecidual: revisão sistemática. **Archives Of Health Investigation.** v. 7, n. 8, 2018.
- SÁ A. L. F. et al. O uso dos óleos essenciais na cicatrização de feridas. **Saúde coletiva.** v.10, n. 52, 2020.
- TAN F. et al. Plasma Dermatology: Skin Therapy Using Cold Atmospheric Plasma. **Front Oncol.** v. 12, n. 12, p. 918484, 2022.
- WELZEN A.V et al. The Response and Tolerability of a Novel Cold Atmospheric Plasma Wound Dressing for the Healing of Split Skin Graft Donor Sites: A Controlled Pilot Study. **Skin Pharmacol Physiol.** v. 34, n. 6, p. 328-336, 2021.

3 ARTIGOS

PERSPECTIVAS DA APLICAÇÃO DO PLASMA ATMOSFÉRICO

A FRIO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

(Perspectives of cold atmospheric plasma application in cutaneous wound healing)

Situação do artigo:

Recebido: abr./2022.

Publicado: dez./2022.

Revista: Ciência Animal, v.32, n.4, p.106-120, out./dez., 2022.

RESUMO

A medicina do plasma evoluiu no tratamento da cicatrização de feridas, se destacando como uma excelente possibilidade terapêutica. Por se tratar de algo relativamente novo, ainda há a necessidade de conhecimento de alguns dos seus mecanismos de ação e aplicação. Portanto, este artigo teve como objetivo fazer um levantamento da literatura acerca da aplicação do plasma atmosférico a frio no tratamento da cicatrização de feridas cutâneas como forma de nortear o médico veterinário para utilização desse recurso terapêutico. O plasma é gerado por campos eletromagnéticos e é considerado o quarto estado da matéria, tendo sua ação impulsionada por substâncias gasosas. Sua ação se dá a partir da interação das espécies reativas presentes no seu jato, que produz efeitos estimuladores sobre a angiogênese, a produção de colágeno, os fatores de adesão de uma célula a outra e migração celular, além de fatores de crescimento e sinalizações importantes nesse processo. Há vários relatos da sua eficácia tanto de maneira direta como indireta, o que aumenta sua possibilidade de uso. De maneira geral, é preciso uma melhor definição de parâmetros e modos de aplicação seguros, baseados principalmente no fluxo, intensidade, posicionamento e tempo de jateamento na área lesionada. É importante ainda o médico veterinário pensar sobre as particularidades da espécie tratada no momento, o que aponta a versatilidade do uso dessa terapêutica na clínica de feridas. Mesmo diante dessas lacunas, os parâmetros descritos na literatura parecem ser seguros e podem ser utilizados como referência para a consolidação de novos estudos em diferentes espécies e práticas clínicas.

Palavras-Chave: Medicina do plasma, CAP, regeneração, ferimento, tratamento.

ABSTRACT

Plasma medicine has evolved in wound healing treatment, being highlighted as an excellent therapeutic possibility. As it is something relatively new, there is still a need to know some of its mechanisms of action and application. Therefore, this article aimed to make a survey of the literature on the application of cold atmospheric plasma in the treatment of skin wound healing as a way to guide the veterinarian to use this therapeutic resource. Plasma is generated by electromagnetic fields and is considered the fourth state of matter, having its action driven by gaseous substances. Its action occurs from the interaction of reactive species present in its jet, which produces stimulating effects on angiogenesis, collagen production, adhesion factors from one cell to another, and cell migration, in addition to growth factors and important signals in this process. There are numerous reports of its effectiveness, both directly and indirectly, which increases its

possibility of use. In general, a better definition of safe parameters and mode of application is needed, based mainly on the flow, intensity, positioning, and blasting time in the injured area. It is also important for the veterinarian to think about the particularities of the species treated at the moment, which points to the versatility of using this therapy in the wound clinic. Even in the face of these gaps, the parameters described in the literature appear to be safe and can be used as a reference for consolidating new studies in different species and clinical practices.

Keywords: Plasma medicine, CAP, regeneration, wounds, treatment.

INTRODUÇÃO

A ferida é caracterizada como uma descontinuidade na pele, independente da etiologia. E uma vez que se instaura, existem dois mecanismos principais de reparação: a regeneração, com substituição do tecido lesionado por um novo; e a cicatrização, caracterizada pela deposição do colágeno, tendo sua ocorrência marcada por uma cascata de eventos que envolve componentes da matriz extracelular, mediadores de natureza lipídica e proteica, células residentes e de defesa (HUSSNI et al., 2010; CHAVES et al. 2014).

No entanto, esses eventos estão passíveis de interferências tanto internas, como externas e isso faz com que o tratamento de feridas se apresente como um desafio, representando um dos principais fatores de morbimortalidade na prática clínica veterinária, além de impactar para o aumento dos custos de internação e tratamento (REIS FILHO et al., 2014). Assim, muitos mecanismos têm sido utilizados desde os medicamentos de uso tópico, até terapias com tecnologias não invasivas, a exemplo do plasma atmosférico a frio gerado em barreira dielétrica - DBD (LU et al., 2012).

Esse tratamento é caracterizado por descargas entre dois eletrodos divididos por uma barreira dielétrica isolante que energiza o ar para gerar o plasma. Dentre suas vantagens, têm-se o baixo custo, além da possibilidade de utilização de diversos gases que o tornam mais versátil. É de fácil aplicação e apresenta boa aceitação por ser indolor. Seus benefícios já são pronunciados na fase aguda pelo estímulo do processo de cicatrização de tecidos, com efeitos na proliferação de células endoteliais que apontam para a possibilidade de impactos positivos na angiogênese mediada posteriormente por essas células (KALGHATGI et al., 2008; ALCÂNTARA et al., 2013; BREHMER, 2015; ULRICH et al., 2015).

Nessa perspectiva, o uso do plasma DBD desperta o interesse das ciências médicas, por ter sido considerado tolerável pelos tecidos biológicos e pela sua capacidade de inativar microrganismos como bactérias, e promover uma mudança no tecido sem causar inflamação (WOEDTKE et al., 2014). Essas propriedades o tornam uma alternativa interessante para o

tratamento de cicatrização de feridas, apresentando-se como promissora para uso em aplicações na clínica médica veterinária.

Diante disso, esta pesquisa teve como objetivo fazer um levantamento da literatura acerca da aplicação do plasma atmosférico a frio para tratamento de feridas cutâneas como forma de nortear o médico veterinário para utilização desse recurso terapêutico na clínica.

DESENVOLVIMENTO

Cicatrização da pele e fatores envolvidos

Quando submetido à uma situação de descontinuidade extensa mais profunda, o corpo responde com a deposição de colágeno local, o que confere uma estruturação diferente do tecido primário (CAMPOS et al., 2007). Para isso, ocorre uma cascata de eventos coordenados e sobrepostos entre si com o objetivo principal de reconstituir o tecido perdido. Toda essa cascata se inicia com a hemostasia, caracterizada pela vasoconstrição da musculatura da parede dos vasos, formação do coágulo, deposição de fibrina e, portanto, estabilização da perda de sangue. Depois, ocorre a fase inflamatória, seguida das fases de proliferação ou de granulação, e de remodelamento ou de maturação (ISAAC et al., 2010; BRASSOLATTI et al., 2016).

Na fase inflamatória, há a presença marcante dos sinais cardinais (dor, calor, rubor, edema e perda de função) e seu tempo pode variar em 96 horas ou mais, a depender dos fatores intervenientes. A hemostasia e a coagulação são os mecanismos principais. Nessa fase, há uma migração de leucócitos e a cascata de eventos se inicia para que ocorra a reparação tecidual. O componente vascular é essencial para a formação de um ambiente propício, além do importante papel das plaquetas que liberam mediadores químicos, como o derivado de plaquetas (PDGF), o crescimento transformante- α e β (TGF- α , TGF - β), o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e o crescimento epidérmico (EGF); além de fatores que contribuem para a formação da matriz extracelular e o aumento da permeabilidade dos vasos para penetração de grupos celulares necessários (UZÊDA-E-SILVA et al., 2016; SORG et al., 2017).

Portanto, nas primeiras 24 horas após a lesão, há um predomínio de neutrófilos, que realizam fagocitose, além de liberar proteases e espécies reativas de oxigênio na intenção de eliminar os microrganismos presentes e degradar macromoléculas. E, após as primeiras 24 horas, começa a ocorrer uma alteração do tipo celular, com predomínio dos monócitos que se diferenciam em macrófagos e, juntamente com os residentes teciduais, irão coordenar todo o processo de reparo tecidual (UZÊDA-E-SILVA et al., 2016).

Quando há uma redução da atividade inflamatória, inicia-se a proliferação tecidual, essencial para a formação cicatricial, e pode durar até três semanas. Essa fase, é marcada por três eventos, a saber: angiogênese, reepitelização e a fibroplasia. A angiogênese se caracteriza pela migração de células endoteliais de vasos íntegros para a região da borda da ferida, dando origem a novos capilares. Nessa fase, têm-se a ação primordial do VEGF (RAKOCEVIC et al., 2017).

Na reepitelização há um restabelecimento das características estruturais e funcionais da epiderme que foram perdidas devido à lesão de descontinuidade. Para isso, há a participação expressiva de queratinócitos, que migram e se diferenciam na região (TAZIMA et al., 2018). A fibroplasia, por sua vez, caracteriza-se pela proliferação e migração de fibroblastos, através dos quimioatraentes EGF e PDGF, principalmente. Após atraídos, irão se diferenciar em miofibroblastos por meio do PDGF e TGF- β ; e, após, diferenciados, possuem capacidade de se contrair, o que faz com que essas células se movimentem por toda a área da ferida e depositem fibronectina sobre a fibrina. Dessa forma, começa-se a deposição de colágeno (ISAAC et al., 2010).

Sobre o colágeno, o tipo que mais predomina no tecido reparado é o colágeno tipo III, onde há ligação com os miofibroblastos que alinham essas fibras e promovem a contração da ferida, mediados por TGF- β e PDGF (GORDON, 2016). Quando há uma grande deposição de colágeno, diminuição do número de capilares e fibroblastos, inicia-se a fase de remodelação (TAZIMA et al., 2018).

A fase de remodelação pode durar semanas ou anos e se caracteriza pela diminuição da atividade celular, degradação do colágeno tipo III e aumento da produção de colágeno tipo I pelos fibroblastos de maneira equilibrada. À medida que ocorre essa transição, dá-se o remodelamento tecidual, fator necessário para a contração da ferida e aumento da resistência mecânica do tecido. Esse evento é mediado pela comunicação das células da matriz extracelular, além da influência de substâncias, como serotonina, epinefrina, angiotensina e bradicinina (PARK et al., 2017).

Com relação ao comportamento de aproximação da borda da ferida, a cicatrização pode ser classificada como por primeira intenção e por segunda intenção. Sendo assim, quando a extensão da lesão permite que as bordas da ferida se aproximem mecanicamente, diz-se que a cicatrização foi por primeira intenção. Nesses casos, a perda tecidual é mínima. Já quando a lesão é extensa a ponto de não permitir que esse processo ocorra, sendo necessário que haja o mecanismo de contração, têm-se a cicatrização por segunda intenção, que é caracterizada por grande perda tecidual. Atualmente, fala-se numa outra classificação que é a de terceira intenção, quando a ferida é mantida aberta e por meio de enxertos é feita essa aproximação das bordas (TAZIMA et al., 2018).

Plasma DBD: características, mecanismos de ação e evolução

O plasma é gerado por campos eletromagnéticos e pode ser considerado o quarto estado da matéria, além de ser o mais abundante na natureza, presente em vários fenômenos naturais, bem como nas tecnologias usadas no dia a dia (ARPAGAUS et al., 2018). Sua característica predominante é ser um meio condutor, composto por um conjunto de partículas, que, apesar de estarem individualizadas no meio, a interação entre elas é essencial para que se tenha a geração da energia (BARDOS e BARANKOVA, 2010).

Nesse campo de estudo, há o envolvimento de conhecimentos da física, das ciências da saúde e da medicina com o objetivo de estabelecer parâmetros aceitáveis tanto dentro do tratamento de superfícies e materiais biomédicos como diretamente de tecidos biológicos. Desse modo, a medicina do plasma tem evoluído para o tratamento de afecções como câncer, na ação antibacteriana, e nas alterações dermatológicas de maneira geral, com destaque para cicatrização de feridas (IZADJOO et al., 2018).

A ação do plasma é impulsionada a partir de substâncias gasosas que podem ser gás hélio, argônio, oxigênio, nitrogênio, ar ambiente, entre outros gases. Além disso, o plasma pode ser composto por partículas carregadas, como os elétrons e íons; partículas neutras; espécies reativas de oxigênio (ROS - Reactive Oxygen Species) e nitrogênio (RNS - Reactive Nitrogen Species), que são formadas a partir da interação dos elétrons presentes e disponíveis no plasma e as partículas de oxigênio e nitrogênio desse meio (JO et al., 2015).

Desse modo, as espécies reativas têm sua ação direta na membrana celular, provocando desde o rompimento por estresse oxidativo ou pelo aumento da tensão eletrostática até a morte celular pelo seu efeito neutralizador ou por fótons ultravioletas (UV), que causam a necrose (PINTO, 2018). Além disso, há os efeitos de cicatrização pelo estímulo e aceleração de componentes e mecanismos envolvidos nesse processo, como angiogênese, produção de colágeno, fatores de adesão de uma célula a outra e migração celular. Esses mecanismos podem ocorrer pela interação do óxido nítrico e peróxido de hidrogênio que atuam estimulando ou inibindo a proliferação celular, ao passo que estimulam fatores de crescimento importantes no processo inflamatório, e atuam na coagulação sanguínea junto com as ROS (ALVES et al., 2019).

Com relação a obtenção do plasma, têm-se basicamente o corona, que é aquele que emite o plasma por meio de superfícies assimétricas; o jato de plasma, que por sua conformidade pode

emitir o plasma para superfícies irregulares; e o plasma DBD, que é a descarga por barreira dielétrica que ocorre entre o espaço de dois eletrodos (NISHIME et al., 2016).

Nessa modalidade, é necessário que pelo menos uma ou as duas superfícies estejam recobertas por barreira dielétrica, que pode ter suas superfícies formadas por quartzo, vidro, cerâmica, entre outros materiais; além da distância entre elas que deve ser mínima. As descargas operam em altos intervalos de tensões, tendo como vantagens a limitação da corrente, a prevenção na formação de arco, o impedimento do trabalho de forma contínua, a capacidade de produzir moléculas excitadas, além da flexibilidade no que diz respeito à forma geométrica (podendo ser plana, cilíndrica, coplanar ou de superfície), e ao modo de operação, gases utilizados e parâmetros gerais (potência de entrada, fluxo do gás, frequência e pressão). Já como desvantagens, têm-se a limitação dimensional da amostra, já que as superfícies ficam muito próximas (LU et al., 2012).

Como forma de suprir as desvantagens desse sistema, surge a possibilidade do uso do jato tipo DBD, que atua dentro da mesma lógica explicada anteriormente, ao passo que possui uma baixa potência e, conseqüentemente, sua temperatura é próxima à ambiental, o que torna seu uso seguro independente da distância estabelecida com a superfície a ser tratada. Tais características o tornam aplicável na área biomédica (NISHIME et al., 2016).

Plasma DBD e cicatrização de feridas

A partir do século XIX, começou-se a aplicação do plasma para fins biomédicos, e desde então o campo de estudo para melhor aplicabilidade das propriedades físicas dessa terapia vem passando por evolução e aprofundamentos (WOEDTKE et al., 2014).

Nesse sentido, o CAP (do inglês Cold Atmospheric Plasma) tem sido amplamente difundido para o tratamento de cicatrização de feridas e isso se deve à interação das moléculas reativas (óxido nítrico - NO, Peróxido de Hidrogênio - H₂O₂, Ozônio - O₃, Dióxido de nitrogênio - NO₂, entre outras) presentes ao redor do jato do plasma que, quando administradas de maneira segura, promovem benefícios e recuperação para a saúde em geral, desde seus efeitos contra bactérias, regulação de metabolismo, comunicação entre os meios celulares, sinalização para fatores de crescimento, estímulo para coagulação sanguínea, angiogênese, respostas imunes e inflamatórias, produção de colágeno, adesão celular, diminuição do pH, levando à acidificação da pele e, assim, até o processo da coagulação, com a conversão de fibrinogênio em fibrina (DAESCHLEIN et al., 2012; DEZEST et al., 2017).

Essas espécies reativas acabam se associando e diminuindo ainda mais seus efeitos tóxicos, o que potencializa os efeitos terapêuticos. No caso do NO, quando em baixas concentrações, estimula os fatores de crescimento que são essenciais na fase inflamatória da cicatrização, enquanto o H₂O₂ atua diretamente no processo de proliferação celular e indução da apoptose (KIM et al., 2010).

Outro componente que surge com a aplicação do plasma é o ozônio, em uma concentração de 100µg/m³, levando em consideração uma distância de 5mm do eletrodo em relação à superfície da pele (TUMMEL et al., 2007). Esse componente já tem seu efeito discutido com relação à desinfecção e imunomodulação. Além disso, já se tem investigações sobre o efeito do ozônio na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos, através da sua ação antioxidante e demais mecanismos envolvidos numa concentração 60g/m³ (SÁNCHEZ et al., 2005).

Outra vantagem para o uso do plasma está relacionada com a abrangência da superfície disponível em sua totalidade, a falta de contato direto com a ferida que evita o risco de contaminação, sua aplicação segura e a associação com alívio da dor. Dessa maneira, a literatura tem relatado a eficiência da sua ação no processo de cicatrização. Isso pode estar relacionado ainda à capacidade de ativação da expressão de interleucinas como a IL-8; fatores

de crescimento como TGF-β1 e TGFβ2, envolvidos no processo de cura local. Além da ativação de integrinas, que promovem a adesão celular e a estimulação da angiogênese (LENDECKEL et al., 2015; IZADJOO et al., 2018).

Aplicabilidade clínica do plasma: parâmetros para obtenção do plasma e efeitos

Para obtenção do jato de plasma é necessário estabelecer parâmetros importantes, a exemplo da tensão, voltagem, taxa de fluxo e frequência. Isso pode variar entre os aparelhos utilizados, no entanto, de maneira geral, deve ser definido com vista nos objetivos clínicos e, portanto, ressalta a necessidade da discussão.

Já se sabe que o CAP surgiu como uma possibilidade terapêutica para o uso na clínica veterinária por ser um tratamento resolutivo de uma afecção que causa transtorno no bem-estar animal e oferece riscos para sua sanidade e vida, tanto pela presença da dor e demais processos envolvidos, como pelo risco de contaminação. Sobre seu uso, os estudos apontam parâmetros diversificados aplicados principalmente em animais de experimentação, a exemplo da pesquisa de Tipa e Kroesen (2011), em que utilizaram o jato de plasma por meio de uma fina agulha a uma tensão de 13,56 MHz, com gás hélio, numa taxa de fluxo de 1L/min e voltagem aplicada à ferida de

200-400 V de pico, com um consumo de 100mW de energia; e concluíram que o CAP possui efeitos tanto na desinfecção das feridas, como no processo de cicatrização.

Concordando com esse pensamento, Kubinova et al. (2017) utilizaram o plasma com o ar atmosférico, com um volume de $5 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, temperatura do gás de 30–35 °C, com variação e duração do tratamento de 60 e até 120 segundos. Esses autores encontraram um efeito apenas na fase proliferativa da cicatrização, além da morte bacteriana, tanto de gram negativas como de gram positivas. Não foi encontrada diferença significativa com relação ao fechamento da ferida relacionada ao tempo, porém houve o relato que tanto com tratamento de um minuto como com o de dois minutos, no dia sete, a ferida estava melhor fechada esteticamente, apontando para a eficiência de ambos os tempos. Concordando com estudos anteriores, não houve registro de efeitos adversos.

Ainda com relação ao tempo e ao modo de aplicação, Daeschlein et al. (2012), investigaram o efeito de três fontes diferentes de plasma (jato de plasma pulsado e não pulsado e o DBD), na ponta dos dedos de humanos utilizando o gás argônio com fluxo de 8L/min, com uma tensão de 1-5 kV, frequência de 1,5 MHz e tempo que variou de três a 240 segundos, e a 12mm de distância. Com relação a temperatura da pele, se manteve em 37 °C, a umidade da pele também se manteve e, com relação a transpiração transepidermica, houve redução nas aplicações do plasma pulsado e DBD em 20%, que se normalizou após 30 minutos. De maneira geral e a partir de avaliações subjetivas de dor e parestesia, os autores concluíram que o plasma foi bem tolerado pelos indivíduos.

Na medicina veterinária, isso foi relatado por Lademanna et al. (2013) através da pele intacta de orelhas de suínos. Esses autores conseguiram definir uma velocidade ideal do fluxo para manter uma temperatura aceitável pelo tecido (35 a 45 °C), de 8mm/s e 10mm/s, a uma distância de 5 a 8mm da área tratada. Foi testado ainda na mesma pele, após uma lesão, e os resultados encontrados foram semelhantes, ou seja, tanto na pele intacta como na pele lesionada, o uso do plasma se mostrou seguro com relação à temperatura do tecido. Portanto, apesar das diferenças morfológicas entre os animais, isso aponta para a possibilidade terapêutica na área.

Metelmann et al. (2012), em um estudo experimental, prospectivo, randomizado e controlado, avaliaram o efeito de diferentes parâmetros do plasma na pele de cinco indivíduos submetidos à uma lesão por laser de CO₂, através de fotografias obtidas no dia dez. O gás utilizado foi o argônio, num fluxo de 4 a 6 slm, que foi aplicado imediatamente após a ferida. Os autores concluíram que tratamentos a curto prazo (dez segundos) aplicados repetidamente por três dias foram mais eficazes, com resultados estéticos mais precoces; seguido pela aplicação única e a longo

prazo (30 segundos). Quando aplicado o tratamento a curto prazo (dez segundos) e com aplicação única, os resultados não foram satisfatórios, tendo comportamento igual ao do grupo controle.

Nessa mesma perspectiva, Metelmann et al. (2013), concluíram que o plasma possui efeitos satisfatórios no momento inicial da cicatrização, ou seja, na fase inflamatória; bem como de maneira tardia. Os autores avaliaram as lesões após 12 meses e relataram que o tratamento com plasma demonstrou uma estética superior e prevenção de doenças pós-traumáticas a longo prazo, comprovando a boa recuperação da pele por essa terapêutica. Algo de extrema importância na clínica veterinária já que os animais são bastante suscetíveis a lesões devido seus hábitos de vida. Assim, esses resultados apontam para uma possibilidade não somente do tratamento imediato, mas da diminuição tanto de recidivas, como do risco da cronicidade.

Sob outra perspectiva, Nastuta et al. (2011), em seu experimento com ratos e utilizando o gás hélio por meio do jato de plasma com um fluxo de 3slm (velocidade do gás $2,5\text{ms}^{-1}$), potência de 2kHz e tensões de 4-5kV, no tempo de 40 segundos diários e acompanhamento de 21 dias, compararam o efeito da aplicação do plasma na ferida ao seu controle e do plasma aplicado a um curativo de poliuretano e seu controle, concluindo que tanto o tratamento direto como a aplicação dos curativos tratados com plasma apresentaram efeitos benéficos nas feridas, com aceleração da reepitelização da epiderme. Sem dúvida, isso vem a sanar possíveis dificuldades no atendimento daqueles animais com temperamento mais difícil, onde o uso do plasma de maneira direta poderia ser inviável.

O mesmo fato foi encontrado no estudo de Martines et al. (2020) com ovelhas, utilizando o plasma com gás hélio, a um fluxo de 1,75L/min, de forma indireta, durante dois minutos em cada ferida, com uma potência de 0,5 W. Houve um fechamento mais rápido para aquelas feridas tratadas com plasma, além da diminuição da carga bacteriana. Concomitantemente, houve um aumento de ROS e, após seis semanas, redução significativa da inflamação. Ainda, observou-se uma indução para angiogênese de maneira antecipada, com forte proliferação celular. Um outro achado relevante foi a promoção do crescimento de pelos ocasionada pelo plasma, algo promissor no tratamento de feridas cutâneas de animais, associado à saúde, proteção e estética.

Esses dados subsidiam o uso do plasma em diferentes situações, gerando possibilidades terapêuticas. Porém, percebe-se que ainda há uma grande variação na forma de uso, na definição dos parâmetros e na escolha do gás. De maneira geral, mesmo com gases diferentes, impactos positivos têm sido relatados no processo de cicatrização. Porém, alguns autores buscam entender a

ação de cada um para melhor elucidar seu mecanismo de ação e escolha.

Decisão terapêutica: escolha do gás utilizado no CAP e seus efeitos no processo de cicatrização

O plasma atmosférico a frio é uma ferramenta bastante versátil. Para sua obtenção podem ser utilizados diferentes gases de trabalho. Esses gases certamente possuem efeitos clínicos diferentes, porém isso ainda está em discussão na literatura. O que se tem consolidado é que os dois mais utilizados são o argônio e o hélio, por serem gases inertes e mais estáveis, além de já terem seus efeitos comprovadamente embasados cientificamente.

Nesse sentido, Alcântara et al. (2013) realizaram um estudo comparativo entre o gás hélio e o argônio. O argônio foi aplicado com uma dose de exposição de 1,2J/cm² e um fluxo de 0,5slm, a uma distância de 23 a 5mm, durante um minuto, sendo o processo repetido mais duas vezes com intervalo de 20 minutos. Já o Hélio foi aplicado na segunda fase do experimento, com uma dose de 60J/cm² e fluxo na agulha de 1,5slm, por cinco minutos. Esse procedimento foi repetido por três vezes, com intervalo de 60 minutos entre as aplicações. A presença das espécies reativas (ROS e RNS) foi observada após a aplicação de ambos os gases. Porém, um fato que chamou a atenção foi que o óxido nítrico, que desempenha um papel bastante relevante no processo de cicatrização, só foi encontrado com a aplicação do gás hélio, apontando que esse gás foi o que promoveu o fechamento total da ferida. Uma limitação desse estudo é o fato de ter sido utilizada a mesma ferida para tal aplicação.

Já Kubinova et al. (2017) defendem o uso do ar ambiente devido à ausência de efeitos adversos. Enquanto outros autores que utilizaram o argônio também relataram a contribuição desse gás. Isso pode ser visto no estudo de Shao et al. (2016) através da aplicação do microplasma com argônio, com uma potência variando de 5–18 W (com uma média de 17 W) e uma taxa de fluxo de ar de 5 slm, a uma temperatura abaixo de 40 °C. Os autores concluíram que a aplicação dessa modalidade contribuiu para a diminuição do leito da ferida a partir de uma avaliação da cinética da lesão tanto nos dias sete e 14 como no dia 21, com comprovação de tecido neoformado. A concentração de NO presente no tecido aumentou progressivamente associada aos tempos de 30, 60 e 90 segundos.

Hung et al. (2016), trataram ratos com o plasma com 99% de argônio (1,8L/min) e 1% de oxigênio (0,01L/min), durante cinco minutos diários, com uma frequência entre

0,5kHz e 4kHz, e encontraram diferenças com relação ao tempo de cicatrização e presença de exsudato na ferida com relação ao grupo controle que apresentou persistência do exsudato. Ao final do estudo, os autores concluíram que o uso do plasma promoveu a estimulação da proliferação, migração celular e adesão celular para a área da ferida, apontando que o plasma melhora o processo de cicatrização por meio do aumento de espécies reativas, como o ROS, além de promover o reparo histológico precoce.

Portanto, antes de pensar na escolha do gás, é preciso compreender os mecanismos de ação de cada um deles para que, no momento da terapêutica, essa escolha esteja embasada em critérios consistentes, como o tipo da lesão, a situação e o tempo que o tecido está lesionado, as doenças sistêmicas associadas, bem como o fator espécie, que, apesar de apresentar mecanismos fisiológicos similares para a cicatrização, possui suas especificidades, como é o caso do cão e do gato, por exemplo (BOHLING e HENDERSON, 2006). Além disso, há o caso dos cavalos, que apresentam a grande problemática da alta incidência de feridas e dificuldade de cicatrização (PRADO et al., 2020). Ou ainda a correlação entre o ambiente que o animal vive, os hábitos de vida e a predisposição para infecções e possíveis novos traumas. Nessa perspectiva, cabe ao médico-veterinário analisar os efeitos do plasma de acordo com as especificidades e necessidades do seu paciente.

Efeitos diretos do CAP nas etapas de cicatrização da ferida

Com relação à influência do CAP no processo de cicatrização, Lopes et al. (2013) relataram em seu estudo que, quando comparado os infiltrados presentes no momento da inflamação, o grupo tratado com plasma apresentou um quantitativo maior de infiltrados, contrapondo-se ao grupo controle. Da mesma forma com relação à concentração de colágeno, que se apresentou mais próxima numericamente das taxas de colágeno da pele normal. Contrariando isso, Kubinova et al. (2017) afirmaram que apesar de ter ocorrido aumento no número de colágeno do grupo tratado não foi significativo. Além do que a quantidade de colágeno diminuiu, aumentando somente no dia sete. Esses autores sugerem ainda que o plasma apresentou um efeito positivo no processo de contração da ferida e reepitelização na fase posterior, a partir da diminuição da granulação no dia sete. Com relação ao número de macrófagos na região, não houve diferença entre os grupos.

A respeito das avaliações hematológicas, Hung et al. (2016) relataram que o número de leucócitos se manteve maior no grupo controle no segundo dia após a lesão, quando comparado ao grupo experimento; comportamento esse mantido após um mês, porém não

apresentou diferença significativa. Entretanto, houve menos infecção e processo inflamatório no grupo experimento. A toxicidade dos órgãos pelo plasma também foi avaliada, apontando para resultados que comprovaram a segurança do seu uso.

Com relação à angiogênese, Kubinova et al. (2017) relataram que a mesma não ocorreu na fase inflamatória, ao contrário do estudo de Lopes et al. (2013), que comprovou um aumento de vasos sanguíneos no grupo tratado com plasma no segundo dia do experimento, em contrapartida ao controle que foi somente no sétimo dia.

Essa discussão, portanto, remete mais uma vez à escolha dos parâmetros ideais e, principalmente, seguros, pois, devido grande variabilidade na aplicação e suas definições, alguns efeitos acabam não sendo bem elucidados. Porém, já se sabe que a letalidade para as células ou efeitos terapêuticos está diretamente relacionada à dose oferecida ao tecido. Pesquisas apontam que diferentes concentrações de gases, seja de hélio, nitrogênio, oxigênio ou outro com ação isolada ou combinados, possuem efeitos deletérios nas células do corpo de forma diferenciada (SHAO et al., 2016; DEZEST et al., 2017).

Entretanto, vale lembrar que, para danificar uma célula do organismo, as doses precisam ser muito maiores do que aquelas necessárias para eliminar uma bactéria, já que as espécies reativas são utilizadas por nosso sistema imunológico para esse fim. Isso desponta como uma fundamentação teórica para o uso do plasma similarmente a um antibiótico tópico (WOEDTKE et al., 2014; KURAHASHI e FUJII, 2015).

A partir desta análise da literatura, já se pode inferir que há uma relação direta entre o tempo de exposição e a toxicidade do plasma. No caso de células epiteliais, doses intermediárias de 60 segundos e doses maiores de 300 segundos, foram capazes de ativar a apoptose celular (RECEK et al., 2016). Essa apoptose está relacionada extensivamente à atuação dos radicais livres (NO e ROS, predominantemente) no processo oxidativo da membrana celular; além da fragmentação do DNA da célula (LOPES et al., 2013).

No entanto, Kim et al. (2010) relataram que essas espécies reativas surgem de forma natural durante o reparo tecidual, e o plasma surge como uma fonte auxiliar nesse processo, potencializando as respostas e agindo diretamente no processo da cicatrização, que viabiliza seu uso. Porém, Kos et al. (2017) aplicaram um plasma com gás hélio no espaço de 2cm entre o dispositivo e a pele do rato, com um fluxo de 5L/min por 0,5s, um, dois, três e quatro minutos. No caso do tratamento de quatro minutos, o dano à pele foi avaliado

adicionalmente usando taxas de fluxo de plasma variando de 1±5L/min. Os autores dividiram os danos em precoces ou diretos, que se referiam às queimaduras, e indiretos ou tardios, fazendo alusão à presença de edema ao redor da área tratada. O tempo de aplicação influenciou no aparecimento dos danos ditos precoces ou imediatos, com aqueles animais tratados por um tempo mais prolongado, que correspondeu a quatro minutos, apresentando maiores danos com queimaduras graves.

Porém, com relação aos danos indiretos, não houve influência do tempo, mas sim do ângulo de jateamento da pele, sendo que quando o jato esteve totalmente perpendicular, foi associado ao maior aparecimento. Com relação ao fluxo do jato, a intensidade também foi responsável por causar danos. Quando no valor mínimo (1L/min) não conseguiu alcançar a pele e no valor máximo causou danos maiores atingindo até a derme. O fluxo também influenciou no aumento da temperatura, sendo que no menor fluxo praticamente não ocorreu alteração dessa variável, nos demais fluxos foi atingido o máximo e mantido o padrão, e na taxa de fluxo de 2L/min as temperaturas da pele foram ligeiramente elevadas, já nas taxas de 3±5L/min, apresentaram as medidas mais altas. De acordo com o fluxo, houve também o aparecimento de mais espécies reativas, que acabou causando danos na pele tardiamente (KOS et al., 2017).

Portanto, isso desperta para a necessidade de melhor entendimento e aprofundamento acerca dos caminhos bioquímicos da ação do plasma, além da escolha correta do tipo de gás, parâmetros utilizados e modo de aplicação. De toda forma, a partir dos dados já disponíveis na literatura, é possível o médico veterinário despertar para a aplicabilidade dessa técnica como uma possibilidade de sucesso terapêutico, tendo em vista a particularidade dos seus pacientes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização e o aprimoramento da aplicação do plasma são, neste momento, as necessidades mais urgentes dentro do campo da medicina do plasma. Isso será obtido através da melhor elucidação dos seus mecanismos de ação, e, para o médico-veterinário, do entendimento das especificidades morfológicas e fisiológicas da pele tratada no momento.

Mesmo diante dessa lacuna, os efeitos do plasma a nível microscópio, desde a angiogênese, a produção de colágeno, a liberação de espécies reativas, a sinalização para

células de defesa, entre outros, embasam o seu uso para a terapêutica de cicatrização de feridas ao passo que impacta positivamente a nível macroscópico.

Portanto, torna-se possível um direcionamento para a prática clínica veterinária, a partir da definição de parâmetros já estabelecidos de maneira pontual ou dentro de intervalos considerados seguros, sendo o tempo de aplicação, o fluxo e o posicionamento em relação à ferida, medidas a serem consideradas nessa tomada de decisão.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, E.G.; CALLEJAS, R.L.; PEDRO, RAMÍREZ, R.M.; EGUILUZ, R.P.; MUÑOZ, R.F.; CABRERA, A.M.; BAROCIO, S.R.; ALVARADO, R.V.; MÉNDEZ, B.G.R.; CASTRO, A.E.M.; BENEITEZ, A.P.; OLMEDO, I.A.R. Accelerated Mice Skin Acute Wound Healing In Vivo by Combined Treatment of Argon and Helium Plasma Needle. *Archives of Medical Research*, v.44, n.3, p.69–177, 2013.

ALVES D.P.; PINHEIRO C.J.G.; RIBEIRO C.M. Construção de um reator de plasma frio à pressão atmosférica com materiais de baixo custo. *The Brazilian Journal of Development*, v.5, n.4, p.3914-3919, 2019.

ARPAGAUS, C.; OBERBOSSSEL, G.; ROHR, P.R.V. Plasma treatment of polymer powders from laboratory research to industrial application. *Plasma Process Polymer*, v.5, n.12, p.1-60, 2018.

BARDOS, L.; BARANKOVA, H. Cold atmospheric plasma: sources, processes, and applications. *Thin Solid Films*, v.518, n.23, p.6705–6713, 2010. BOHLING, M.W.; HENDERSON, R.A. Differences in cutaneous wound healing between dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.36, n.4, p.687- 92, 2006

BRASSOLATTI, P.; BOSSINI, P.S.; OLIVEIRA, M.C.; KIDO, D.H.W.; TIM, C.R., LOPES, L.A.; DE AVÓ, L.R.S.; MOREIRA, F.M.A.; PARIZOTTO, N.A. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. *Microscopy Research and Technique*, v.79, n.4, p.313–20, 2016.

BREHMER, F.; HAENSSLE, H.A.; DAESCHLEIN, G.; AHMED R., PFEIFFER, S.; GÖRLITZ, A.; SIMON, D.; SCHÖN, M.P.; WANDKE, D.; EMMERT, S.; 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). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v.29, n.1, p.148-155, 2015.

CAMPOS, A.C.L.; BRANCO, A.B.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. *ABCD, Arquivos Brasileiros de Dermatologia*, v.20, n.1, p.51-58, 2007.

CHAVES, M.E.A.; ARAÚJO, A.R.; PIANCASTELLI, A.C.C.; PINOTTI, M. Effects of low power light therapy on wound healing: LASER x LED. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v.89, n.4, p.616-623, 2014.

KIM, C.H.; KWON, S.; BAHN, J.H.; LEE, K.; JUN, S.I.; RACK, P.D.; BAEK, S.J.; SEUNG, J.B. Effects of atmospheric nonthermal plasma on invasion of colorectal cancer cells. *Applied physics Letters*, v.96, n.24, p.3701, 2010.

DAESCHLEIN, G.; SCHOLZ, S.; AHMED, R.; VON WOEDTKE, T.; HAASE, H.; NIGGEMEIER, M.; KINDEL, E.; BRANDENBURG, R.; WELTMANN, K.D.; JUENGER, M. Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. *Journal of Hospital Infection*, v.81, n.3, p.177-183, 2012.

DEZEST, M.; CHAVATTE, L.; BOURDENS, M.; QUINTON, D.; CAMUS, M.; GARRIGUES, L.; DESCARGUES, P.; ARBAULT, S.; SCHILTZ, O.B.; CASTEILLA, L.; CLÉMENT, F.; PLANAT, V.; BULTEAU, A.L. Mechanistic insights into the impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on human epithelial cell lines. *Scientific Reports*, v.7, n.1, p.41163, 2017.

GORDON, S. Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*, v.44, n.3, p.463-476, 2016.

HUNG, Y.W.; LEE, L.T.; PENG, Y.C.; CHANG, C.T.; WONG, Y.K.; TUNG, K.C. Effect of a nonthermal-atmospheric pressure plasma jet on wound healing: An animal study. *Journal of the Chinese Medical Association*, v.79, n.6, p.320–328, 2016.

HUSSNI, C.A.; GROH, T.M.; ALVES, A.L.G.; CROCCI, A.J.; DE MELLO, N.J.L.; WATANABE, M.J. Efeitos da fenilbutazona na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em equinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.47, n.4, p.262-267, 2010.

ISAAC, C., LADEIRA, P.R.S.; REGO, F.M.P.; ALDUNATE, J.C.B.; FERREIRA, M.C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Revista de Medicina (São Paulo)*, v.89, n.3/4, p. 125-31, 2010.

IZADJOO, M.; ZACK, S.; KIM, H.; SKIBA, J. Medical applications of cold atmospheric plasma: state of the Science. *Journal of Wound Care North American*, v.27, n.9, p.4-10, 2018.

JO, H.; JUN, H.W.; SHIN, J.; LEE, S.H. Biomedical Engineering: Frontier Research and Converging Technologies, v.9, p.1–511, 2015.

KALGHATGI, S.U.; FRIDMAN G.; FRIDMAN A.; FRIEDMAN G.; CLYNE, A.M. Non Thermal Dielectric Barrier Discharge Plasma Treatment of Endothelial Cells. *Conferência Internacional Anual da IEEE Engenharia em Medicina e Biologia.*, v.30, n.1, p.3578-3581, 2008.

KURAHASHI, T.; FUJII, J. Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing *Journal of Developmental Biology*, v.3, n.2, p.57-70, 2015.

KUBINOVA, S.; ZAVISKOVA, K.; UHERKOVA, L.; ZABLOTSKII, V.; CHURPITA O.; LUNOV O.; DEJNEKA, A. Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats. *Scientific Reports*, v.7, n.45183, p.1-11, 2017.

KOS, S.; BLAGUS, T.; CEMAZAR, M.; FILIPIC, G.; SERSA, G.; CVELBAR, U. Safety aspects of atmospheric pressure helium plasma jet operation on skin: In vivo study on mouse skin. *PLoS ONE*, v.12, n.4, p.1-5, 2017.

LADEMANNA J.; ULRICHA C.; PATZELTA A.; RICHTER H.; KLUSCHKEA F.; KLEBESA M.; LADEMANNB O.; KRAMERB A.; WELTMANNK D.; LANGE ASSCHENFELDT B. Risk assessment of the application of tissue-tolerable plasma on human skin. *Clinical Plasma Medicine*, v.1, n.1, p.5–10, 2013.

LENDECKEL, D.; EYMANN, C.; EMICKE, P.; DAESCHLEIN, G.; DARM, K.; O'NEIL, S.; BEULE, A.G.; WOEDTKE, T.V.; VÖLKER, U.; WELTMANN, K.D.; JÜNGER, M.; HOSEMANN, W.; SCHARF, C. Proteomic changes of tissue-tolerable plasma treated airway epithelial cells and their relation to wound healing. *BioMed Research International*, v.2015, n.1, p.1-17, 2015.

LOPES, B.B; KRAFT, M.B.P.L.; REHDER, J.; BATISTA, F.R.X.; PUZZI, M.B. The interactions between non-thermal atmospheric pressure plasma and ex-vivo dermal fibroblasts. *Procedia Engineering*, v.59, n.1, p.92–100, 2013.

LU, X.; LAROUSSI, M.; PUECH, V. On atmospheric-pressure non-equilibrium plasma jets and plasma bullets. *Plasma Sources Science and Technology*, v.21, n.3, p.1-17, 2012.

MARTINES, E.; BRUNB, P.; CAVAZZANAA, R.; CORDAROA, L.; ZUINA, M.; MARTINELLO, T.; GOMIEROC, C.; PERAZZID, A.; MELOTTIC, L.; MACCATROZZOC, L.; PATRUNOC, M.; IACOPETTI, I. Wound healing improvement in large animals using an indirect helium plasma treatment. *Clinical Plasma Medicine*, v.17, n.18, p.17-18, 2020.

METELMANN, H.R.; WOEDTKE, T.V.; BUSSIAHN, R.; WELTMANN, K.D.; RIECK, M.; KHALILI, R.; PODMELLE, F.; WAITE, P.D. Experimental Recovery of CO₂-Laser Skin Lesions by Plasma Stimulation. *The American Journal of Cosmetic Surgery*, v.29, n.1, p.52– 56, 2012.

METELMANN, H.R.; THI, T.V; HOANG, T.D.; THI, N.B.L.; HOANG, T.T.H.; THI, T.T.P.; TRAN, M.L.L.; VAN, T.D.; NGUYEN, T.T.H.; NGUYEN, T.L.; LE, D.Q.; LE, T.K.X.; WOEDTKE, T.V.; BUSSIAHN, R.; WELTMANN, K.D.; KHALILI, R.; PODMELLE, F. Scar formation of laser skin lesions after cold atmospheric pressure plasma (CAP) treatment: A clinical long term observation. *Clinical Plasma Medicine*, v.1, n.1, p.30–35, 2013.

NASTUTA, A.V.; TOPALA I.; GRIGORAS, C.; POHOATA, V.; POPA, G. Stimulation of wound healing by helium atmospheric pressure plasma treatment. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v.44, n.10, p.1-9, 2011.

PARK, J.W.; HWANG, S.R.; YOON, A.S. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules*, v.22, n.8, p.1259, 2017.

PINTO, E.K.M. Desenvolvimento de um Dispositivo de Jato de Plasma para o tratamento de cancro da pele, 2018. 106p. (Dissertação Mestrado em Engenharia Biomédica). Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2018.

PRADO L.G.; MARTINS, N.A.; MACHADO, M.R.F.; ARAUJO, G.H.M. Ozonioterapia no tratamento de feridas em equino. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.34, n.6, p.375-387, 2020.

RAKOCEVIC, J.; ORLIC, D.; AJTIC, O.M.; TOMASEVIC, M.; DOBRIC, M.; ZLATIC, N.; MILASINOVIC, D.; STANKOVIC, G.; OSTOJIC, M.; BOROVIC, M.L. Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Experimental and Molecular Pathology*, v.102, n.2, p.303-313, 2017.

RECEK, N.; RESNIK, M.; MOTALN, H.; TURNŠEK, T.L.; AUGUSTINE, R.; KALARIKKAL, N.; THOMAS, S.; MOZETIČ, M. Cell Adhesion on Polycaprolactone Modified by Plasma Treatment. *International Journal of Polymer Science*, v.60, n.9, p.1551-1642, 2016.

REIS FILHO, N.P.; MENDES, D.S.; SOUZA, M.S.B.; ARIAS, M.V.B. Uso de coberturas no tratamento de feridas de cães e gatos: Revisão de literatura. *Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação*, v.12, n.41, p.1-637, 2014.

SÁNCHEZ, G.M.; CEPERO, S.M.; RE, L.; ALDALAIEN, S.E.M. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *European Journal of Pharmacology*, v.523, n.1/3, p.151– 161, 2005.

UZÊDA-E-SILVA, V.D.; RODRIGUEZ, T.T.; ROCHA, I.A.; XAVIER, F.C.; DOS SANTOS, J.N.; CURY, P.R.; RAMALHO, L.M. Laser phototherapy improves early stage of cutaneous wound healing of rats under hyperlipidic diet. *Lasers in Medical Science*, v.31, n.7, p.1363-70, 2016.

SHAO, P.L.; LIAO, J.D.; WONG, T.W.; WANG, Y.C.; LEU, S.; YIP, H.K. Enhancement of Wound Healing by Non-Thermal N₂/Ar Micro-Plasma Exposure in Mice with Fractional CO₂-Laser-Induced Wounds. *PLoS ONE*, v.11, n.6, p.1-15, 2016.

SORG, H.; TILKORN, D.J.; HAGER, S.; HAUSER, J.; MIRASTSCHIJSKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, v.58, n.1-2, p.81-94, 2017.

TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. *Revista Medicina*, v.41, n.3, p.259-264, 2018. TIPA, R.S.; KROESEN, G.M.W. Plasma-Stimulated Wound Healing. *IEEE Transactions on Plasma Science*, v.39, n.11, p.2978-2979, 2011.

TUMMEL, S.; MERTENS, N.; WANG, J.; VIÖL, W. Low Temperature Plasma Treatment of Living Human Cells. *Plasma Processes and Polymers*, v.4, n.1, p.465-469, 2007.

ULRICH, C.; KLUSCHKE, F.; PATZELT, A.; VANDERSEE, S.; CZAIIKA, V.A.; RICHTER, H.; BOB, A.; VON HUTTEN, J.; PAINSI, C.; HÜGE, R.; KRAMER, A.; ASSADIAN, O.; LADEMANN, J.; LANGE-ASSCHENFELDT, B. Clinical use for cold atmospheric pressure argon plasma in chronic leg ulcers: a pilot study. *Journal of Wound Care*, v.24, n.5, p.196-203, 2015.

UNISHIME, T.M.C.; BORGES, A.C.; KOGA-ITO, C.Y.; MACHIDA, M.; HEINLE, R.O.; KOSTOVA K.G. Non -thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. *Surface and Coatings Technology*, v.312, p.19–24, 2016.

WOEDTKE, T.V.; METELMANN, H.R.; WETLMANN, K.D. Clinical Plasma Medicine: State and perspective of in vivo application of cold atmospheric Plasma. *Contributions to Plasma Physics*, v.54, n.2, p.104-117, 2014.

USO DE PLASMA ATMOSFÉRICO FRIO NO TRATAMENTO DE FERIDAS DE PELE: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

USE OF COLD ATMOSPHERIC PLASMA TO TREAT SKIN WOUNDS: A SYSTEMATIC REVIEW

Situação do artigo:

Submetido em: 23/10/2023

Revista: Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança.

ABSTRACT

Cold Atmospheric Plasma (CAP) has emerged as a promising technology for the wound healing process. Therefore, this study aimed to make a systematic review of CAP effects on the healing of skin wounds, focusing on the protocols used and decision-making for applications. For your development blindly, two researchers conducted a search in five electronic databases (PubMed; Web of Science; Scielo; Scopus and EMBASE) using a series of keyword combinations. The first selection was by the title, the second by the abstract, and the third by the full reading of the article. To compose this study, 28 articles were selected. The greatest difficulty was the non-uniformity of the keywords related to CAP and intervention protocols not described systematically and clearly. There is an agreement among the authors that CAP contributes positively through reactive species, nitric oxide, proinflammatory, and cellular signaling, both quantitatively and qualitatively to the healing process, acting in the re-epithelialization, angiogenesis, increased oxygenation, coagulation, collagen synthesis, among others. The phase it operates and the ideal application time are still controversial. Its application can occur directly and indirectly, with most studies still being conducted in the laboratory in acute and clean wounds. The most commonly used gases are Helium and Argon. It is concluded that the positive effect of CAP on the healing process is already a consensus in the literature. However, there is still a need to clarify the mechanisms involved.

Keywords: Plasma gases. Skin. Wound Healing

RESUMO

O Plasma Atmosférico Frio (CAP) surgiu como uma tecnologia promissora para o processo de cicatrização de feridas. Diante disto, este estudo teve como objetivo fazer uma revisão sistemática dos efeitos do CAP na cicatrização de feridas cutâneas, com foco nos protocolos utilizados e na tomada de decisão para aplicações. Para seu desenvolvimento, dois pesquisadores realizaram uma busca cega em cinco bases de dados eletrônicas (PubMed; Web of Science; Scielo; Scopus e EMBASE) usando uma série de combinações de palavras-chave. A primeira seleção foi pelo título, a segunda pelo resumo e a terceira pela leitura completa do artigo. Para compor este estudo, foram selecionados 28 artigos. A maior dificuldade foi a não uniformidade das palavras-chave relacionadas ao CAP e os protocolos de intervenção não descritos de forma sistemática e clara. Há concordância entre os autores de que o CAP contribui positivamente por meio de espécies reativas, óxido nítrico, pró-inflamatório e sinalização celular, tanto quantitativa quanto qualitativamente para o processo cicatricial, atuando na reepitelização, angiogênese, aumento da oxigenação, coagulação, síntese de colágeno, entre outros. A fase em que atua e o tempo ideal de aplicação ainda são controversos. Sua aplicação pode ocorrer de forma direta e indireta, sendo a maioria dos estudos ainda realizados em laboratório em feridas agudas e limpas. Os gases mais usados são o hélio e o

argônio. Conclui-se que o efeito positivo do CAP no processo cicatricial já é consenso na literatura. No entanto, ainda há a necessidade de esclarecer os mecanismos envolvidos.

PALAVRAS-CHAVE: Gases plasmáticos. Pele. Cicatrização de feridas.

INTRODUCTION

Even with the natural cycle, wound treatment is a challenge, especially in ensuring the uniformity and effectiveness of the repair process. Many mechanisms have been used in this context, such as topical drugs and even therapies with non-invasive technologies. Among these technologies is the use of cold atmospheric plasma (CAP) generated by discharges between two electrodes separated by an insulating dielectric barrier (DBD) that energizes air¹.

In the treatment of skin wound healing, the use of this device has been evaluated among the non-invasive procedures with benefits in the acute phase since it has an antiseptic effect to restore the physiological potential of healing by decreasing bacterial load; and stimulating the tissue regeneration and healing process, with effects on the proliferation of endothelial cells that point to the possibility of positive impacts on angiogenesis mediated by these cells. Besides the easy application and good acceptance by patients,²⁻⁴ low cost, the possibility of using various gases makes it more versatile, the most used being argon and helium, which still arouses discussion as to the choice⁵.

In this perspective, the use of CAP arouses the interest of the medical sciences, as it has been considered tolerable by biological tissues and its ability to inactivate microorganisms and promote a change in tissue without causing inflammation. These properties make it an interesting alternative for wound healing treatment and are promising for use in clinical applications. Nevertheless, despite the knowledge about its benefits and effects on the wound healing process, there is still a need to understand the mechanisms of how CAP works, as well as well-founded justifications for choosing the gas, definition, and consolidation of the parameters to be used and protocols to be followed⁶.

Therefore, this study aimed to conduct a systematic review of the effects of cold atmospheric plasma on the healing of skin wounds, focusing on the protocols used and decision-making for applications.

METHODS

Research Strategy

Blindly, two researchers conducted an electronic search in the following databases: PubMed; Web of Science; Scielo; Scopus and EMBASE using the following keyword combinations: Cold plasma Atmospheric; Skin; wounds healing and Non- thermal Atmospheric Pressure plasma; Skin; wounds healing and CAP; Wounds; Healing and whenever necessary some combination of these words were applied in an attempt to find as many articles as possible. The same keywords were used in English and Portuguese depending on the researched database. Preference was given to the use of those registered in the health descriptors (DECS) and in the Medical Subject Headings (MESH). However, other words based on the articles found were used whenever it was impossible to use only registered descriptors.

The guiding question for this study was: What is the effect of cold atmospheric plasma on skin wound healing?

Study selection

For the inclusion criteria, the language was considered, and searches were conducted in Portuguese and English with the respective descriptors. The temporal space established was from the last 12 years, a period when studies with plasma medicine emerged; the file being available in full, being published in an indexed journal, being an original article with experimental studies *in vivo*; dealing with the process of tissue repair in skin wounds was also considered. The exclusion criteria were applied to those articles that dealt with the use of cold atmospheric plasma for other purposes, such as: exclusively to decrease the bacterial load or treatment of wounds associated with diabetes, oncology area, dental treatments, surface treatment, grafts or flaps, those who worked with humans with comorbidities, among others; in addition to those studies that used another type of plasma to treat skin wounds or performed overlapping plasma with adjuvant treatment. We also excluded letters to reviewers, review studies, as well as academic final works, dissertations, and theses. Studies that worked exclusively with *in vitro* and *ex vivo* assays were also excluded.

The researchers were careful to ensure that all articles met the inclusion criteria. In cases of discrepancies between articles, all criteria were reviewed and discussed among researchers.

After this first search, the articles were selected according to the criteria mentioned above. The first selection was made by the title, the second by the abstract, and the third by the full reading of the article. Thus, after applying the inclusion and exclusion criteria, the article was selected, and the necessary information was extracted, which is presented in the results.

RESULTS

The search results according to the keywords used, their combinations, and databases are summarized in Table 1. Scopus and Pubmed generated the most results. Most of the articles selected for the present study were initially found in the latter, and from it, the repetitions were excluded. When the research was conducted in Portuguese, no study was found. Therefore, all articles selected for the present study were in English. There was the exclusion of articles by repetition between the databases and keyword combinations. The articles were also excluded, based on the inclusion and exclusion criteria by title, abstract, and full text reading. Finally, of the 627 articles found, 29 were selected to compose the study base of this review.

TABLE 1: DETAILED SEARCH RESULTS IN EACH DATABASE ACCORDING TO THE KEYWORDS USED.

Database	Search	1	2	3	4	5	6	Total ^b
Scopus	Total number	101	35	81				217
	Selected number	5	5	7				17
	Repeated number	0	0	2				2
EMBASE	Total number				45			45
	Selected number				5			5
	Repeated number				8			8
Web Of Science	Total number		74	78				152
	Selected number		4	13				17
	Repeated number		4	14				18
PubMed	Total number		83			81	49	213
	Selected number		25			4	0	29
	Repeated number		0			23	10	33
Number of papers selected ^c								29

^a1- CAP, Skin, Wound; 2- Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma, Skin, Wound; 3- Cold Atmospheric Plasma, Skin, Wound Healing; 4- CAP, Wound, Healing; 5- Cold Atmospheric Plasma, Skin, Wound; 6- CAP, Skin, Wound healing. ^bTotal number of found articles may be greater than the number of papers used due the fact that the same paper appears multiple times in the same database with different keywords. ^cFinal number of papers selected.

Table 2 shows the general information of the articles from the delimitation of the last 12 years of publication. There has been a publication trend over the years, and in 2014 there was no publication on the use of CAP for wound healing with the original article. And in 2023 there are still no publications within the criteria established by this research. According to the criteria, only

one literature review was found on the topic, which was excluded. Germany stands out as the country with the most publications, followed by China, with a predominance of study groups that are constantly being found and cited in the articles.

One factor that attracted attention was the diversity of keywords related to cold atmospheric plasma used among the articles, even within the same study group or within the same journal. This lack of standardization, in a way, hinders research within the area and the technology consolidation in the scientific world, as it ends up not establishing an identity in the scientific community. Therefore, it is always necessary to perform various combinations to locate articles on the subject, making it difficult to locate them.

Of these keywords, the most used in the studies, as can be seen in Table II, was "Cold Atmospheric Plasma (CAP)", however, even though there is a trend in the area for its use, the only ones that presented some relationship when the consultation was performed in Decs and Mesh were: "Cold plasma"; "Non thermal plasma"; "Non-thermal atmospheric pressure plasma". All of them presented the related term "Plasma gases".

Still on the publication characteristics, there is an interest of the scientific community in relation to publications in the area. Almost all the articles found are in journals with high impact factors.

TABLE 2: GENERAL INFORMATION ON ARTICLES AND JOURNAL

References	N° of authors	País	Journal	IF	Year	Keyword
Arndt S. et al.	11	Germany	PLOS ONE	2.74	2013	Cold atmospheric plasma (CAP)
Isbary G. et al.	14	Germany	Clinical Plasma Medicine	5.80	2013	Plasma Cold atmospheric plasma (CAP)
Garcia-Alcantara et al.	12	Mexico	Archives of Medical Research	N/C	2013	Cold plasma, Plasma treatment
Wu et al.	21	Phladelphia	Journal of surgical research	2.771	2013	FE-DBD plasma; Non thermal plasma
Arndt et al.	10	Germany	PLOS ONE	2.74	2015	Cold atmospheric plasma (CAP)
Xu et al.	8	China	Wound Repair Regeneration	2.84	2015	Cold plasma
Lee et al.	9	Republic of Korea	Journal of tissue engineering and regenerative	3.180	2016	non-thermal; microplasma

			medicine			
Akimoto et al.	9	Japan	Archives of Biochemistry and Biophysics	3.391	2016	Low-temperature plasma
Kang et al.	10	Korea	Experimental Dermatology	3.368	2016	Non-thermal atmospheric pressure plasma
Schmidt et al.	5	Germany	Experimental Dermatology	3.368	2017	Plasma medicine
Rad; Davani	2	Iran	Review of scientific instruments	1.74	2017	Dielectric Barrier Discharge (DBD); Plasma
Choi et al.	6	Korea	Scientific reports	3.998	2017	Non-thermal plasma (NTP)
Kubinova et al.	7	Prague	Scientific reports	3.998	2017	Non-thermal plasma (NTP)
Lin et al.	9	China	Plasma Medicine	5.74	2017	Atmospheric-pressure plasma jet (APPJ)
Arndt s. et al.	5	Germany	Journal of Dermatological Science	4.01	2018	Cold atmospheric plasma
Chatrai et al.	5	Iran	Scientific reports	3.998	2018	Non-thermal atmospheric plasma
Duchesne et al.	5	France	Plasma Medicine	5.74	2018	Cold atmospheric plasma; plasma-activated media
Rad; Davani; Etaati	3	Iran	Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine	1.10	2018	Helium plasma jet · Atmospheric pressure plasma
Shi et al.	9	China	Currente medical science	1.273	2018	Low Temperature plasma (LTP)
Zhang et al.	9	China	Contributions to Plasma Physics	1.226	2019	Cold atmospheric plasma
Schmidt et al.	5	Germany	Theranostics	8.579	2019	Plasma medicine
Shekhter et al.	9	Russia	European Journal of Pharmaceutical Sciences	3.616	2019	Plasma-chemical NO generation NO-containing gas flow
Cui et al.	6	Korea	International Journal of Molecular Sciences	4.210	2020	Low-temperature plasma (LTP)

Xu D. et al.	9	China	Microorganisms	N/C	2020	plasma-activated water
Hamed; Mashhadani; Jassim	3	Iraq	International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences	0.60	2020	Non-thermal atmospheric pressure plasmajet(NAPPJ), argon plasma jet,
Lou et al.	8	Taiwan	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	5.48	2020	cold atmospheric plasma jet
Moelleken et al.	6	Germany	journal of the german society of dermatology	0.79	2020	Cold atmospheric plasma (CAP)
Schmid et al.	4	Germany	IEEE transactions on radiation and plasma medical sciences	1.309	2021	Plasma medicine
			Advances in skin& Wound Care			
Landscheidt et al.	5			1.13	2022	Active wound dressing, chronic wound, cold atmospheric plasma, plasma medicine, wound healing, wound infection

+N/I – Not Included . IF - Impact factor

From the data above, Table 3 describes the methodologies used in the articles, from the guinea pig used, which focused on mice and rats; to the technique for wound formation and the type of wound, in addition to some descriptions of the device and application characteristics, following the sequence of articles of table 2. In general, the articles point to a predominance of experimental studies in laboratories with few reports of clinical applications for treating wounds, such as those applied in humans.

Due to the device's versatility for applying cold atmospheric plasma, there is still a tendency to build it by the study group, with the use of commercial devices only in articles from Germany, with technology devices manufactured in this country. In a way, this tends to variability in the form of description and choice of parameters to be used.

TABLE 3: DESCRIPTION OF PROTOCOLS AND METHODOLOGIES USED IN THE ARTICLE.

Article	Model	Wound Formation	Type of wound	of	Aplication	Equipmet	Mode	Used gas	Application phase
01	Wild mice	Punch 6mm	Acute clean	and	Direct	MicroPlaSter ßH	Pulsed	Argon	Not reported
02	Humans	Spontaneous	Chronic infect	and	Direct	MicroPlaSter alpha device	Pulsed	Argon	Not reported
03	Mice	Not reported	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Pulsed	Argon e Helium	Immediately after the wound
04	Yorkshire pigs	Electric dermatome	Acute clean	and	Direct	Not reported	Pulsed	Not reported	Immediately after the wound
05	Mice	Not reported	Acute clean	and	Not reported	Micro PlaSter ß	Pulsed	Argon	Not reported
06	Mice BALB	Punch hole	Acute clean a	and	Direct	Created by the group	Pulsed	Argon	Immediately after the wound
07	Sprague-Dawley Rats	Burn	Acute clean	and	Direct	Created by the group Microplasma jet	Pulsed	Helium	Not reported
08	Mice	Scalpel and Scissors	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Pulsed	Helium	Not reported
09	Sprague-Dawley Rats	Punch 8mm	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Continuous	Helium	Not reported
10	Mice	Punch 6mm	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Pulsed	Não relatado	24 hours after the wound
11	Mice	Punch 6mm	Acute clean	and	Direct	MicroPlaSter ß	Pulsed	Argon	Not reported

12	Mouse	Punch 6mm	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Pulsed	Argon	Immediately after the wound
13	Mouse Wistar	Punch 8mm	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Continuous	Ambient air	Immediately after the wound
14	Mouse	Punch 8mm e tesoura	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Pulsed	G3: Argon G4: Argon + Ambient air	Immediately after the wound
15	Immunocompetent mice	Microscissor	Acute clean	and	Direct	kINPen 11	Pulsed	Argon	Immediately after the wound
16	Mouse	Pressure with magnets	Chronic clean	and	Direct	Created by the group	Pulsed	Helium	48 hours after the wound
17	Mice	Biopsy Punch 6mm	Acute clean	and	Direct and indirect	Created by the group	Pulsed	Helium	Not reported
18	Mouse	Dermatological punch	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Pulsed	Helium	Not reported
19	Mice	Punch	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Pulsed	Argon	Immediately after the wound
20	Sprague-Dawley Rats	Blade 1,3 cm x 1,3 cm	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Pulsed	Helium	Not reported
21	Immunocompetent mice	Microscissor	Acute clean	and	Direct	kINPen 11	Pulsed	Argon	Immediately after the wound
22	Wistar rats	Surgical incision 8 a 10 mm	Acute clean	and	Direct	Created by the group	Continuous	G1: Ambient air G2: NO	24 hours after the wound
23	Mice	Punch 12mm	Acute clean	and	Direct	Not reported	Pulsed	Helium + ambient air	Not reported

24	Mice	Surgical scissors 2 cm	Acute infect	and	Indirect	Created by the group	Pulsed	Not reported	Immediately after the wound
25	Mice	Not reported	Acute clean	and	Direct	Not reported	Continuous	Argon	Immediately after the wound
26	Mouse	Not reported	Acute clean	and	Direct	Not reported	Pulsed	G1: Helium G2: Helium + Argon	Not reported
27	Human	Spontaneous	Chronic infect	and	Direct	SteriPlas®	Continuous	Argon	Only in chronic wounds
28	Mice	Surgical wound Chronic Wound	Acute clean	and	Direct	kINPen MED	Continuous	Argon	Immediately after the wound Not reported
29	Humans		Chronic infect	and	Indirect	Not Reported	Not reported	Not reported	

The application in most articles was direct and in acute and clean wounds. Thus, the study of chronic wounds is still incipient and deserves attention from researchers in the area. None of the articles described the pulsed or continuous mode in this way. However, for classification purposes, in this article, the pulsed mode was considered for those who reported the frequency within the parameters, and for those who did not bring this data, the continuous mode.

The application phase was not reported in many articles, and for those who reported, the application immediately after the wound predominated and directly. Only three articles reported indirect application, one of which used plasma-activated water to treat wounds that used a plasma-activated medium. About the time of application, the information in the articles was very scarce. None of the selected articles brought the angle between the pen and the skin used at the time of application. On the distance from the skin, some did not report, others brought an average distance, and only article 09 reported using a spacer to ensure exact distance from the skin.

Because the information between the articles is very diffuse and the gaps left by the detailing of information, the attempt to perform statistical analysis with the data was unsuccessful. Therefore, it was decided to maintain only the systematic review. This points out as a problem in the area because it hinders the understanding and reproducibility of research to strengthen the application of CAP.

DISCUSSION

The effect of cold atmospheric plasma (CAP) treatment in promoting faster and better-quality healing, either alone or in association with other therapies such as stem cells, has been widely discussed. However, the mechanism of action, parameters, and modes of application of CAP are not yet elucidated and consolidated^{1,5,9}.

Plasma medicine emerged from the possibility of cooling low-pressure plasma and thus making it safe for use in biological studies. There are reports that skin temperature during treatment ranged between 33 and 41°C^{5, 10, 11, 12, 13}, with variations at the time of application between 41°C in the treatment with argon and 33°C with helium gas in the first 8 to 10 seconds⁵, and an average of 37°C after 4 minutes of application and slightly above 40°C after 10 minutes¹⁰. Thus, the literature indicates that CAP does not cause any skin damage or any other side effect, with good tolerance for application in human volunteer patients¹¹⁻¹³.

However, in a study on pig skins, the authors drew attention to caution regarding power, reporting that there was burn in the case of higher power (0.31 W / cm²), in contrast to the lower power (0.15 W / cm²). Thus, the authors concluded that exposure to high power CAP for more than one minute is likely to cause damage to the wound skin. Nevertheless, only the application was made directly, without specifying the form of application or the device used¹⁴.

Of all the studies analyzed, only one stated that neither direct nor indirect treatment with CAP effectively accelerated wound closure when histologically analyzed on day 7. These authors used a time of 10 and 30 seconds in a single or repeated treatment three times with helium gas, with a device created by the group⁸. However, there is already a consensus in the literature that CAP promotes an improvement. This may be related to reactive oxygen and nitrogen species that, in correct doses, are fundamental in this process. This can be proven in studies that evaluated the expression of a key regulatory antioxidant defense protein, Nrf2; and stated that the toxicity resulting from exposure to reactive plasma-derived species is negligible. Furthermore, the authors also demonstrated qualitatively and quantitatively that there were no increased levels or increased phosphorylation of histone A2X, a marker of DNA damage and repair¹⁵⁻¹⁸.

Some report that this effect on healing is secondary to the antibacterial effect of CAP, preventing contamination, which would delay the process. However, studies have shown a higher rate of retraction and re-epithelialization of clean wounds treated with CAP^{19, 20,21}. SCHMIDT¹⁸ also quantitatively evaluated this effect on healing through five parameters: collagen pattern (distribution, fiber orientation, early and mature collagen, amount of collagen), inflammation (inflammatory infiltrate), granulation (tissue granulation, cell accumulation, cell migration), angiogenesis (blood vessel formation, vascularization), and apoptosis (blistering, shrinkage, condensation).

Another association found was in relation to the effect and duration of healing as dose-dependent. The longer the treatment time, the faster healing is, and the increase in gas velocity also increased the amount of reactive species and accelerated healing²². However, LOU²⁰, when comparing the effect of the application for 1, 3, and 5 minutes, concluded that 1 minute was the most efficient in wound closure. In agreement with this, reports in the literature state that treatment for short periods (10 – 40 seconds) promotes wound healing, while long treatment times (50 seconds) suppress healing²³. When comparing 10 and 30 seconds of treatment, the 30s group showed improvement in healing through the migration of endothelial cells and collagen production²⁴. In agreement with this, in another study that compared wounds treated for 30, 40, and 50 s, they also observed a significant difference between the 30 s group and the control group, which contributed to the conclusion in this study that the time of 30s was considered the appropriate treatment time¹². Time is still one of the most controversial parameters in plasma treatment, and more systematic studies are needed to define ideal parameters²³.

Regarding the application interval, the effect of CAP in the treatment of chronic wounds was observed in 37 human patients. Therapy resulted in a reduction in wound area of 63.0% for Group 1 (treated once a week) and 46.8% for Group 2 (treated 3 times a week). In contrast, the wound area of the placebo group increased by 17.5%. At baseline, the mean wound depth was 2.4 mm in Group 1; 2.8 mm in Group 2, and 2.6 mm in the placebo group. Throughout treatment, wound depth was reduced by 53.5% in Group 1, 16.6% in Group 2, and 34.2% in the placebo group. Another important finding reported by the volunteers in this study was that pain relief after seven and twelve weeks was statistically significant, which was not observed in the placebo group²⁵.

In addition to time, there is a controversial discussion regarding the moment that CAP effectively contributes to the healing process. There were reports of these effects well pronounced from the early stages of healing to the end²⁴, with the presence of edema in the wounds of the control groups, in contrast to those treated with only a small amount of exudate and fibrin²⁶; and significantly accelerated closure of the treated wound since day 3, with almost complete re-epithelialization (92-98%) on day 12 and without scar formation¹⁸. Agreeing with this, in another study, there was the formation of crusts already on day 3 for the treated groups while the control wounds were still inflamed¹². And another found significant improvements on days 3 and 5. After day 15, both treated and control group wounds closed equally. Still, there was an increase in the number of macrophages in those treated, fundamental to promoting cleaning of the wound while secreting important growth factors for healing. It was also possible to observe that on day 5, there was an induction of 30% of neutrophils compared to the placebo group, which was not observed on day 15 and leads to the belief that CAP induces this migration at the acute moment of the healing process¹⁵.

Still, in this perspective, there are reports that CAP has potential for wound healing in the remodeling phase¹¹; and that macroscopically the treated wounds close almost completely on day 10, in contrast to the controls that close only on day 14, with no effect in the early stages¹.

In this regard, another study²⁷ observed significant wound reduction in treated animals from day 7 onwards. It is worth mentioning that this reduction in the wound area is related to histological improvements that are directly related to a better re-epithelialization and vascularization, which involves neovascularization and regeneration of vessels; tissue oxygenation, stimulation of proinflammatory signaling, and greater production and orientation and type of collagen (I and III), with no disagreement between the authors on these aspects^{7,12,15,18,26,28,33}.

Regarding the microscopic characterization of wounds treated by CAP, there is an almost complete recovery of the epidermis, with stratum corneum, hair follicles, and sebaceous glands in those treated and a higher density of collagen and regenerated muscle tissue. In contrast, the control wounds remain with a thin epidermis, low collagen density, and damaged muscle layer. Thus, the treatment-induced repeatability increases the proliferation of keratinocytes and accelerates collagen fibers' regeneration through effects on fibroblasts^{27,30}.

Another important factor is that CAP does not activate apoptotic mechanisms in keratinocytes^{28,29}, while potentially activating the NF-kB signaling pathway in fibroblasts, modulating cell cycle progression, promoting cell proliferation, and eventually facilitating wound healing³¹.

The time of treatment of wounds seems to influence the production of collagen because when comparing wounds treated for 30s and 50s, and evaluated by immunofluorescence for vimentin (fibroblast marker, which indicates the proliferation of these) and type I collagen (indicates the ability of fibroblasts to synthesize collagen) there was a significantly higher expression in wounds for 30s. Type I collagen was significantly higher in the 30s group and significantly lower in the 50s group when compared to the control group³¹. However, disagreeing with this, a study¹¹ found no significant difference between the groups regarding the arrangement of collagen bundles. And some authors reported that in both groups, control and treated, collagen was disordered, and no difference could be found in the diameter of the bundles in the wound tissues, which indicated that CAP did not affect collagen deposition²¹.

An interesting factor that arouses a relevant discussion about the use of several devices in the practice of cold atmospheric plasma was raised in the studies. Some authors compared the effect of different devices in relation to collagen fibers and found differences in the type and deposition depending on the device used²⁶.

Some authors have reported specific factors such as proteins influencing healing; such as the presence and action of galectins, important proteins in cell adhesion, differentiation, transcription, and consequently in healing, with an accelerating role in this process; and compared the use of CAP with an electrocoagulator, being possible to find an increase of galectins-1, -2, and, -3 in wounds treated with plasma in contrast to a decrease in electrocoagulation, which indicates that treatment with CAP is more recommended in wound healing³².

It is noteworthy that most studies demonstrate results from experiments performed with acute and clean wounds. However, Isbary¹³ reported that CAP, when applied to chronic

wounds of different etiologies and with the treatment of 3 to 7 minutes, had a beneficial effect on healing these wounds, especially for chronic venous ulcers. With improvement in some aspects, either length or width, which generally did not affect the area as a whole

Still, there is a relevant discussion regarding the type of wound since most studies, because they work in the laboratory, follow the tendency of small wounds, made with a punch. Nevertheless, when comparing the healing of smaller and larger wounds, they have different behavior. The tendency of wound healing is especially pronounced in the latter, which showed better results when compared with smaller ones. However, the authors clarify the need for more investment in studies on this perspective¹⁰.

Regarding the choice of gas, there is a comparison in the literature of the action of argon and helium in the wound with a better result for the latter that demonstrated more efficiency in the healing process with the promotion of angiogenesis and repair of existing blood vessels, in addition to the activation of platelet factors for the coagulation process in the wound. This is attributed to nitric oxide production in its jet and which was not found in argon⁵. However, the mixture of argon with 0.4% oxygen addition contributed to the faster wound healing¹⁰. Likewise, some results point to a more significant improvement in healing with the mixture of helium and Argon gases compared to treatment with helium gas alone. In this case, a decrease in the infiltration of inflammatory cells around the wounds was found, and the presence of markedly increased granulation¹⁶ and epithelialization tissue after day 7²⁰.

Regarding the forms of application, direct or indirect, some reports did not find significant results for both methods⁸. Disagreeing with this, a study by indirect treatment of plasma-activated water reported significant improvement of the treated wound, in addition to which, on day 17, they were fully healed, unlike the control. Thus, the authors concluded that the healing time for those wounds treated indirectly was significantly shorter when compared to the control group. In histology, the number of inflammatory cells was also significantly lower in the treated group, causing less severe inflammatory damage to the tissue and consequently accelerating healing⁷.

FINAL CONSIDERATIONS

The cold atmospheric plasma promotes healing with qualitative and quantitative superiority in relation to the number of cells, proinflammatory signals, collagen fibers, re-epithelialization, and vascularization, which impacts the reduction of healing time compared to its control group. There are reports that time and speed directly influence these results, with reactive oxygen species and nitric oxide being key points in this process and some proteins and fibroblast signaling, keratinocytes involved.

Nonetheless, despite this consensus, the authors always point to a need for a better understanding of the mechanisms involved in these results, in addition to which there is still a lack of standardization regarding the parameters and forms of use, and the literature points to a need for better systematization and exposure of the methodology so that it is reproducible and thus can contribute to the advancement of research within plasma medicine.

In addition, there is still a need for more clinical applications, extrapolating the laboratory environment, with different types of wounds and forms of application, concerning the direct and indirect mode, so that there is better clarification on how CAP acts in different contexts. Therefore, this systematic review arouses the need for standardization and diversity of applications in order to contribute to the consolidation of this technology in the wound healing process.

REFERENCES

1. Rad ZS, Davani FA. Experimental investigation on electrical characteristics and dose measurement of dielectric barrier discharge plasma device used for therapeutic application Rev. Sci. Instrum. 2017, 88: 1-8. DOI: 10.1063/1.4979612.
2. Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, AhmedR, Pfeiffer S, Görlitz A, Emmert S. 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 of Dermatol Venereol. 2015, 29(1): 148–155. DOI: 10.1111/jdv.12490.
3. Kalghatgi SU, Fridman G, Fridman A, Friedman G, Clyne A. M. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma treatment of endothelial cells. EMBS. 2008: 3578–3581. DOI: 10.1109/IEMBS.2008.4649979.
4. Ulrich C, Kluschke F, Patzelt A, Vandersee S., Czaika V, Richter H., Lange-Asschenfeldt B. 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.
5. García-Alcantara E, López-Callejas R, Morales-Ramírez PR, Peña-Eguiluz R, Fajardo-Muñoz R, Mercado-Cabrera A et al. Accelerated Mice Skin Acute Wound Healing In Vivo by Combined Treatment of Argon and Helium Plasma Needle. Archives of Medical Research. 2013, 44(3): 169–177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.02.001>.
6. Von WTH., Metelmann HR, Weltmann, KD. Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of *in Vivo* Application of Cold Atmospheric Plasma: Clinical Plasma Medicine:

State and Perspectives of *in Vivo* Application of Cold Atmospheric Plasma. *Contrib. to Plasma Phys.* 2014, 54(2): 104–117. DOI:10.1002/CTPP.201310068.

7. Xu D, Wang S, Li B, Qi M, Feng R, Li Q, et al. Effects of Plasma-Activated Water on Skin Wound Healing in Mice. *Microorganisms*. 2020, 8(7): 1091. DOI: 10.3390/microorganisms8071091.

8. Duchesne C, Frescaline N, Lataillade JJ., Rousseau A. Comparative Study between Direct and Indirect Treatment with Cold Atmospheric Plasma on In Vitro and In Vivo Models of Wound Healing. *Plasma Medicine*. 2018, 8(4): 379–401. DOI: 10.1615/PlasmaMed.2019028659.

9. Cui HS, Joo SY, Cho YS, Park JH, Kim JB., Seo CH. Effect of Combining Low Temperature Plasma, Negative Pressure Wound Therapy, and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on an Acute Skin Wound Healing Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(10): 3675. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21103675>

10. Lin ZH, Cheng KY, Cheng YP, Tschang CYT, Chiu HY, Yeh NL, et al. Acute Rat Cutaneous Wound Healing for Small and Large Wounds Using Ar/O₂ Atmospheric-Pressure Plasma Jet Treatment. *Plasma Med.* 2017, 7(3): 227–243. DOI:10.1615/PLASMAMED.2017020386

11. Kubinova S, Zaviskova K, Uherkova L, Zablotskii V, Churpita O, Lunov O, Dejneka A. Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats. *Sci Rep.* 2017, 7(1): 45183. DOI: 10.1038/srep45183

12. Rad ZS, Davani FA, Etaati G. Determination of proper treatment time for in vivo blood coagulation and wound healing application by non-thermal helium plasma jet. *Australas Phys Eng Sci Med.* 2018, 41:905–917. DOI: 10.1007/s13246-018-0686-z.

13. Isbary G, Stolz W., Shimizu T, Monetti R., Bunk W, Schmidt HU, et al. Cold atmospheric argon plasma treatment may accelerate wound healing in chronic wounds: Results of an open retrospective randomized controlled study in vivo. *Clin Plasma Med.* 2013, 1: 25–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cpme.2013.06.001>

14. Wu AS., Kalghatgi S, Dobrynin D, Sensenig R, Cerchar E, Podolsky E, et al. Porcine intact and wounded skin responses to atmospheric nonthermal plasma. *J Surg Res.* 2013, 179(1): e1–e12. DOI: [doi:10.1016/j.jss.2012.02.039](https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.02.039).

15. 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, 8(11): e79325. DOI: 10.1371/journal.pone.0079325.

16. Lee OJ, Ju HW, Khang G, Sun PP, Rivera J, Cho JH., et al An experimental burn wound-healing study of non-thermal atmospheric pressure microplasma jet arrays: Burn wound healing and non-thermal atmospheric pressure microplasma jet arrays. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016, 10(4): 348–357. DOI: <https://doi.org/10.1002/term.2074>.
17. Schmidt A, Niesner F, Von WT, Bekeschus S. Hyperspectral Imaging of Wounds Reveals Augmented Tissue Oxygenation Following Cold Physical Plasma Treatment *in Vivo*. *IEEE trans. radiat. plasma med. sci.* 2021, 5(3): 412–419. DOI: 10.1109/TRPMS.2020.3009913.
18. Schmidt A, Von WT, Vollmar B, Hasse S, Bekeschus S. Nrf2 signaling and inflammation are key events in physical plasma-spurred wound healing. *Theranostics.* 2019, 9(4): 1066–1084. DOI: 10.7150/thno.29754.
19. Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Vollmar B, VON WT. A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. *Exp Dermatol.* 2017, 26(2): 156–162. DOI: 10.1111/exd.13156.
20. Lou BS, Hsieh JH, Chen CM, Hou CW, Wu HY, et al. Helium/Argon-Generated Cold Atmospheric Plasma Facilitates Cutaneous Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020, 8: 683. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00683.
21. Zhang JP, Guo L, Chen QL, Zhang KY, Wang T, et al. Effects and mechanisms of cold atmospheric plasma on skin wound healing of rats. *Contrib Plasma Phys.* 2019, 59(1): 92–101. DOI: <https://doi.org/10.1002/ctpp.201800025>
22. Hamed MS, Al- Mashhadani AH, Jassim AS. Treatment of rat wounds using plasma-jet parameters (Exposure time and gas flow rate). *J Res Pharm Sci.* 2020, 11(2): 198-2204. DOI: 10.26452/ijrps.v11i2.2170
23. Xu G, Shi X, Cai J, Chen S, Li P, Yao C, et al. Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice. *Wound Repair Reg.* 2015, 23(6): 878–884. DOI: 10.1111/wrr.12364
24. Kang, SU, Choi, JW, Chang JW, Kim K, Kim YS, Park JK. N₂ non-thermal atmospheric pressure plasma promotes wound healing in vitro and in vivo: Potential modulation of adhesion molecules and matrix metalloproteinase-9. *Exp. Dermatol.* 2016, 26(2): 163–170. DOI: 10.1111/exd.13229
25. Moelleken M, Jockenhöfer F, Wiegand C, Buer J, Benson S, Dissemond J. Pilot study on the influence of cold atmospheric plasma on bacterial contamination and healing tendency of chronic wounds. *JDDG.* 2020, 18(10): 1094–1101. DOI: 10.1111/ddg.14294

26. Shekhter AB, Pekshev AV, Vagapov AB, Telpukhov VI, Panyushkin PV, Rudenko TG, et al. Physicochemical parameters of NO-containing gas flow affect wound healing therapy. An experimental study. *Eur J Pharm Sci.* 2019, 128: 193–20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.034>
27. 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, 8(1): 5621. DOI:10.1038/s41598-018-24049-z.
28. Arndt S, Unger P, Berneburg M, Bosserhoff AK, Karrer S Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode. *J of Dermatol Sci.* 2018, 89(2): 181–190.
29. 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, 10(3): e0120041. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.11.008
30. Choi JH, Song YS, Song K, Lee HJ., Hong JW, Kim GC. Skin renewal activity of non-thermal plasma through the activation of β -catenin in keratinocytes. *Sci Rep.* 2017, 7(1): 6146. DOI:10.1038/s41598-017-06661-7
31. Shi X, Xu G, Zhang G, Liu J, Wu Y, G Ling-ge, et al. Low-temperature Plasma Promotes Fibroblast Proliferation in Wound Healing by ROS-activated NF- κ B Signaling Pathway. *Curr Med Sci.* 2018, 38(1): 107–114. DOI: 10.1007/s11596-018-1853-x.
32. Akimoto Y, Ikehara S, Yamaguchi T, Kim J, Kawakami H, Shimizu N, et al. Galectin expression in healing wounded skin treated with low-temperature plasma: Comparison with treatment by electronical coagulation. *Arch Biochem Biophys.* 2016, 605:86–94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.01.012>
33. Landscheidt K, Engelhardt C, Hernekamp JF, Goertz O. Use of Cold Plasma in Wound Healing: A Case Report. *ADV SKIN WOUND CARE* 2022;35:1–3. DOI: 10.1097/01.ASW.0000891084.22486.a7

EFEITO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

EFFECT OF COLD ATMOSPHERIC PLASMA ON THE WOUND HEALING PROCESS

Situação do artigo:

Submetido em: 06/12/2023

Revista: Pesquisa veterinária Brasileira

RESUMO

O plasma atmosférico a frio (CAP) tem despontado como tratamento para cicatrização de feridas. Tem-se como objetivo: comparar os efeitos do CAP obtido em barreira dielétrica (DBD) aplicado de modo contínuo e pulsado no processo de cicatrização de feridas agudas limpas em porquinhos da índia. Trata-se de estudo do tipo experimental com 24 porquinhos da índia. Foram realizadas três incisões na pele do dorso sendo uma para controle, outra tratada com CAP de modo contínuo (1200 mW de potência) e a terceira de modo pulsado (1200mW e 10 Hz de frequência) com fluxo de 2L/min de gás hélio durante 1 minuto. As radiações foram feitas após a cirurgia e a cada 24 horas por três dias consecutivos. Foram feitas análises macroscópicas e histológica como o índice de retração da ferida, avaliação do processo de cicatrização, proliferação de colágeno e imuno-histoquímica. A taxa de retração das feridas dos grupos tratados foi significativamente maior quando comparado ao controle nos dias 3 e 7. Histologicamente houve uma melhor cicatrização nos grupos tratados nos dias 7 e 14. Dentre os tratamentos, verificou-se diferenças de organização tecidual com o grupo contínuo apresentando uma epiderme e derme reticular mais bem organizadas. Com relação ao colágeno, houve uma maior quantidade das fibras tipo III quando comparado os dias 7 e 14 para o controle ($p=0,036$) e o CAP de modo contínuo ($p=0,008$). O CAP estimulou ainda a produção da IL-10 que é fundamental no processo de regeneração tecidual. Conclui-

se que as feridas tratadas com CAP apresentaram melhor estruturação histológica, organização, distribuição e diferenciação do colágeno, além de indução da fase inflamatória por meio da expressão da IL-10.

Palavras-chave: Cicatrização. Feridas. Pele. Plasma Não térmico.

1. Introdução

As feridas se configuram como um problema de saúde pública e que podem comprometer o indivíduo em qualquer fase da vida (Cruz et al., 2023). Biologicamente, seu processo de cura é dividido em fases bem estabelecidas, porém enquanto está sendo instaurado há um impacto negativo na qualidade de vida do indivíduo, e pela complexidade dos eventos celulares e bioquímicos envolvidos; além da influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos; algumas complicações são comuns devido às doenças e/ou distúrbios metabólicos que interferem diretamente na resposta natural do organismo e consequentemente podem levar a cronicidade desta ferida (Colares et al., 2019).

Deste modo, estratégias para melhorar e acelerar esse processo de cicatrização vem sendo estudadas ao longo dos anos, como forma de diminuir o impacto negativo e anular as possíveis complicações que possam surgir. Dentre estas possibilidades, surge o plasma atmosférico a frio (CAP) obtido em barreira dielétrica (DBD) que se caracteriza como sendo uma tecnologia com alta aplicabilidade médica devido sua capacidade de atuar diretamente no processo de cicatrização de feridas por meio de vários componentes ativos que se relacionam de maneira sinérgica. Estes abrangem desde corrente elétrica, radiação UV, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de partículas carregadas (Stratmann et al., 2020).

Devido a esses efeitos e interação dos componentes ao redor do jato do plasma, essa tecnologia tem sido amplamente difundida na última década para o tratamento de cicatrização de feridas. Vale salientar que sua aplicação é fácil, segura, indolor e tolerável pelos tecidos (Bernhardt et al., 2019). Desse modo, a literatura já apontou ser bem aceita pelos pacientes (Lou et al., 2020; Stratmann et al., 2020; Bolgeo et al., 2023).

Diante disto, seu uso vem despertando o interesse das ciências médicas com foco na recuperação geral da saúde, e por agir diretamente nos mecanismos de cicatrização, desde seus efeitos antimicrobiano, regulação de metabolismo, comunicação entre os meios celulares, sinalização para fatores de crescimento, estímulo para coagulação sanguínea, angiogênese, respostas imunes e inflamatórias, produção de colágeno, adesão celular, diminuição do pH, dentre outros efeitos (Boeckmann et al., 2020).

No entanto, devido a grande diversidade de aparelhos disponíveis para sua aplicação, ainda há uma dificuldade em padronizar parâmetros precisos, seguros e com efeitos definidos. Sendo assim, mesmo após décadas de estudos e o entendimento dos seus efeitos a nível biológico, ainda há a necessidade de buscar esta padronização para uma aplicação mais universal e eficaz, bem como delimitar os seus efeitos com foco no objetivo clínico e melhora do quadro (Izadjoo et al., 2018).

Para isto, este estudo utilizou como cobaia o porquinho da índia. Essa escolha se deu devido à similaridade entre a pele destes animais com a pele humana; fato relacionado a incapacidade de sintetização do ácido ascórbico, que desempenha um papel relevante na síntese de colágeno, fundamental no processo de cicatrização (Hoboken and John, 2020).

Diante do exposto, o presente artigo teve como objetivo comparar os efeitos do CAP obtido em DBD aplicado de modo contínuo e pulsado no processo de cicatrização de feridas agudas limpas em porquinhos da índia.

2. Materiais e métodos

Esse trabalho se caracterizou como sendo do tipo experimental, de caráter longitudinal, prospectivo e controlado tendo como amostra 24 porquinhos da índia, saudáveis, 3 meses de idade e pesando 500 a 650g. Esses animais foram provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal do Semiárido (UFERSA), onde também foram mantidos em Gaiola individuais de 80x60x40 cm durante experimentos, com água e ração de coelho *ad libitum*. Para início dos experimentos foi obtida a aprovação junto a Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UFERSA segundo parecer 33/2020.

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=6) para cada dia de avaliação 3, 7, 14 e 21 dias. Inicialmente, foram submetidos à avaliação clínica e coleta de amostras de sangue para hemograma, com o objetivo de atestar o grau de sanidade que o qualifica a ser submetido a um procedimento anestésico. Antes da realização das feridas, os animais foram pesados e pré-medicados com tramadol (3 mg.kg⁻¹) por via subcutânea (SC), e lidocaína (2mg/kg) na região da ferida para garantir analgesia (Macedo et al., 2015). Após 15 minutos, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina na dose respectiva de 30 mg. kg⁻¹ e 2,5 mg. kg⁻¹ de peso corporal do animal (Dang et al., 2008; Schmitz et al., 2016).

Foram realizadas três incisões circulares na pele do dorso, após tricotomia e subsequente antissepsia com álcool iodado a 2%. A incisão foi feita com um *punch* de 4mm de diâmetro. Após o procedimento cirúrgico os animais receberam

carprofeno (4mg. kg⁻¹) por via SC a cada 24 horas durante 3 dias. Após a incisão, os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com os dias da análise 3, 7, 14 e 21, sendo que todas as feridas foram fotografadas a partir do dia 0 (dia da cirurgia). Cada animal fez parte do grupo experimento e controle concomitantemente. Sendo assim, a primeira ferida foi denominada como controle, ou seja, não recebeu nenhum tratamento, apenas assepsia e limpeza diárias com solução salina 0,9% estéril; a segunda ferida recebeu tratamento com o plasma atmosférico a frio de modo contínuo a uma potência de 1200 mW e a terceira ferida recebeu tratamento com o plasma atmosférico a frio de modo pulsado na mesma potência, porém com uma frequência de 10 Hz.

Ainda com relação aos parâmetros do CAP foi realizado um jateamento de gás hélio em um fluxo de 2L/ min, durante um minuto e uma distância de 3mm entre a ponta do DBD e a superfície a ser tratada. As radiações foram feitas imediatamente após a cirurgia e a cada 24 horas por três dias consecutivos (Hussni et al., 2010; Metelmann et al., 2013).

Para avaliação macroscópica da ferida foi realizada a análise das imagens obtidas por meio das fotografias transferidas para um software Image J (v 1.45) para mensuração da área da ferida. Em seguida foi obtido o coeficiente de retração por meio da fórmula: $Retração (\%) = \frac{Área\ inicial - Área\ no\ dia\ x}{Área\ inicial} \times 100$ (Zang et al., 2015).

Com base nisto, foram realizadas as comparações entre as lesões estudadas.

Com relação a avaliação histológica foi realizada a partir de amostras das feridas obtidas nos dias 3, 7, 14 e 21, conforme explicação anterior. No momento da coleta os animais foram submetidos novamente ao protocolo anestésico com xilazina e cetamina e em seguida foram eutanasiados com cloreto de potássio 19,1%, ampola de 10 ml, levando em consideração o peso do animal.

Imediatamente após este procedimento, cada ferida foi removida em fragmento por um Punch de 8mm e fixada em paraformaldeído a 4% por 24h para posterior processamento histológico.

Após processamento, parte das secções foram coradas com hematoxilina e eosina para análise do tecido das feridas, processo de repitelização e organização tecidual. Para avaliação do colágeno, foram coradas com picrossírus red e analisadas segundo orientação e distribuição de acordo com o padrão de biorrefrigeração por meio do software Image J (Ram et al., 2016).

Os cortes histológicos foram observados em microscópio óptico sob luz polarizada. Esse método permitiu observar a diferenciação dos colágenos tipo I (birrefringência laranja-amarelada a laranja e vermelha) e tipo III (birrefringência verde ou verde-amarelada). Para a captura das imagens, foi utilizada uma câmera de alta resolução (AxioCam MRc, Zeiss), acoplada ao microscópio Axio Scope.A1 Zeiss e a um computador com o sistema operacional Microsoft Windows, contendo o programa AxioVision 4.2 (Zeiss). De cada lâmina, foram selecionados e fotomicrografados todos os campos da derme em aumento de 100x. As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do software Image J, com o plugin Threshold Colour, obtendo-se a porcentagem de colágeno, por meio da análise de partículas automatizadas pela seleção e medida das áreas com base na cor. O método utilizado neste trabalho para a quantificação da área de colágeno, por meio do Threshold Colour, deu-se nos seguintes valores: matiz 0-40 para a cor vermelha (colágeno tipo I) e 45-120 para a cor verde (colágeno tipo III), saturação 0-255 e brilho 5-225 para ambos os tipos de colágeno. Após a análise de todos os campos, realizou-se a média deles, obtendo-se a média de cada amostra dentro dos grupos (Lima et al., 2020)

Para análise da imuno-histoquímica para interleucina-10, foi feita a preparação e processamento dos cortes histológicos em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por meio da imersão das lâminas em solução de citrato de sódio (pH 6,0) aquecidas em três sessões de 5 minutos em micro-ondas convencional em potência máxima (750W), evitando a fervura do material imerso. Após o resfriamento das amostras, o material foi lavado em solução tampão de tris (hidroximetil) aminometano (TBS) pH 7,6 a qual foi acrescida de 3 gotas de Triton-X- 100 duas vezes e sob agitação, por 5 minutos cada lavagem.

Em seguida, foi realizado o bloqueio das reações inespecíficas com 300 µL de solução de bloqueio (UltraCruz© Blocking reagente – SC 516214), diluído em 2,7 ml de TBS, gotejando sobre os cortes presentes na lâmina até cobri-los. As lâminas contendo os cortes foram armazenadas em câmara úmida por 120 minutos em temperatura ambiente. Seguindo-se com uma lavagem em solução TBS+triton X sob agitação, em duas séries de 5 minutos e secas com papel toalha.

Para a marcação com anticorpos, foi instilado, em cada secção, 50µL da solução do anticorpo Anticorpo contra interleucina-10 de cabra (I0115, santacruz Biotechnology diluído em TBS na proporção de 1:250. Logo em seguida, as lâminas permaneceram incubadas em câmara úmida por 12 horas sob refrigeração (*overnight*). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS e imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% por 15 minutos e em ambiente escuro, para o bloqueio da peroxidase endógena.

Posteriormente, todos os cortes foram incubados com solução contendo o anticorpo secundário universal do kit VECTASTAIN® Universal Quick HRP Peroxidase, R.T.U. (PK-7800) na concentração de 1:500 (Vector, 2023), em câmara úmida por 60 minutos em temperatura ambiente e, novamente, lavadas em TBS. Em

ambiente escuro, foi instilada uma gota do agente cromógeno diaminobenzidina (DAB) em cada secção, sendo imersas em água destilada após 60 segundos. As lâminas foram contra coradas em hematoxilina de Harris por 5 segundos e mergulhadas em álcool absoluto e xilol e, conseguinte, montadas com Permount® (Fisher Chemical). As reações positivas foram reconhecidas pela coloração vermelho amarronzadas, enquanto as negativas, coloração branca azulado.

O controle negativo envolveu a omissão da incubação com o anticorpo primário do procedimento. Não foram visualizadas imunorreatividades nas preparações controle. As lâminas foram selecionadas e suas secções foram fotomicrografadas com a utilização de microscópio de luz convencional com câmera acoplada (LEICA DM500) para captura de imagens da reação, obtendo-se imagens do complexo gônada-mesonefro tanto das sessões positivas quanto das negativas, através do programa Leica LAS EZ.

Os dados foram avaliados através dos programas estatísticos SPSS 21.0 (Statistical Package for the Social Sciences) e expressos em valores de média e desvio padrão. Para análise da taxa de retração da ferida, após averiguação dos pressupostos paramétricos, diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, nas diferentes variáveis estudadas, foram obtidas por Análise de variância (one-Way ANOVA) seguido por Tukey considerando como efeitos o Grupo (G1 – experimento e Go- Controle). Com relação ao colágeno diferenças entre grupos dentro e entre tempos experimentais (7d e 14d) foram obtidas também por ANOVA, seguida por Tukey e teste t independente respectivamente. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

3. Resultados

As feridas foram analisadas entre os dias 3, 7, 14 e 21. De maneira geral, não foram observadas diferenças com relação a presença de exsudato e demais sinais inflamatórios quando comparadas entre os grupos. Portanto, verificou-se que todas as feridas já estavam cicatrizadas aos 21 dias (Figura 1).

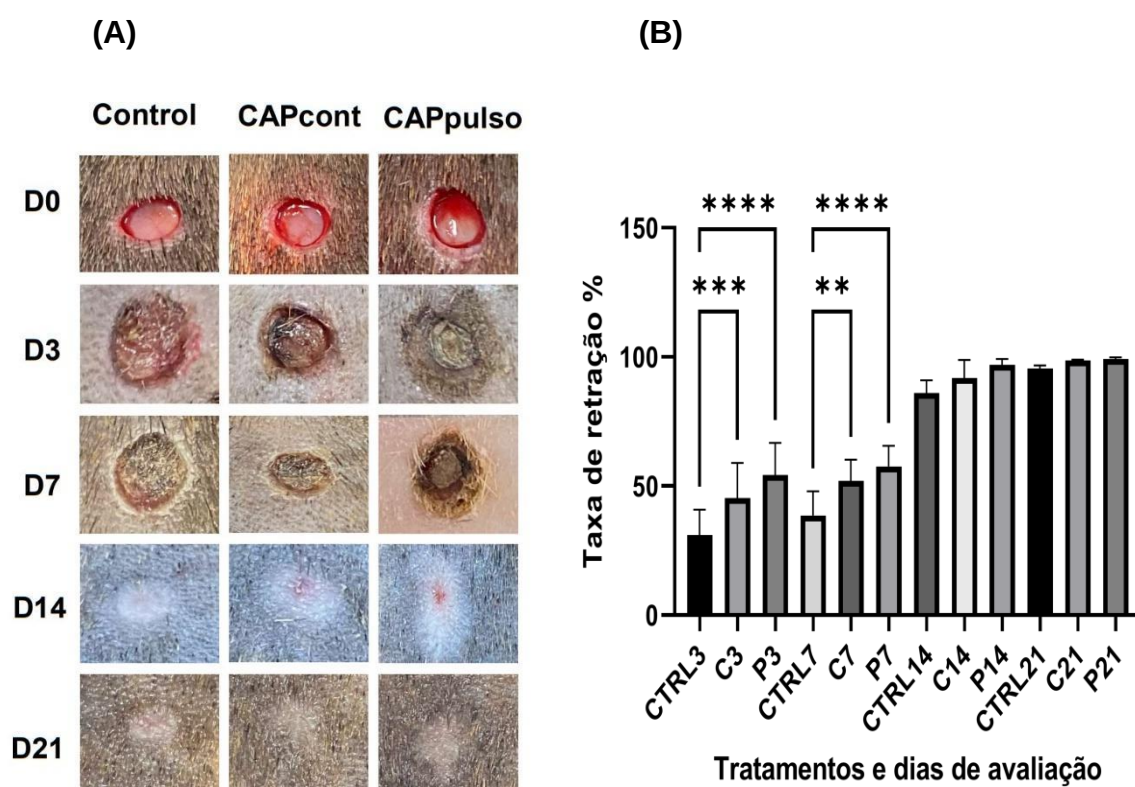


Fig. 1. Evolução da cicatrização das feridas cutâneas em porquinhos da índia. A- Visão macroscópica das feridas após tratamento com CAP. Cronologia do dia 0 (D0) até o dia 21 (D21). B - Taxa de retração da ferida em função do tempo e tratamentos. Control – controle; CAPcont – Plasma Atmosférico a frio no modo contínuo; CAP pulso – Plasma atmosférico a frio no modo pulsado. CTRL- controle, C- modo contínuo e P – modo pulsado. *Indica diferença estatística em ANOVA seguido de teste de Tukey. ** p< 0,01, *** p<0,001 e p<0,0001.

Quando avaliadas de acordo com a área, foi possível observar que a taxa de retração das feridas dos grupos tratados foi significativamente maior quando comparado ao controle nos dias 3 e 7, porém não houve diferença estatística entre os modos de aplicação, conforme se observa na figura 1B, nem nos demais dias.

Apesar disto, histologicamente, foi possível observar de maneira qualitativa uma melhor cicatrização das feridas quando comparados ambos os grupos tratamento com o controle, principalmente nos dias 7 e 14, conforme pode ser visualizado na figura 2. Observa-se, portanto, uma epiderme mais espessa e organizada ao longo dos dias analisados, além de uma diminuição do tecido de granulação nos grupos tratados, quando comparado ao controle; e melhor organização da derme reticular.

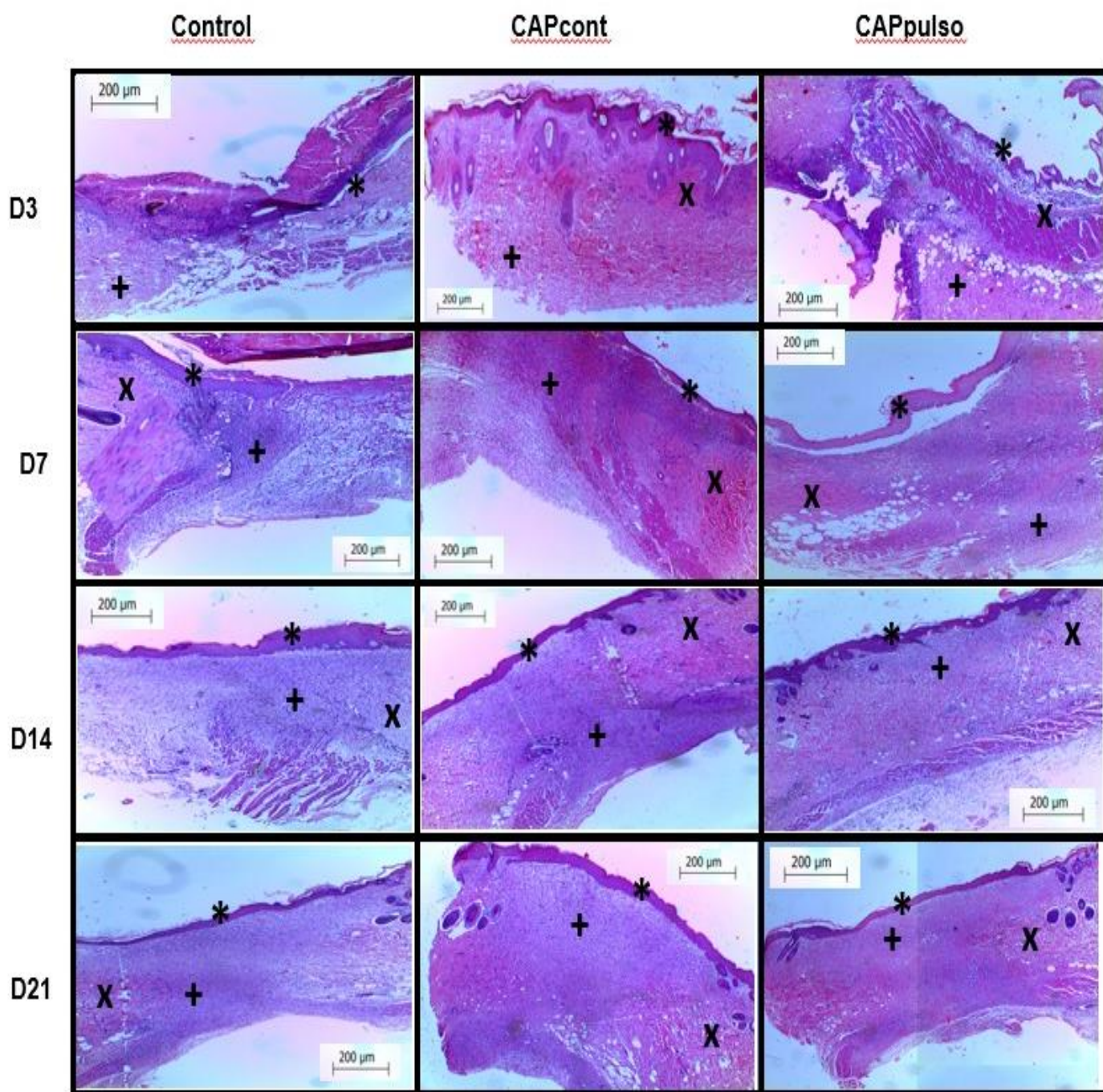


Fig. 2. Fotomicrografia das feridas cutâneas de porquinhos da índia tratados com plasma atmosférico a frio (CAP). Observa-se uma epiderme mais espessa e organizada ao longo dos dias analisados, além de uma diminuição do tecido de granulação nos grupos tratados, quando comparado ao controle; e melhor organização da derme reticular.. Coloração hematoxilina e eosina. * Epiderme; + tecido de granulação; X - Derme reticular . Control – controle; CAPcont – Plasma Atmosférico a frio no modo contínuo; CAP pulso – Plasma atmosférico a frio no modo pulsado.

Dentre os tratamentos, nota-se diferenças de organização tecidual levando em consideração que o grupo contínuo apresenta uma epiderme mais bem organizada ao longo dos dias, bem como a derme reticular (Figura 2). Com relação ao tecido de granulação, nota-se que as feridas tratadas com CAP no modo pulsado apresentam uma maior quantidade e distribuição deste tecido ao longo dos dias, quando comparado ao modo contínuo (Figura 2).

Diante destes resultados, os cortes do dia 7 e 14 foram analisados com relação a quantificação e diferenciação de colágeno, bem como na imunohistoquímica contra uma citocina inflamatória a interleucina-10 (IL-10). No que se refere ao colágeno na figura 3 é possível observar um comparativo dos dias mencionados entre os grupos controle e tratados.

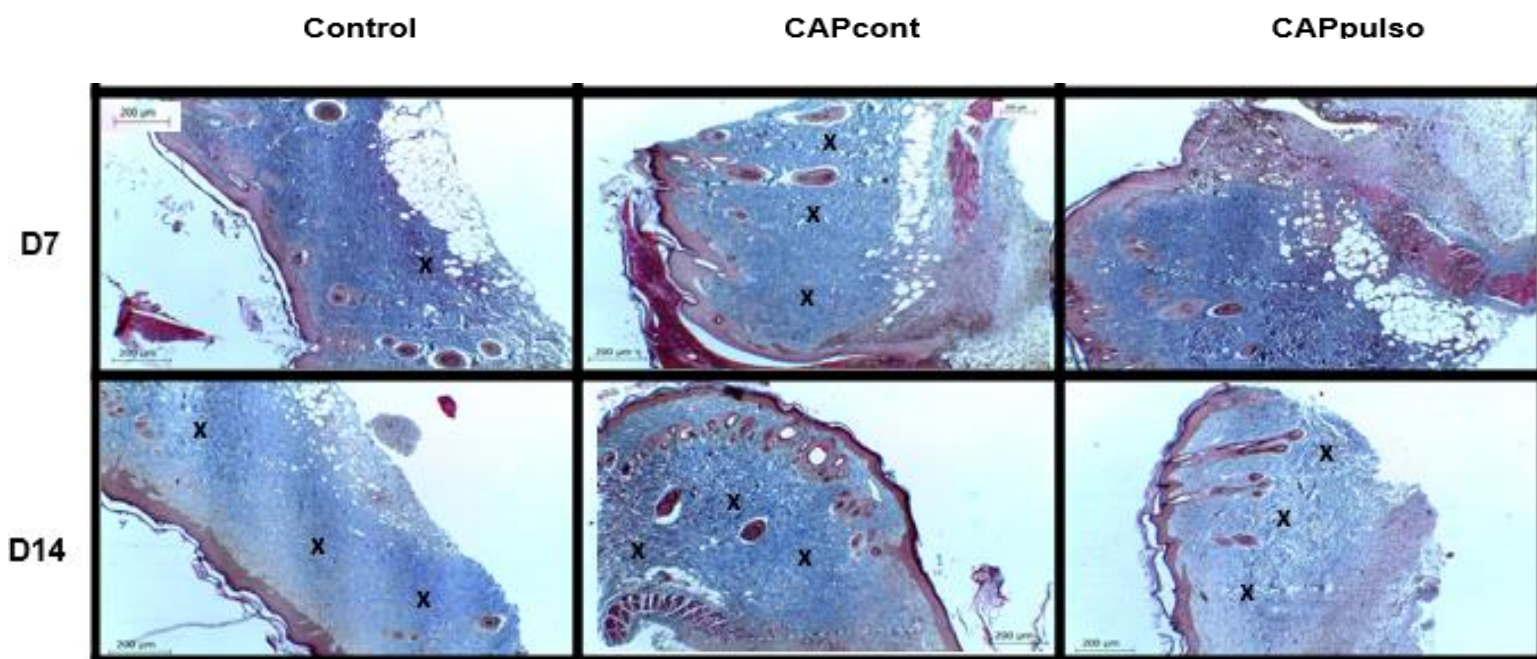


Fig. 3. Fotomicrografias das feridas cutâneas em porquinhos da índia tratada com plasma atmosférico a frio. As marcações indicam a região com maior concentração de fibras colágenas. Control – controle; CAPcont – Plasma Atmosférico a frio no modo contínuo; CAP pulso – Plasma atmosférico a frio no modo pulsado. Coloração *tricômio de masson*

Qualitativamente, nota-se que a síntese do colágeno se deu em todos os grupos, no entanto houve uma maior regeneração da derme reticular nas feridas tratadas com CAP pulsado, nas demais observa-se ainda uma boa quantidade de tecido de granulação, corado mais fracamente, pois se encontra ainda frouxamente organizado, ou seja, o tecido não possui ainda uma boa trama de fibras colágenas grossas.

Partindo desta informação, para diferenciação do tipo de fibras de colágeno, foi feita a análise em microscopia de luz polarizada. Na figura 4, pode-se perceber que há um aumento do colágeno tipo III em todos os grupos. No dia 7, para o grupo contínuo, a partir da análise da imagem, nota-se uma maior diferenciação para o colágeno do tipo I em relação aos demais grupos, porém no dia 14 já há uma maior predominância do colágeno tipo III neste grupo (Figura 4).



Fig. 4. Fotomicrografias das feridas cutâneas em porquinhos da índia tratada com plasma atmosférico a frio obtidas em microscópio de luz polarizada. .A cor vermelho/alaranjado representa o colágeno tipo I. A cor verde/amarelado representa o colágeno tipo III. Control – controle; CAPcont – Plasma Atmosférico a frio no modo contínuo; CAP pulso – Plasma atmosférico a frio no modo pulsado.

A partir da análise quantitativa dos tipos de fibra por meio do software Image J foi realizada a análise estatística. Na tabela 1 observa-se que houve uma diferença estatística na quantidade de colágeno tipo III, quando comparado os dias 7 e 14 para o controle ($p=0,036$), bem como para aquele grupo que recebeu o CAP de modo contínuo ($p=0,008$). No entanto, apesar de ambos terem sido representativos, nota-se, a partir da observação das médias, um maior aumento para aquele grupo tratado pelo CAP contínuo. Vale ainda ressaltar que apenas no grupo controle houve um aumento do colágeno tipo I.

Tabela 1Valores de média $\pm$ desvio padrão relacionados ao tipo de colágeno nos diferentes grupos

Variáveis	Grupos	07	14	p-valor
Colágeno TIPO I	Controle	24,65 $\pm$ 8,55	25,54 $\pm$ 14,45	0,879
	Contínuo	40,48 $\pm$ 12,95	30,70 $\pm$ 8,08	0,382
	Pulso	19,73 $\pm$ 1,75	8,85 $\pm$ 2,71	0,013*
Colágeno TIPO III	Controle	15,24 $\pm$ 4,10	23,84 $\pm$ 0,73	0,036*
	Contínuo	6,08 $\pm$ 4,05	30,18 $\pm$ 3,79	0,008*
	Pulso	19,77 $\pm$ 9,00	29,51 $\pm$ 9,34	0,241

* . ANOVA, seguida por Tukey e teste t independente entre grupos dentro e entre tempos experimentais (7d e 14d), respectivamente

Desta forma, esses resultados indicam que o plasma foi capaz de alterar a produção de colágeno e houve diferença entre os grupos tratados quanto ao tipo de colágeno, bem como em relação à síntese ou diminuição. Já no caso do modo pulsado essa diferença se deu para o colágeno tipo I. Este modo de tratamento induziu uma diminuição deste tipo de colágeno de maneira significativa ($p= 0,013$), enquanto para o tipo III houve um aumento, ao observar as médias, apesar de não ter sido significativo. Isto aponta para o potencial do CAP na melhora da qualidade da cicatrização, observada de maneira significativa nos cortes histológicos.

Outro aspecto avaliado foi a resposta inflamatória destes tecidos à aplicação do plasma. Observando a figura 5, de maneira qualitativa, nota-se que para o tratamento, tanto contínuo como pulsado, houve uma maior resposta inflamatória evidenciada pela imunomarcagem para interleucina 10 (IL-10).

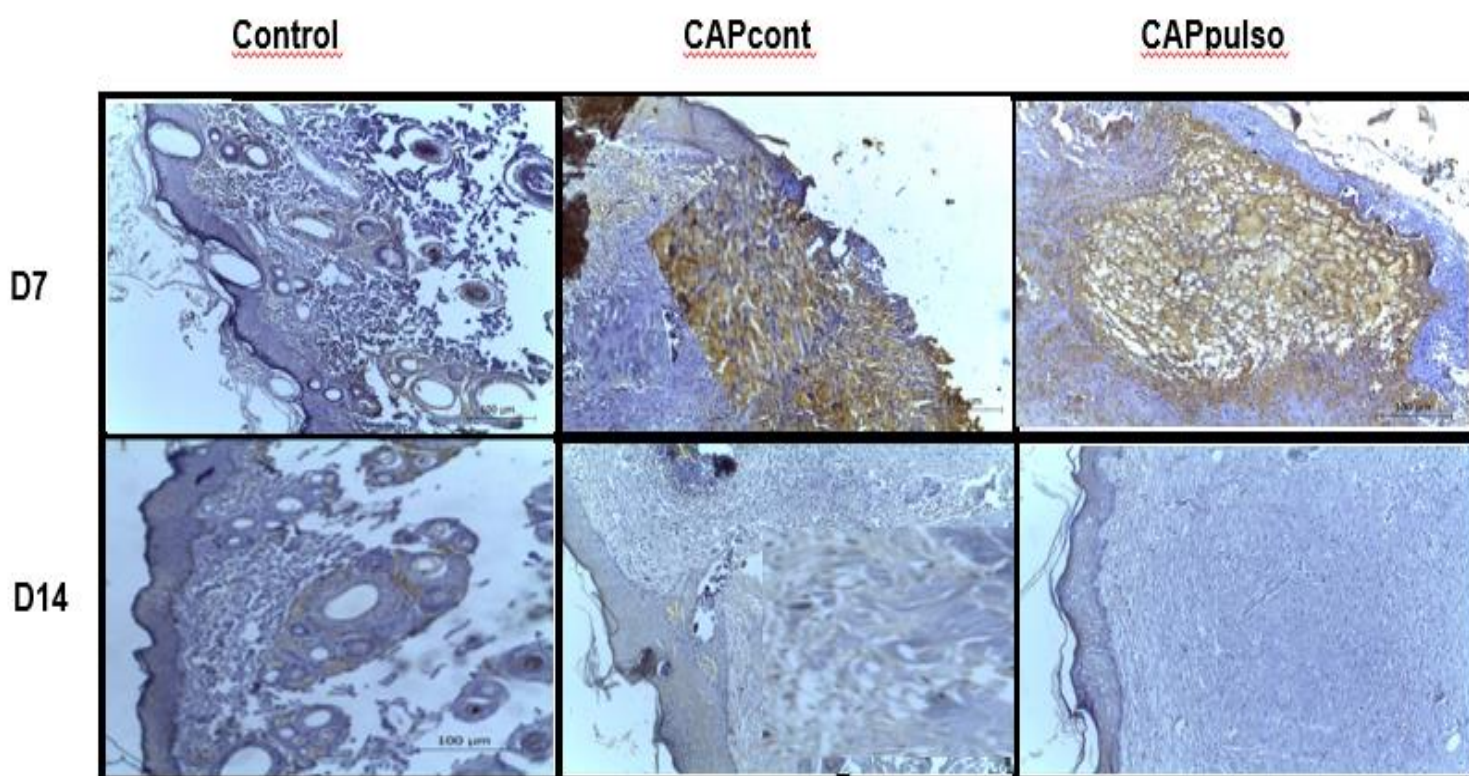


Fig. 6. Imunomarcacão de interleucina 10 (IL-10) em feridas cutâneas em porquinhos da Índia tratada com plasma atmosférico a frio. Control – controle; CAPcont – Plasma Atmosférico a frio no modo contínuo; CAP pulso – Plasma atmosférico a frio no modo pulsado.

A partir das análises da imagem infere-se que no dia 7, o plasma estimulou um processo inflamatório significativo, que é essencial para reconstituição do tecido lesado. Já no dia 14, nota-se que esse processo foi controlado, afirmando que este tratamento é benéfico na fase inflamatória inicial e controle para as demais etapas da cicatrização de feridas.

4. Discussões

Quando se refere ao tratamento de feridas agudas ou crônicas o objetivo principal é seu fechamento e completa cicatrização; além de evitar recidivas e complicações durante o processo. No entanto, nem sempre isto é possível e por esse motivo têm-se buscado tecnologias inovadoras, de fácil acesso e manejo no sentido de contornar essa problemática (Boeckmann et al., 2020).

Neste sentido, este estudo aponta para aplicação de uma tecnologia versátil e que apresenta possibilidades de melhorias no processo de cicatrização tecidual. Isto ficou evidenciado no aumento da taxa de retração da ferida, na maior organização da epiderme e derme durante a cicatrização, além de um aumento na expressão de IL-10 e da síntese de colágeno durante a cicatrização.

No presente trabalho foi possível observar um efeito pró-inflamatória do CAP no tratamento de feridas cutâneas em porquinhos da índia. A decisão da aplicação nos três primeiros dias baseou-se em achados da literatura que apontam para uma ação anti inflamatória, com diminuição dos parâmetros da inflamação (Tipa and Kroesen, 2011; Nastuta et al., 2011; Metelmann et al., 2013; Kubinova et al., 2017). Porém, discordando destes achados, foi possível encontrar uma maior expressão para a IL-10 que possui um importante papel na regulação da remodelação tecidual.

Isto pode estar relacionado a um quantitativo maior de infiltrados no momento da inflamação, encontrado em alguns estudos quando comparado ao grupo controle; além da capacidade de ativação da expressão de interleucinas; e fatores de crescimento como TGF- β 1 e TGF β 2, envolvidos no processo de cura local, de integrinas, que promove a adesão celular e a estimulação da angiogênese (Lendeckel et al., 2015; Izadjoo et al., 2018). No entanto, é consenso na literatura que a aplicação direta do plasma promove aumento das espécies reativas dentro do tecido vivo, além de proporcionar uma melhor repitelização por meio do aumento das respostas de fibrócitos e queratinócitos (Nastuta et al., 2011; Kubinova et al., 2017), o que corrobora com os achados deste estudo.

Assim, o plasma contribui positivamente no processo de cicatrização (Tipa and Kroesen, 2011), além de ser seguro e não apresentar efeitos colaterais (Rajasekaran et al., 2011). Isto pode ser comprovado quando observada a taxa de

retração para os dias iniciais (3 e 7) entre o grupo tratado e não tratado dentro dos parâmetros pré-estabelecidos onde foi possível encontrar uma diferença estatística entre os grupos, apontando para uma possível relação no que se refere a aplicação nos primeiros dias o que acabou por gerar uma intensificação da ação do CAP. Estes achados podem estar relacionados à proliferação, migração e adesão celular para a área da ferida; apontando que o plasma melhora o processo de cicatrização por meio do aumento de espécies reativas de oxigênio, além de promover o reparo histológico precoce (Hung et al., 2016).

A nível de tecido, quando se fala de cicatrização de feridas, aponta-se, dentre muitos parâmetros para a produção do colágeno, principal componente da matriz extracelular e indispensável neste processo de cicatrização. A pele saudável possui aproximadamente 80% de colágeno tipo I, considerado um colágeno mais maduro e 20 % de colágeno III, considerado um colágeno mais inicial. Assim, a resistência tênsil da ferida está diretamente relacionada a essa deposição e é essencial para que haja neoformação tecidual (Campos et al., 2007).

Nesta perspectiva, foi possível observar que o CAP no modo contínuo foi capaz de estimular a proliferação do colágeno tipo III de maneira significativa nos dias 7 e 14. Além do que o modo pulsado diminui significativamente o colágeno tipo I. Concordando com isto, um estudo (Boeckmann et al., 2020) apresentou uma disposição de fibras de colágeno irregulares, além de uma menor expressão do colágeno tipo I. Isto apresenta-se de maneira promissora, pois o colágeno tipo III que deve ser mais abundante durante a proliferação, quando substituído pelo tipo I, faz com que haja aumento da resistência à tração da ferida (Hall et al., 2018) com consequente formação de cicatrizes. Porém, discordando disso, um estudo apontou que (Kubnova et al., 2017) apesar de ter ocorrido aumento no número de colágeno

do grupo tratado, não foi significativo. Além do que a quantidade de colágeno diminuiu no grupo tratado com o plasma, aumentando somente no dia 7.

Além do colágeno, outros achados histológicos merecem atenção. Estudos apontam que a aplicação do CAP aumenta as respostas de fibrócitos e queratinócitos e melhora a repitelização. Tanto o tratamento direto, como aquele feito com aplicação dos curativos tratados com plasma apresentaram efeitos benéficos nas feridas dos ratos com aceleração da repitelização da epiderme (Nastuta et al., 2011). Além disso, pode-se afirmar que a longo prazo o tratamento com plasma demonstrou uma estética superior e prevenção de doenças pós-traumáticas (Metelmann et al., 2013).

Este estudo apresenta-se como pioneiro na comparação da modulação do plasma, dentro dos modos pulsado e contínuo e apresenta uma diferenciação entre os tratamentos no que diz respeito à resposta do tecido no processo cicatricial. Algumas diferenças macroscópicas, puderam ser observadas durante o fechamento das feridas, além das microscópicas onde o modo pulsado apresentou a possibilidade de inibição da produção de colágeno tipo I e maior marcação da IL-10, enquanto o modo contínuo apresentou maior síntese de colágeno tipo III.

5. Conclusões

Este estudo aponta que o CAP foi capaz de promover uma melhora na qualidade da cicatrização das feridas tratadas, pois esta terapia se mostrou superior ao grupo controle com melhor estruturação histológica, organização, distribuição e diferenciação do colágeno, além de indução da fase inflamatória por meio da expressão da IL-10.

Portanto, os achados desta pesquisa apontam para um potencial efeito do CAP em diversos mecanismos regulatórios no processo de cicatrização, sendo uma

tecnologia viável para aplicação dentro do processo de cura e recuperação de feridas.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu nenhum subsídio específico de agências de financiamento dos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Declaração de Conflito de Interesse

Nenhum dos autores deste estudo possui relacionamento financeiro ou pessoal com outras pessoas ou organizações que possam influenciar ou enviesar de forma inadequada o conteúdo do artigo.

Referencias

- Bernhardt, T., Semmler, M.L., Schäfer, M., Bekeschus, S., Emmert, S., Boeckmann, L. Plasma Medicine: applications of cold atmospheric pressure plasma in dermatology. 2019. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 21, 01-11.
- Boeckmann, L., Bernhardt, T., Schäfer, M., Semmler, L., Kordt, M., Waldner, A.C. Current indications for plasma therapy in dermatology. 2020. *Hautarz.* 71, 109–113.
- Bolgeo, T., Maconi, A., Gardalini, M., Gatti, D., Di Matteo, R., Lapidari, M. The role of cold atmospheric plasma in wound healing processes in critically ill patients. 2023 *J. Pers. Med.* 13, 736-745.
- Campos, A.C.L., Borges-Branco, A., Growth, A.K. Cicatrização de feridas. 2007. *Arq. Bras. Cir. Dig.* 20,51-58.
- Colares, C.M.P., Luciano, C.C.N., Heliny, C.C., Tipple, A.F.V., Galdino Jr., H. Cicatrização e tratamento de feridas: a interface do conhecimento à prática do enfermeiro. 2019. *Enferm. Foco.* 10(3), 52-58.

- Cruz, F.M.V., Domingues, E.A.R., São-João, T.M., Oliveira, U.A. Validade e confiabilidade do instrumento resultados esperados da avaliação da cicatrização de feridas crônicas (RESVECH 2.0). 2023. J. Braz. Enterostomal Ther. 21 (1310), 1-10.
- Dang, V., Bao, S., Ault, A., Murray, C., McFarlane-Mills, J., Chiediet, C. Efficacy and safety of five injectable anesthetic regimens for chronic blood collection from the anterior vena cava of Guinea pigs. 2008. J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 47(6), 56-60.
- Hall, C.L., Wells, A.R., Leung, K.P. Pirfenidona reduz respostas profróticas em miofibroblastos dérmicos humanos, in vitro. 2018. Laboratório Investir. 98, 640 - 665.
- Strunk Jr., W., White, E.B. Os elementos do estilo. Longman, «Nova Iorque» 2020.
- Hung, Y.W., Lee, L.T., Peng, Y.C., Chang, C.T., Wong, Y.K., Tung, K.C. Effect of a nonthermal-atmospheric pressure plasma jet on wound healing: an animal study. 2016. J. Chin Med Assoc. 79 (6), 320–328.
- Hussni, C.A., Groh, T.M., Alves, A.L.G., Crocci, A.J., Mello, N.J.L., Watanabe, M.J. Efeitos da fenilbutazona na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em equinos. 2010. J. Braz. Vet. Res. Anim. Sci. 47(4), 262-267.
- Izadjoo, M., Zack, S., Kim, H., Skiba, J. Medical applications of cold atmospheric plasma: state of the Science. 2018. J. Wound Care. 2018. 27(Sup. 9), 4-10.
- Kubinova, S., Zaviskova, K., Uherkova, L., Zablotskii, V., Churpita, O., Lunov, O. Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats. 2017. Sci Rep. 24 (7), 451-483.
- Lendeckel, D., Eymann, C., Emicke, P., Daeschlein, G., Darm, K., O'Neil, S. Proteomic changes of tissue-tolerable plasma treated airway epithelial cells and

their relation to wound healing. 2015. Biomed Res. Int. 1-17.

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/506059>

Lima, I.C., Wu, S.V., Silva, L.M., Freitas, J.J.S., Carneiro, F.R.O., Oliveira, F.R.T.

Quantificação de colágeno tipos I e III em lesões de pele de pacientes portadores de hanseníase. 2020. Rev. Pan-Amaz. Saúde. 11, 1-8.

Lou, B.S., Hsieh, J.H., Chen, C.M., Hou, C.W., Wu, H.Y., Chou, P.Y., Lai, C.H., Lee, J.-W.

2020. Helium/Argon-Generated Cold Atmospheric Plasma Facilitates Cutaneous Wound Healing. Front Bioeng Biotechnol. 30(8), 683-691.

Macedo, A.S., Goulart, M.A., Alievi, M.M., Mombach, V.S., Dal-Bó, Í.S., Mucillo, M.S., Silva, R. B., Minto, B.W.

Tibial osteosynthesis in a guinea pig (*Cavia porcellus*). 2015. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 67(1), 89-93.

<https://doi.org/10.1590/1678-7498>

Metelmann, H.R., Vu, T.T., Do, H.T., Le, T.N.B., Hoang, T.H.A., Phi, T.T.T., Luong, T.M.L., Doan, V.T., Nguyen, H.T.H., Li, D.Q., Le, T.K.X., Woedtke, T.V.,

Bussiahn, R., Weltmann, K.D., Khalili, R., Podmelle, F. Scar formation of laser skin lesions after cold atmospheric pressure plasma (CAP) treatment: a clinical long term observation. 2013. Clin. Plasma Med. 1 (1), 30–35.

<https://doi.org/10.1016/j.cpme.2012.12.001>

Nastuta, A.V., Topala, I., Grigoras, C., Pohoata, V., Popa, G. Stimulation of wound

healing by helium atmospheric pressure plasma treatment. 2011. J. Phys. D: Appl. Phys. 44(10), 105-204.

Rajasekaran, P., Bibinov, N., Awakowicz, P. Atmospheric-pressure piezo-driven

microplasma source for bio-medical applications. 2011. Plasma Process Polym. 8, 246-255.

- Ram, M., Singh, V., Kumawat, S., Kant, V., Tandan, S.K., Kumar, D. Bilirubin modulated cytokines, growth factors and angiogenesis to improve cutaneous wound healing process in diabetic rats. 2016. *Int Immunopharmacol.* 30, 137-149.
- Schmitz, S., Tacke, S., Guth, B., Henke, J. Comparison of physiological parameters and anaesthesia specific observations during isoflurane, ketamine-xylazine or medetomidine-midazolam-fentanyl anaesthesia in male guinea pigs. 2016. *PLoS One.* 11(9), 1-11.
- Stratmann, B., Costea, T.C., Nolte, C., Hiller, J., Schmidt, J., Reindel, J., et al. Effect of cold atmospheric plasma therapy vs standard therapy placebo on wound healing in patients with diabetic foot ulcers a randomized clinical trial. 2020. *JAMA Network Open.* 3(7), 1-12. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.10411
- Tipa. R. S., Kroesen, G. M.W. Plasma-Stimulated Wound Healing. 2011. *IEEE Trans Plasma Sci.* 39(11), 2978–2979.
- Vector Laboratories. VECTASTAIN® Universal Quick HRPKit, Peroxidase, R.T.U. PK-7800, 2023.
- Zang, Z., Cao, G., Sha, L., Wang, D., Liu, M. The Efficacy of sodium Aescinate on cutaneous wound healing in diabetic rats. 2015. *In Inflamm.* 38(5), 1942-1948.

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES TEMPOS E MÉTODOS DE APLICAÇÃO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO EM FIBROBLASTOS: UM ESTUDO *IN VITRO*

COMPARISON OF THE EFFECTS OF DIFFERENT TIMES AND METHODS OF APPLICATION OF COLD ATMOSPHERIC PLASMA ON FIBROBLASTS: AN IN VITRO STUDY

Situação do artigo:

Submetido em: 07/12/2023

Revista: Revista Brasileira de Enfermagem

RESUMO

Objetivo: Comparar diferentes tempos e métodos de aplicação do plasma atmosférico a frio na atividade e comportamento de fibroblastos. **Métodos:** Foi realizado um estudo in vitro com fibroblastos da linhagem 3T3 tratadas com CAP. As células foram divididas em grupos: controle (GC) e de acordo com o modo de aplicação direto e indireto e o tempo: 10 e 30 segundos (GD10s, GD 30s, GI10s, GI30s). Após 24 horas de tratamento as células foram analisadas quanto a proliferação, viabilidade e morfologia celular pelo ensaio da anexina V e MEV, respectivamente. **Resultados:** A partir destas análises pode-se encontrar que os fibroblastos responderam de maneira positiva ao tratamento no modo direto e por 10 segundos sendo a definição destas duas variáveis fundamentais para condução clínica. Além disso, aquelas células tratadas dentro dessas condições apresentaram uma morfologia semelhante àquelas do controle. Em contrapartida, o tratamento com CAPI 30s foi o menos favorável para as células com maior apoptose e necrose. **Conclusões:** Conclui-se que a interação entre os parâmetros, deve ser levado em consideração na decisão clínica quando o CAP for utilizado para cicatrização de feridas.

Descritores: Palavras chaves: Medicina do plasma; cicatrização; feridas; Fibroblastos 3T3.

INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização é composto por uma sequência de eventos simultâneos que envolve diversos tipos celulares. Têm-se a fase inflamatória com a presença de células de defesa como neutrófilos, monócitos e macrófagos; a fase proliferativa que envolve células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos; e a fase de remodelação com a reorganização da matriz extracelular¹.

Dentre estas células, os fibroblastos se caracterizam por serem as mais prevalentes em todo organismo e responsáveis por uma importante fase no processo de cicatrização, com capacidade de alterar seu perfil para contribuir com o processo de cicatrização cutânea, sendo responsáveis por secretar a matriz de colágeno, responsável pela estruturação do tecido lesionado. No entanto, apesar de bem definido, o processo pelo qual isso ocorre, ainda não é totalmente compreendido^{2,3}.

Portanto, diante da complexidade dessas interações, a cicatrização cutânea ainda se configura como um desafio terapêutico, principalmente a nível molecular e têm-se buscado diversas intervenções no sentido de não somente acelerar este processo, como também de melhorar a qualidade dos eventos e consequentemente o resultado. Nesta perspectiva, surge o plasma atmosférico a frio (CAP) que tem ganhado espaço e se tornado um campo importante na ciência médica para diversas intervenções em saúde, dentre elas, a cicatrização de feridas^{4,5}.

Neste sentido, apesar de, ao longo dos anos de estudos, alguns dos seus efeitos já terem sido comprovados como o antimicrobiano, antineoplásicos e a cicatrização cutânea; alguns mecanismos ainda não se encontram bem elucidados. A exemplo do efeito e nível de segurança da sua aplicabilidade a nível celular⁶.

Diante disto, o presente estudo teve como objetivo comparar diferentes tempos e métodos de aplicação do plasma atmosférico a frio na atividade e comportamento celular de fibroblastos.

MÉTODOS

Cultura de células

A cultura dos fibroblastos da linhagem 3T3 (CRL - 1658, ATCC) foi realizado em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - Gibco™ DMEM, high glucose) e 10% de soro fetal bovino (Corning™ Regular Fetal Bovine Serum), 100 ul/ML de penicilina e 100 µg de estreptomicina (Gibco™ Penicillin-Streptomycin) e posteriormente incubadas a 37° C em câmara de CO₂ a 5%, com troca de meio de cultura a cada 48 horas.

Tratamento do plasma atmosférico a frio sobre as células

No presente estudo, os tratamentos de CAP foram realizados utilizando equipamento comercial Hygiaplasma modelo EHF 1714 (KLD, Amparo, SP, Brasil) adaptado para produzir jato de plasma a partir da descarga dielétrica (DBD). Na adaptação foi utilizado um bocal de Teflon com diâmetro de 10 mm para passagem do gás hélio na descarga DBD gerada pelo equipamento e, consequente produção do jato de plasma. Este bocal possuía entrada de gás, com vazão controlada por meio de válvula e fluxômetro. O jato de plasma à pressão atmosférica fria tinha hélio de alta pureza (99,99%) como gás de trabalho a uma vazão de 2 L/min⁷

Para avaliar o efeito do tratamento de plasma sobre as células em cultivo, as células foram transferidas para placas de 24 poços e divididas em dois grupos: Grupo I (GI) para aquelas células tratadas pelo método indireto e Grupo D (GD) para as células tratadas pelo método direto. Dentro de cada um destes grupos ainda foi feita a subdivisão para analisar o efeito do tempo de aplicação, assim, o Grupo I foi composto pelo controle de crescimento (GC), ou seja, células sem tratamento; pelo grupo 10s (GI 10s) para aquelas células tratadas com CAP por 10 s e o grupo 30 s (GI 30s) para aquelas células tratadas com CPA por 30 s. A mesma configuração se deu no GD onde obteve-se os grupos GC, GD 10s E GD 30s. Dessa forma, as células foram expostas ao plasma pelo tempo determinado para seu grupo em cinco pontos designados por placa a uma potência de 1350 mW no modo contínuo e a uma distância entre o bico do dispositivo do plasma DBD e da superfície da célula foi de 15 mm.

No caso do GD, antes do tratamento com plasma, os meios de cada poço foram completamente removidos, e uma pequena quantidade de DMEM sem soro (cerca de 200 microlitros) foi adicionada para manter as células úmidas durante o

tratamento. As células foram expostas diretamente ao jato de plasma, pelo tempo determinado para cada grupo. Para tratamento indireto foi feita a aplicação do mesmo jato de plasma, seguindo os mesmos parâmetros no meio de cultivo e logo após transferidos para as células.

Após 24h dos tratamentos, foram realizadas os ensaios in vitro conforme descritos a seguir.

Avaliação da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após o tratamento com CAP, através de ensaio do Alamar Blue (Invitrogen, USA), que consiste em um método colorimétrico que permite a detecção da atividade metabólica das células a partir da redução da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), um corante azul fracamente fluorescente, em resorufina, um corante rosa com altíssima fluorescência em vermelho. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, na densidade de 5×10^3 células por poço. Cada tratamento foi avaliado em quintuplicata. Em cada intervalo do experimento o meio foi removido e as células foram cultivadas com 10 μ L de Alamar Blue (Invitrogen, USA) e 90 μ L de meio DMEM sob condições normais de cultivo. Após quatro horas, 200 μ L dessa solução foi removido de cada poço e a absorbância das soluções foram medidas em leitor de microplaca (Epoch, USA) a 570 nm (forma reduzida) e 600 nm (forma oxidada) e a redução do Alamar Blue foi então calculada a partir da equação fornecida pelo fabricante.

Ensaio de apoptose

Um kit de apoptose de células mortas FITC / Anexina V com anexina FITC e PI (Invitrogen, EUA) foi utilizado para detecção de apoptose. O 3T3 (2×10^3 células/disco) foi cultivado nas duas superfícies diferentes. Após 24 h, as células aderentes foram liberadas por viokase, lavadas duas vezes em PBS gelado e depois incubadas com 5 μ L de anexina V-FITC e 1 μ L de iodeto de propídio (PI) a 100 μ g/mL de PBS em temperatura ambiente por 20 min, protegido da luz. A porcentagem de apoptose foi determinada a cada 10.000 eventos utilizando um citômetro de fluxo (BD Facsanto II), comprimentos de onda de emissão e

fluorescência de 530 nm e 570 nm. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FlowJo Analysis versão 9.3.2 (Tree Star Incorporation, OR, EUA).

Avaliar o efeito produção de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é uma importante espécie reativa produzida pelo CAP que possui efeitos biológicos (XIA et al., 2019) . Para esta análise, foi utilizado o kit colorimétrico Griess NO (ab65328, Abcam). Esse processo se deu em duas etapas: inicialmente, a nitrato redutase foi utilizado para conversão de nitrato em nitrito. Logo em seguida, o reagente Griess foi utilizado para converter nitrito em um composto com coloração roxo profundo. A partir disto, a intensidade do cromóforo refletiu com precisão os níveis de óxido nítrico. A densidade óptica foi medida em 540 nm usando o leitor de microplacas⁸ .

Microscopia eletrônica de varredura

Para análise da morfologia celular, 5×10^4 células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro por 24h, em seguida submetidas a tratamento por CAP descrito anteriormente . Após tratamento, as células foram fixadas as lamínulas com glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2 (PBS), pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1% por 2h. Após a pós-fixação, foram desidratadas em série crescente de etanol, e metalizadas com ouro. As imagens foram capturadas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) (SEM-SSX 550 Superscan, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan).

Análise estatística

Os dados foram expressos em valores de média $\pm$ desvio padrão através dos programas estatísticos SPSS (Armonk, NY: IBM Corp.) versão 23.0. Após análise dos pressupostos paramétricos, diferenças estatísticas entre e dentro dos grupos experimentais (CAP D e CAP I) para os momentos (10s e 30s) nas diferentes variáveis estudadas foram obtidas por teste t independente. Já diferenças estatísticas entre os grupos estudados com seus respectivos momentos frente ao grupo controle foi verificado por Análise de Variância (ANOVA) seguida por Dunnett. Para esse último, o grupo controle foi utilizado como variável base de comparação. A Análise de Covariância (ANCOVA) foi utilizada para verificar diferenças

estatísticas entre CAP D e CAP I quando considerado os momentos em conjunto (10s + 30s). Dados percentuais sofreram transformação arco seno $\sqrt{x}$. Quando rompido distribuição gaussiana, os dados foram analisados por Mann-Whitney. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS

O presente estudo propôs-se a analisar o comportamento de fibroblastos por meio da aplicação direta e indireta do CAP levando em consideração dois intervalos de tempo, a saber: 10 segundos e 30 segundos. Ao analisar a proliferação celular por meio do alamar blue nota-se que o tratamento com CAP não interferiu na proliferação celular, exceto aquele aplicado no modo direto durante 30 segundo que demonstrou uma diminuição celular em todos os intervalos analisados, além dos tratamentos indireto em 10 e 30 segundos no intervalos de 72 horas (Tabela 1).

Tabela 1– Valores de média $\pm$ desvio padrão do percentual de redução de resazurina pelas células 3T3 viáveis no ensaio de Azul de Alamar após tratamento com plasma atmosférico a frio direto (10 ou 30s) ou indireto (10 ou 30s).

Grupos experimentais	24h [¥]	48h	72h
Controle [¥]	53,9 $\pm$ 2,06 ^{bA}	73,81 $\pm$ 3,17 ^{aA}	99,92 $\pm$ 3,51 ^{aA}
CAP D 10s	54,17 $\pm$ 2,19 ^{bA*}	72,28 $\pm$ 4,67 ^{aA*}	97,03 $\pm$ 10,02 ^{aA*}
CAP D 30s	46,63 $\pm$ 2,67 ^{bB}	64,28 $\pm$ 5,1 ^{aB}	78,61 $\pm$ 7,5 ^{aB}
CAP I 10s	60,25 $\pm$ 6,0 ^{bA}	77,97 $\pm$ 2,61 ^{aA**}	73,31 $\pm$ 4,33 ^{aB}
CAP I 30s	59,13 $\pm$ 2,97 ^{bA}	73,32 $\pm$ 3,57 ^{aA}	73,52 $\pm$ 6,15 ^{aB}

^{A,B} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e ^{a,b,c} minúsculas na linha significa diferença estatística tendo como [¥] referências, grupo controle e tempo 24h ($p < 0,05$ – Dunnett); * Significa diferença estatística entre CAP D 10s e CAP D 30s na coluna ($p < 0,05$ – Mann-Whitney); ** Significa diferença estatística entre CAP I 10s e CAP I 30s na coluna ($p < 0,05$ – Mann-Whitney).

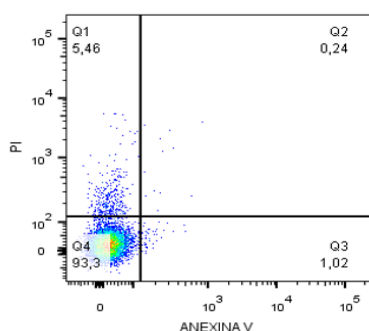
CAPD10S e 30S = aplicação do CAP de maneira direta por 10 e 30 segundos, respectivamente. CAPI10S E 30 S= aplicação do CAP de maneira indireta por 10 e 30 segundos, respectivamente.

Comparando-se entre os grupos, levando em consideração o tempo de aplicação, têm-se que para o tratamento direto (CAP D), houve diferença estatística entre os grupos em 24, 48 e 72 horas sendo que o tempo de 10 segundos apresentou maiores médias, ou seja, apresentou-se mais favorável

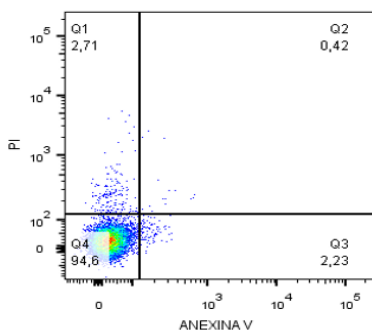
para proliferação celular ao longo do tempo, conforme pode ser observado na tabela 1.

A apoptose celular foi quantificada por citometria de fluxo. As células viáveis foram apresentadas no quadrante 4 (Q4). Células que apresentaram apoptose recente no quadrante 3 (Q3), células que apresentaram apoptose tardias no quadrante 2 (Q2) e células necróticas no quadrante 1 (Q1) (Figura 1).

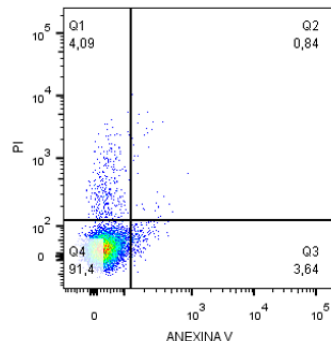
CONTROLE



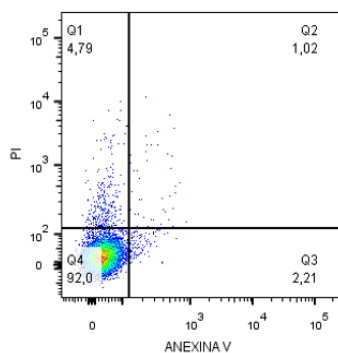
CAPD 10s



CAPD 30s



CAPI 10s



CAPI 30s

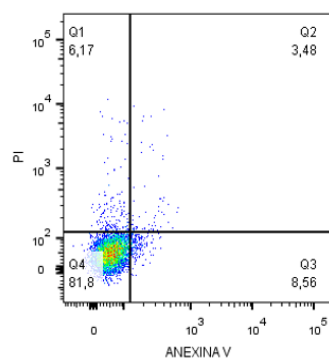


Figura 1: Análise de apoptose utilizando kit anexina V/ iodeto de propídeo por citometria de fluxo. A – Controle, B – tratamento direto de plasma atmosférico a frio (CAP) por 10s (CAPD10s), C- tratamento direto de plasma atmosférico a frio (CAP) por 30s (CAPD30s), D- tratamento indireto de plasma atmosférico a frio (CAP) por 10s (CAPI10s), D- tratamento indireto de plasma atmosférico a frio (CAP) por 30s (CAPI 30s)

A partir desses valores, foi feita uma comparação dos grupos tratamentos com o controle e os achados apontam que o CAP quando aplicado de maneira direta por 10 segundos não interferiu na viabilidade celular, nem nos eventos de apoptose inicial, tardia e necrose. Com relação aos demais tratamentos, houve redução das células viáveis e, de maneira geral, através da análise de covariância, pode-se afirmar que a aplicação pelo método indireto e por 30 segundos foi aquele que mais induziu a apoptose (tanto inicial como tardia) e a necrose (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de média $\pm$ desvio padrão a respeito da viabilidade celular

Variáveis	Grupos	10s	30s	p-valor	p-valor (ANCOVA) ¥
Células viáveis	CAP D	94,4 $\pm$ 0,2 A	87,8 $\pm$ 4,9A	0,112	0,143
	CAP I	92,0 $\pm$ 0,1A	78,5 $\pm$ 3,9A	0,019*	
Células necróticas	CAP D	3,3 $\pm$ 0,5B	6,1 $\pm$ 2,5B	0,1070	0,009*
	CAP I	4,7 $\pm$ 0,3A	8,0 $\pm$ 2,2A	0,0470 *	
Células apoptóticas	CAP D	1,9 $\pm$ 0,4A	4,7 $\pm$ 1,6B	0,0425 *	0,016*
	CAP I	2,3 $\pm$ 0,4A	8,5 $\pm$ 0,1A	<0,001 *	
Células apoptóticas tardias	CAP D	0,37 $\pm$ 0,05B	1,29 $\pm$ 0,65B	0,0820	0,002*
	CAP I	1,04 $\pm$ 0,02A	4,92 $\pm$ 1,72A	0,0007 *	

A,B Letras maiúsculas diferentes na coluna e * significa diferença estatística entre momentos na linha ($p < 0,05$); ¥ ANCOVA entre os grupos experimentais (CAP D e CAP I) tendo como covariável os momentos (10s e 30s).

No que se refere ao fator tempo, ao observar o tratamento indireto, nota-se que houve uma diferença significativa neste modo de aplicação com relação aos 30 segundos que se apresentou mais danoso para as células diante dos aspectos analisados (Tabela 2). A partir destas comparações, é possível afirmar que o comportamento dos fibroblastos com relação a sua viabilidade e morte celular irá variar tanto com relação ao tipo de aplicação, com maior sensibilidade ao método indireto, como também com relação ao tempo de aplicação. Assim sendo, o tempo de 10 s e a aplicação direta, se mostraram mais favoráveis para estas células.

No que se refere a mensuração do nitrito, conforme pode ser observado na tabela 3 não houve diferença estatística quando comparado o controle aos grupos tratados, ou seja, dentro dos parâmetros estabelecidos o CAP não estimulou a produção desta espécie reativa.

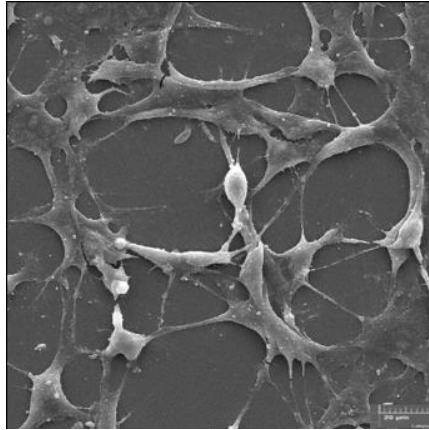
Tabela 3 – Valores de média da produção de nitrito induzida pela aplicação do CAP

Grupos experimentais	Média	Desvio padrão	Mediana (Q25% - Q75%)	IC95%
Controle [¥]	1,31 ^A	0,45	1,31 (0,95 – 1,68)	0,74 – 1,88
CAP D 10s	1,90 ^A	0,88	1,80 (1,19 – 2,65)	0,79 – 3,00
CAP D 30s	1,17 ^A	0,27	1,07 (0,95 – 1,43)	0,82 – 1,51
CAP I 10s	1,51 ^A	0,47	1,56 (1,07 – 1,92)	0,92 – 2,09
CAP I 30s	1,51 ^A	0,40	1,31 (1,19 – 1,92)	1,01 – 2,01

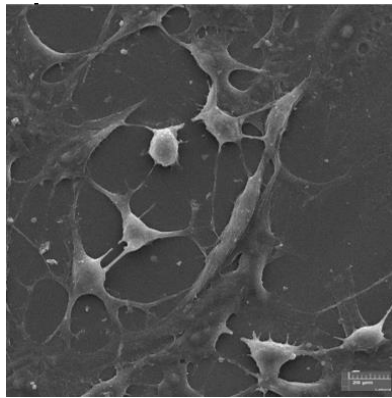
^{A,B} Médias seguidas de letras diferentes na coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$ – Dunnett); [¥] Variável de referência.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

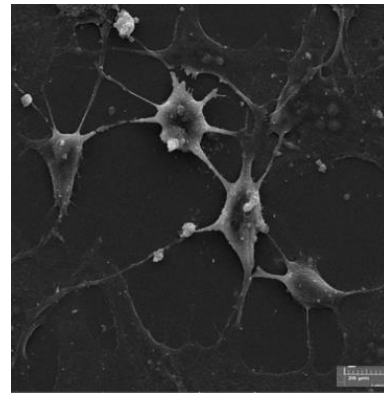
Com relação aos resultados obtidos através da MEV, observa-se na figura 3, diferenças significativas na morfologia celular entre os diferentes modos e tempo de tratamento com CAP. Assim, confirmando os achados anteriores pode-se afirmar que aquelas células tratadas com CAP de maneira direta por 10 segundos apresentaram-se mais bem aderidas, com morfologia semelhante as células fibroblásticas e com filopódios ao longo de toda superfície, em monocamada, com uma boa ligação entre elas.



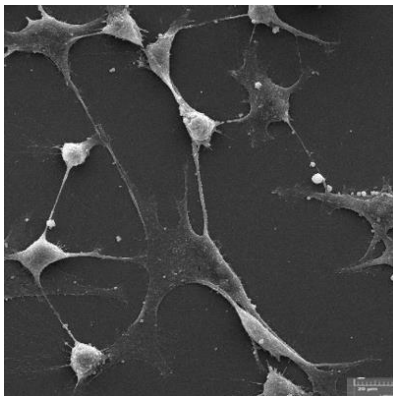
(Ctrl)



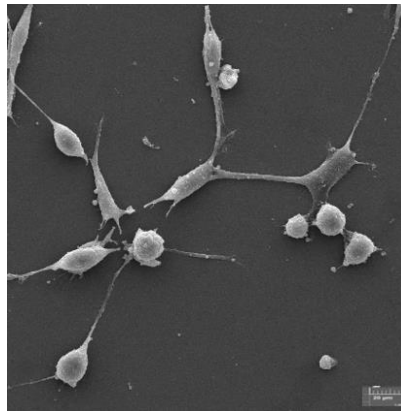
(CAP D10s)



(CAP D 30s)



(CAP I 10s)



(CAP I 30s)

Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fibroblastos 3T3 submetidas a diferentes tratamentos com CAP. A – Controle (Ctrl), B – tratamento direto de plasma atmosférico a frio (CAP) por 10s (CAPD10s), C- FAZER OS MESMO PARA OS DEMAIS

DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a resposta dos fibroblastos ao tratamento do CAP em diferentes tempos e modos de aplicação, como forma de direcionar a escolha dos parâmetros para aplicação do plasma na dermatologia, especialmente no processo de cicatrização de feridas.

Diante dos resultados desta pesquisa, pode-se afirmar que o tempo de aplicação é uma variável importante na proliferação celular quando se leva em consideração a resposta dos fibroblastos, importantes células que atuam na produção de colágeno, além da matriz extracelular e trabalham no sentido de manter a sustentação e força tênsil da cicatriz⁹.

Neste sentido, entender como uma proposta de tratamento influencia na viabilidade, proliferação e morte destas células é de fundamental importância para uma decisão clínica. No caso do CAP, este estudo aponta como favorável para o tratamento a aplicação de maneira direta e com o tempo de 10 segundos. Pois a aplicação de maneira direta ou indireta por 30 segundos causou uma diminuição da proliferação celular. O que levanta a importante questão da necessidade de se determinar de maneira segura essa variável no momento do tratamento.

No entanto, vale considerar que os efeitos causados nas células podem ser explicados por diferenças entre dispositivos, configurações ou modelos celulares. Dessa forma, o impacto plasmático causado pelo CAP pode induzir proliferação celular, diferenciação e apoptose¹⁰. E esse comportamento pode ainda estar relacionado aos componentes da membrana e propriedades físico-químicas distintas

11.

No que refere a viabilidade celular, o tratamento quando feito de maneira direta e por 10 s foi o que demonstrou maior viabilidade das células fibroblásticas. Em contrapartida, o tratamento indireto por 30 segundos foi o que apresentou maior necrose de células. Isto pode estar relacionado a interação do CAP com o meio de cultura necessário para sobrevivência das células e, portanto, há a necessidade de aprofundamento com relação a essa interação e todos os componentes presentes neste meio. Portanto há uma necessidade de se conhecer sobre o tipo do meio de cultura utilizado e como esta interação influencia na resposta celular, além da forma

como as células são cultivadas¹². Visto que a aplicação por esse método vem crescendo nos últimos anos na medicina do plasma.

No que refere ao fator tempo, vale ressaltar que está diretamente ligado a potência utilizada para o tratamento. Portanto, quando utilizada altas potências é possível encontrar danos na camada epidérmica e dérmica, com aparências de queimaduras e fibroblastos lesionados com formas arredondadas e cor escura, independentemente do gás utilizado já no tempo de 5 segundos. No caso de potências intermediárias, esses danos tornam-se autolimitados e baixa potência os tecidos aparentam-se compatíveis com os controles em um tempo de até 10 segundos. No entanto, houve o prolongamento por 25 segundos, a maioria dos fibroblastos nas regiões dérmicas inferiores sofreram lesão¹².

Esta relação dose dependente com a diminuição da viabilidade celular, já é estabelecida na literatura, pois há uma importante relação entre as cargas geradas por plasma e espécies reativas de oxigênio como contribuintes para a morte celular induzida. No entanto, estes danos e morte celular das células é produzido por essas espécies e não pelo campo que é gerado pelo CAP¹³.

Contrariando estes achados, neste estudo não houve relação significativa no que se refere a mensuração do nitrito, mesmo sendo uma importante espécie de oxigênio reativa. Ou seja, o tratamento proposto não induziu seu aumento. Vale salientar que não foi avaliado a interação do plasma com o meio, somente com as células de maneira direta. Além do que não foram medidas outras espécies relevantes e que são produzidas pelo CAP como o H₂O₂, O₃, NO₂, ozônio, dentre outras¹⁴.

Entretanto, outro estudo¹⁵ aponta que há a possibilidade de três respostas ao tratamento com CAP em culturas celulares: a apoptose, perda temporária de adesão celular e a necrose. E que seus achados afirmam que a resposta dos fibroblastos ao tratamento com CAP foi fortemente afetada pelo fluxo de ar, o que desencadeou morte celular.

Neste estudo foi possível perceber tanto apoptose imediata como tardia, além da necrose celular relacionada principalmente ao tempo de 30 segundos, mas também ao modo de aplicação indireto. Já a literatura aponta para uma indução mínima de

necrose por processos inflamatórios, sendo mais comum o processo de apoptose tanto precoce, como tardia¹⁶.

Sobre a morfologia dessas células, neste estudo, notou-se que aquelas tratadas com aplicação direta e por 10 segundos, demonstrou um padrão de células mais bem aderidas e com filopódios em toda sua extensão, confirmando todos os testes anteriores. Vale salientar que as células fibroblásticas são sensíveis às alterações na morfologia da superfície, influenciando a motilidade e possivelmente a proliferação celular¹⁷.

Este comportamento está relacionado as configurações dos dispositivos, bem como os parâmetros de cultura celular. Isto foi evidenciado por Virard et al¹² que relataram uma diminuição significativa do número de células aderentes com exposição 5kV e 30 segundos com gás hélio, com as células apresentando uma morfologia redonda, semelhante a um balão, sem qualquer formação de bolhas na membrana, sugerindo indução de morte celular, principalmente por necrose.

Isto desperta para a discussão do estabelecimento de parâmetros levando em consideração a seletividade do CAP quando se tem como objetivo a morte celular, a exemplo do tratamento na oncologia¹⁴ por meio do uso do seu efeito citotóxico para estas células. Como também chama atenção para a relevância com relação a escolha dos parâmetros para tratamento clínico dentro do processo de cicatrização, sendo imprescindível definir o modo de aplicação e o tempo de acordo com o objetivo terapêutico, assim como levar em consideração o tipo de célula envolvida.

CONCLUSÕES

Entender o comportamento celular nas diversas aplicabilidades terapêuticas do CAP, contribui para uma aplicação mais segura e eficaz. Assim, este estudo aponta para um tratamento com diferentes modos de aplicação e tempo, o que levanta a importante questão da definição dos parâmetros baseada no objetivo terapêutico e tipo de células a serem tratadas.

Diante disto, este estudo encontrou que as células fibroblásticas respondem de maneira positiva ao tratamento com CAP no modo direto e por 10 segundos. Portanto, a interação entre os parâmetros, bem como o tipo de aparelho deve ser

levado em consideração na decisão clínica quando o CAP for utilizado para cicatrização de feridas

REFERÊNCIAS

- 1 Sen, CK Wound healing essentials: Let there be oxygen. Wound Repair Regen. 2009, 17:1–18.
- 2 Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblast. J wound care 2013, 22(8): 407 – 412. DOI: 10.12968/jowc.2013.22.8.407.
- 3 Donovan J, Abraham D, Normam J. Platelet derivet Growth fator signaling in mesenchymal cells. Front biosci. 2013 (18): 106-119. DOI: 10.2741/4090
- 4 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. JD 2012 British Association of Dermatologists 2012 2012; 167(2):404–410. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2010.09744.x.
- 5 Daeschlein G , Scholz S , Ahmed R , Majumdar A , Von Woedtke T , Haase H, et al. Cold plasma is well tolerated and does not disturb the thermal barrier or reduce skin hydration. Journal of the German Society of Dermatology: JDDG. 2012; 10(7):509–515. PMID:22405534
- 6 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 10(3): e0120041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120041>
- 7 Holanda AGA , Cesário BC, Silva VM, Francelino LEC, Nascimento BHM, Damasceno KFA, et al. Use of Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Squamous Cell Carcinoma: in vitro Effects and Clinical Application in Feline Tumors: A Pilot Study. Top Companion Anim Med. 2023: 53-54:100773. doi: 10.1016/j.tcam.2023.100773.
- 8 Ahmed AAR, Aziza BS, Ahmed H. Selenium Nanoparticles Induce the Chemo-Sensitivity of Fluorouracil Nanoparticles in Breast and Colon Cancer Cells. .”

Biological Trace Element Research 187 (2018): 80 - 91. DOI:10.1007/s12011-018-1360-8

9 Griffin MF, desJardins-Park HE, Mascharak S, Borrelli MR, Longaker MT. Understanding the impact of fibroblast heterogeneity on skin fibrosis. *Dis Model Mech* . 2020 Jun 15;13(6):dmm044164.doi: 10.1242/dmm.044164.

10 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;8:e79325.

11 Pai KK, Singarapu K, Jacob JD, Madihally SV. Dose dependent selectivity and response of different types of mammalian cells to surface dielectric barrier discharge (SDBD) plasma. *Plasma Process Polym* 2015; 12:666–677.

12 Virard F, Cousty S, Cambus JP, Valentin A, Kémoun P, Clément F. Cold atmospheric plasma induces a predominantly necrotic cell death via the microenvironment. *PLoS One* 2015;10:e0133120.

13 Lin A, Chernets N, Han J, Alicea Y, Dobrynin D, Fridman G, et al. Non-equilibrium dielectrical barrier discharge treatment of mesenchymal stem cells: charges and reactive oxygen species play the major role in cell death. *Plasma Process Polym* 2015;12:1117–1127.

14 Dzohara M, Huergo C, Gallego B, Rodríguez R, Tornín J. Exploring the Use of Cold Atmospheric Plasma to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Biomedicines*. 2023 Jan 14;11(1):208. doi: 10.3390/biomedicines11010208.

15 Arndt S, Unger P, Bosserhoff A.-K, Berneburg M, Karrer S. The Anti-Fibrotic Effect of Cold Atmospheric Plasma on Localized Scleroderma In Vitro and In Vivo. *Biomedicines* 2021, 9, 1545. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111545>

16 Lee JH, Kim K. Effects of a Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma Jet on Human Gingival Fibroblasts for Biomedical Application. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2876916>

17 Berry C, Campbell G, Spadaccino A, Robertson M, Curtis ASG., "The Influence of Microscale Topography on Fibroblast Attachment and Motility", *Biomaterials*, 2004, 25(26): 5781-5788. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.029>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A medicina do plasma tem evoluído ao longo dos anos e seu uso vem se consolidando dentro das ciências biológicas. Dentre estes, o tratamento de cicatrização de feridas desponta como algo inovador, resolutivo e prático para aplicação clínica.

No entanto, algumas lacunas na literatura com relação a padronização do seu modo de aplicação, escolha dos parâmetros e do aparelho ainda se apresenta como um fator limitante para sua aplicabilidade.

Diante disto, os resultados deste estudo fomentam o direcionamento para algumas decisões clínicas levando em consideração essas lacunas, a saber: modo de aplicação (direto ou indireto), frequência (contínuo ou pulsado), e tempo.

No que se refere a frequência, este estudo encontrou uma melhora na qualidade da cicatrização por meio da produção do colágeno tendo o modo contínuo apresentado valores significativos na síntese do colágeno tipo III e o modo pulsado na diminuição do colágeno tipo I. Portanto, ambos os modos contribuíram para uma melhor cicatrização de feridas. Além disso, ambos os modos apresentaram efeitos pró-inflamatórios nos tecidos tratados.

Com relação ao tempo e modo de aplicação, foi possível concluir que as células fibroblásticas respondem melhor ao tratamento com CAP no modo direto e por 10 segundos.