



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

THAYNARA RIBEIRO DO AMARAL

**APLICAÇÃO DO PLASMA ATMOSFÉRICO À FRIO EM FERIDAS
AGUDAS DE PORQUINHOS DA ÍNDIA (*Cavia porcellus*): UMA
AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO**

MOSSORÓ

2023

THAYNARA RIBEIRO DO AMARAL

**APLICAÇÃO DO PLASMA ATMOSFÉRICO À FRIO EM FERIDAS
AGUDAS DE PORQUINHOS-DA-ÍNDIA (*Cavia porcellus*): UMA
AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Filgueira Alcindo

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura.

MOSSORÓ

2023

© Todos os direitos estão reservados a 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 tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

A485a Amaral, Thaynara Ribeiro.

Aplicação do plasma atmosférico a frio em feridas agudas de porquinhos da índia (*Cavia porcellus*): uma avaliação do processo de cicatrização / Thaynara Ribeiro Amaral. – 2023. 37 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Filgueira Alcindo.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra Moura.

Monografia (graduação) – Universidade Federal Rural do Semi-árido, Curso de Medicina Veterinária, 2023.

1. Reparo tecidual. 2. Plasma de barreira dielétrica. 3. Tecido de granulação. I. Alcindo, Prof. Dr. Jefferson Filgueira, orient. II. Moura, Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) 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.

THAYNARA RIBEIRO DO AMARAL

**APLICAÇÃO DO PLASMA ATMOSFÉRICO À FRIO EM FERIDAS
AGUDAS DE PORQUINHOS DA ÍNDIA (*Cavia porcellus*): UMA
AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Defendida em: 13/10/2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **JEFFERSON FILGUEIRA ALCINDO**
Data: 20/10/2023 11:15:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jefferson Filgueira Alcindo (UFERSA)
Presidente

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA**
Data: 20/10/2023 10:35:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 **LAVÍNIA SOARES DE SOUSA**
Data: 20/10/2023 10:28:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Esp. Lavínia Soares de Sousa (UFERSA)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela graça de poder estar aqui, concluindo a graduação em Medicina Veterinária. Sempre foi meu amparo e, por mais que os dias fossem árduos e difíceis, sempre pude contar com sua força e proteção. “Encerro-me no Vosso Coração compassivo, que é um mar de misericórdia insondável” (Santa Faustina Kowalska).

Agradeço a interseção da Virgem Mãe Imaculada Conceição por sempre vir em meu auxílio e levar minhas orações mais perto de seu filho. Que eu possa sempre contar com seu poderoso amparo.

Agradeço a minha família: minha mãe Vandúzia Amaral, meu pai Raimundo Nonato, minha irmã Nayara Amaral, minha sobrinha Maria Cecília, minha tia/mãe Francisca Amaral. Vocês são o meu maior exemplo de força, determinação, de respeito e amor. Sem vocês a alegria que eu vivo hoje jamais seria possível. Todo o apoio que recebi, cuidado, as orações que sempre senti chegando até mim. Mesmo diante de tantos momentos complicados que passamos juntos, nunca ouvi de vocês a palavra “desistir”, e nós nunca desistimos. Por tudo isso e por meu amor incondicional a cada um, dedico a vocês essa conquista. Em nome desses, agradeço a todos os familiares que me apoiaram e me incentivaram nessa trajetória.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Jefferson Filgueira Alcindo por ter aceitado o desafio de me acompanhar na reta final da graduação e que, mesmo chegando na universidade recentemente, mostrou-se disposto a executar nossas ideias. Os alunos que pretendem seguir a área de Grandes Animais foram presenteados com sua chegada à UFERSA e o sr. se tornou um grande exemplo para todos nós. Como sua orientada e monitora de Clínica de Equídeos, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura por ter me acompanhado durante dois anos na iniciação científica e, antes disso, como meu prof. de Anatomia Veterinária na graduação. Lembro bem de todas as palavras de incentivo que recebi no primeiro período, assim como as felicitações pela aprovação no curso de Medicina Veterinária. Sou grata por ter me instruído academicamente e pelos ensinamentos que vão além da graduação.

Agradeço a minha banca examinadora nas pessoas do Prof. Dr. Jefferson Filgueira Alcindo, Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura e Esp. Lavínia Soares de Sousa. Meu agradecimento pelo aceite do convite.

Agradeço aos meus amigos Marcel Praciano e Natanael Nascimento. Sem vocês esse caminho teria sido muito mais difícil. Obrigada por me oferecerem uma amizade sincera, apoio nos momentos difíceis dentro e fora da UFERSA; e por tantos momentos felizes que nós

compartilhamos juntos. Todas as risadas sinceras (e altas), mesmo nos momentos mais complexos das nossas vidas dentro da graduação; foi dessa forma que nós conseguimos superar as dificuldades e fortalecer ainda mais o nosso vínculo. Deus foi muito generoso em colocar cada um de vocês em meu caminho e, assim, eu ganhei dois irmãos.

Agradeço a minha amiga e Médica Veterinária Lavínia Sousa, que também compõe com maestria a minha banca examinadora. Obrigada todo o apoio, cumplicidade, companheirismo, conselhos e pelos momentos felizes compartilhados. Pelos ensinamentos durante o estágio no Hospital Veterinário e por tantos plantões de cólica que passamos juntas. Sua amizade tornou minha vida mais feliz e essa reta final menos árdua. Deus mais uma vez colocou pessoas incríveis no meu caminho e, assim, também ganhei uma irmã.

Agradeço a minha amiga Joelma Gomes. Nos conhecemos no início da graduação em Medicina Veterinária e, com o passar do tempo, nosso vínculo e amizade se fortaleceu. Você sempre foi minha inspiração, exemplo de força, dedicação e responsabilidade. Sempre me ofereceu um carinho e cuidado que muito mais me lembrava uma mãe; e você é exatamente assim. Obrigada pelo apoio e por tantas risadas sinceras. Por aceitar que eu fizesse parte da sua vida acadêmica e seu Doutorado, que eu aprendesse tanto com a profissional impecável que você é e por ter aceitado que eu também compartilhasse da sua família.

Agradeço a minhas amigas Erika Vanessa e Cláudia Ellen pelo companheirismo durante esses anos de graduação, pelo apoio e momentos felizes compartilhados.

Agradeço a todos os professores pelos quais passei durante a graduação, em especial à Prof. Dra. Michelly Fernandes de Macedo, Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra e Profa. Natália Cristina de Medeiros. Agradecimento especial à Prof. Dra. Cibelle dos Santos Borges por ter se disponibilizado a colaborar na realização deste trabalho.

Agradeço ao setor de Grandes Animais do Hospital Veterinário da UFERSA, na pessoa do diretor Médico Veterinário Heider Irinaldo Pereira Ferreira e, assim, a todos os residentes que passaram pelo setor durante esses 5 anos. Sou grata por cada ensinamento, paciência e pela confiança depositada em mim. Aos amigos estagiários pelos conhecimentos compartilhados.

Agradeço a Liga Acadêmica de Estudos em Equídeos e Ruminantes nas pessoas dos diretores Janilson Olegário, Aparecida Fernandes, Filipe Lima, Rayara Freitas e Carlos Alberto Aquino. Obrigada pelo companheirismo. Saio da coordenação de extensão dessa liga com muito orgulho pelos profissionais que estão se tornando. Aos ligantes, obrigada.

Agradeço a todos os colegas de curso que compartilharam comigo esses anos de graduação, todos os funcionários que fazem parte da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

“É justo que muito custe o que muito vale.” (Santa Tereza D’Ávila)

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo e está em contato direto com o meio externo, constantemente suscetível às injúrias, atuando como barreira física, química e bacteriana. Uma ferida é caracterizada por uma descontinuidade no tecido cutâneo, podendo ser advinda de diversos fatores, como traumas ou condições patológicas específicas. Três fases principais compõem o processo de cicatrização: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de remodelação. Algumas feridas apresentam dificuldades para cicatrizar, não havendo progressão do processo natural de cura. Nesse contexto, diversas terapias não invasivas vêm sendo desenvolvidas a fim de proporcionar qualidade e eficácia ao processo de cicatrização. O plasma é constituído de um gás ionizado e é definido como o quarto estado da matéria. Ele é gerado a partir do lançamento de elétrons e fótons com energia suficiente sobre os átomos neutros e moléculas de fase gasosa. O uso terapêutico do plasma é baseado no conceito das espécies reativas, tendo como principal objetivo a resolução de problemas em tecidos biológicos, incluindo limpeza, cicatrização de feridas e o tratamento de tumores. Avaliar o efeito do plasma atmosférico à frio na cicatrização de feridas agudas em porquinhos da índia (*Cavia porcellus*). Foram utilizados 22 animais divididos três grupos para os dias de avaliação 7, 14 e 21 e submetidos a realização de 3 feridas no dorso, sendo ao mesmo tempo, experimento e controle. Uma ferida foi controle e as outras duas receberam tratamento com CAP (10 Hz). O jateamento foi de 1 minuto em cada ferida com gás hélio 2L/ min, imediatamente após a cirurgia e a cada 24 horas por 3 dias consecutivos. Todas as feridas foram fotografadas a partir do dia 0 e analisadas no software Image Pro Plus. Além do processamento histológico. Foi evidenciada a diminuição da área do tecido de granulação nos dias 14 ($p < 0,05$) e 21 ($p < 0,01$) do processo de cicatrização no grupo tratado com o plasma; houve tendência a diminuição da espessura epidérmica e aumento da queratinização no grupo tratado com o CAP, em comparação ao grupo controle. O tratamento com o plasma atmosférico a frio gerado por barreira dielétrica foi capaz de acelerar a cicatrização nas feridas agudas em porquinhos-da-índia.

Palavras-chave: reparo tecidual; plasma de barreira dielétrica; tecido de granulação.

ABSTRACT

The skin is the largest organ in the body and is in direct contact with the external environment, constantly susceptible to injuries, acting as a physical, chemical and bacterial barrier. A wound is characterized by a discontinuity in the skin tissue, which can be caused by several factors, such as trauma or specific pathological conditions. Three main phases make up the healing process: the inflammatory phase, the proliferative phase and the remodeling phase. Some wounds have difficulty healing, with no progression of the natural healing process. In this context, several non-invasive therapies have been developed in order to provide quality and effectiveness to the healing process. Plasma is made up of an ionized gas and is defined as the fourth state of matter. It is generated from the launch of electrons and photons with sufficient energy on neutral atoms and gas phase molecules. The therapeutic use of plasma is based on the concept of reactive species, with the main objective of solving problems in biological tissues, including cleaning, wound healing and the treatment of tumors. To evaluate the effect of cold atmospheric plasma on the healing of acute wounds in guinea pigs (*Cavia porcellus*). 22 animals were used, divided into three groups for evaluation days 7, 14 and 21 and subjected to 3 wounds on the back, being at the same time, experiment and control. One wound was control and the other two received treatment with CAP (10 Hz). Blasting was performed for 1 minute on each wound with 2L/min helium gas, immediately after surgery and every 24 hours for 3 consecutive days. All wounds were photographed from day 0 and analyzed using Image Pro Plus software. In addition to histological processing. A decrease in the granulation tissue area was evident on days 14 ($p<0.05$) and 21 ($p<0.01$) of the healing process in the group treated with plasma; there was a tendency for a decrease in epidermal thickness and an increase in keratinization in the group treated with CAP, compared to the control group. Treatment with cold atmospheric plasma generated by a dielectric barrier was able to accelerate healing in acute wounds in guinea pigs.

Keywords: tissue repair; dielectric barrier plasma; granulation tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Epiderme e principais componentes da derme.	16
Figura 2	–	Principais configurações de fontes de plasma frio à pressão atmosférica	22
Figura 3	–	Confecção das feridas experimentais em porquinhos da índia.....	25
Figura 4	–	Fotomicrografias das feridas cutâneas de porquinhos-da-índia (<i>Cavia porcellus</i>) tratados por CAP	29
Figura 5	–	Análise da área do tecido de granulação das feridas experimentais	30
Figura 6	–	Curva de avaliação da redução do tecido de granulação em feridas agudas de porquinhos-da-índia	30
Figura 7	–	Análise da área do tecido de granulação das feridas experimentais	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	Anatomia e histologia da pele	15
3.2	Cicatrização da pele.....	17
3.2.1	Hemostasia.....	18
3.2.2	Fase inflamatória	18
3.2.3	Fase proliferativa	19
3.2.3	Fase de remodelação	20
3.3	Plasma gerado por barreira dielétrica (DBD) a frio	20
3.3.1	Plasma DBD na cicatrização de feridas	20
3.3.2	Plasma DBD: origem e mecanismos de ação.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Animais e princípios éticos	24
4.2	Dispositivo DBD	24
4.3	Procedimento cirúrgico	25
4.4	Tratamento das feridas com plasma DBD	26
4.5	Coletas de fragmentos e processamento histológico	26
4.6	Quantificação da área do tecido de granulação	26
4.7	Sistema de pontuação histológica.....	26
4.7.1	Reepitelização	27
4.7.2	Espessura epidérmica	27
4.7.3	Queratinização	27
4.7.4	Presença de tecido de granulação/remodelamento tecidual	27
4.8	Análise estatística	28
5	RESULTADOS	28
5.1	Microscopia do tecido de granulação.....	28
5.2	Escore histológico	31

6	DISCUSSÃO	32
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo e está em contato direto com o meio externo, constantemente suscetível às injúrias, atuando como barreira física, química e bacteriana. Uma ferida é caracterizada por uma descontinuidade no tecido cutâneo, podendo ser advinda de diversos fatores, como traumas ou condições patológicas específicas. O processo de cicatrização é composto por dois mecanismos principais: a regeneração, caracterizada pela substituição do tecido lesado por um novo, e o reparo tecidual, no qual haverá deposição de colágeno e formação de uma cicatriz. Três fases principais compõem este processo: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de remodelação (MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003; RUH et al., 2013).

A regulação dos mecanismos que culminam na cicatrização de feridas cutâneas é complexa, dependente de diversos fatores e tipos celulares que interagem entre si. A fase inflamatória é caracterizada pelo intenso influxo de células do sistema imune, principalmente neutrófilos, que irão produzir diversas citocinas pró-inflamatórias, exacerbando a resposta inflamatória, com curso de 48 a 72 horas. A próxima fase é a proliferativa, marcada pelos processos de fibroplasia, angiogênese e reepitelização, com objetivo de fechamento da lesão, durando em média 14 dias. A última fase é o remodelamento, onde haverá mudança na síntese e disposição colágeno, a fim de proporcionar força e resistência ao tecido, podendo se estender por anos (SORG et al., 2016).

Algumas feridas apresentam dificuldades para cicatrizar, não havendo progressão do processo natural de cura, entrando muitas vezes em uma condição de inflamação exacerbada, processo de cicatrização prolongado ou descoordenado (LEAL; CARVALHO, 2014). Nesse contexto, diversas terapias não invasivas vêm sendo desenvolvidas a fim de proporcionar qualidade e eficácia ao processo de cicatrização. Dentre elas, o plasma atmosférico à frio gerado em barreira dielétrica (DBD) tem gerado interesse como nova modalidade de terapia na dermatologia (GAN et al., 2020).

O plasma é constituído de um gás ionizado e é definido como o quarto estado da matéria. Ele é gerado a partir do lançamento de elétrons e fótons com energia suficiente sobre os átomos neutros e moléculas de fase gasosa. Essa interação dá origem às espécies carregadas. A geração do plasma por campo elétrico é bastante descrita e aceita e tem como uma das principais fontes de descarga a barreira dielétrica, permitindo ainda o uso de diversos gases, como hélio, argônio e ar atmosférico (DUBEY et al., 2022).

O uso terapêutico do plasma é baseado no conceito das espécies reativas, tendo como principal objetivo a resolução de problemas em tecidos biológicos, incluindo limpeza, cicatrização de feridas e o tratamento de tumores. O plasma possui potencial antimicrobiano, além de estimular fatores de crescimento essenciais para regular a angiogênese, reepitelização e contração da ferida, também agindo como quimiotático na migração de neutrófilos e monócitos para o local da ferida. As principais espécies geradas são as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), além da liberação de óxido nítrico (ON), importante na prevenção de infecções (NASRUDDIN et al., 2014).

Dessa forma, o uso da terapia com plasma atmosférico a frio (CAP) torna-se uma opção interessante e viável no tratamento de enfermidades dermatológicas por seus efeitos antimicrobianos, antiinflamatórios e pela capacidade de induzir a regeneração tecidual, apresentando boa aceitabilidade por partes dos pacientes e fácil aplicação (GAN et al., 2020). No entanto, apesar dos estudos apontarem o CAP como uma tecnologia promissora nas aplicações clínicas, novas pesquisas são necessárias para que as lacunas sobre sua segurança, eficácia e mecanismos de ação sejam preenchidas, proporcionando maior confiança para sua aplicação no âmbito das ciências médicas e biomédicas (IZADJOO et al., 2018).

Para isto, o presente trabalho utilizou como modelo experimental o porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*). A justificativa para a escolha é a semelhança entre a pele desses animais e a pele humana, levando em consideração que ambos possuem incapacidade de sintetização do ácido arcórbico (Vitamina C), fator que contribui de forma significativa para a síntese de colágeno (WILEY; SONS, 2004). Outro ponto importante é a escassez de trabalhos realizados com animais silvestres em situação de cativeiro e a resposta frente aos desafios de contaminação nestes ambientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do plasma atmosférico à frio na cicatrização de feridas agudas em porquinhos da índia (*Cavia porcellus*).

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar a área do tecido de granulação das feridas tratadas com plasma atmosférico frio;

- Avaliar a reepitelização, espessura epidérmica, queratinização e presença de tecido de granulação/ remodelamento tecidual nas feridas tratadas com plasma atmosférico frio;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomia e histologia da pele

A pele é responsável por recobrir a superfície do corpo, apresentando funções essenciais como proteção mecânica, barreira contra patógenos, regula a permeabilidade à água, termorregulação corporal, síntese de vitamina D, além de ser um órgão sensorial (MARTINES et al., 2020). Constitui-se de dois componentes principais de origens distintas: a epiderme, de origem ectodérmica, e derme, que possui origem mesodérmica. Essas camadas geralmente estão ligadas a um tecido conjuntivo frouxo, a tela subcutânea, também conhecida como hipoderme. A epiderme é composta de múltiplas camadas celulares e o estrato córneo, o que possibilita a proteção do organismo frente às injúrias externas, como atrito, agente químicos, além da desidratação e de microrganismos patogênicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

Além disso, pela presença de diversos vasos e das glândulas sudoríparas anexas, contribui para o processo de termorregulação e excreção de substâncias. A epiderme e a derme formam uma junção, onde as projeções da derme, as papilas dérmicas, se encaixam nas formações irregulares da epiderme, as cristas epidérmicas. Essa ligação torna-se importante frente às agressões mecânicas às quais a pele é constantemente submetida. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

A epiderme é a camada mais externa da pele, disposta sobre uma camada de tecido conectivo e é formada majoritariamente por queratinócitos, que são responsáveis pela formação do epitélio estratificado pavimentoso e a síntese de queratina que, ao migrar para a superfície, forma o estrato córneo, que age na promoção de firmeza e proteção, permite a permeabilidade e evita a desidratação (HUNTER; SAVIN; DAHL, 2002).

Além dos queratinócitos, diversos outros tipos celulares compõem a epiderme: os melanócitos são células que sintetizam a melanina, um pigmento que promove proteção contra os raios ultravioletas; as células de Langherans agem na ativação do sistema imunológico de forma similar aos macrófagos contra partículas estranhas e microrganismos; e as células ou discos de Merkel, situadas entre a epiderme e a derme, que atuam como receptores de tato e pressão ao se ligarem as terminações nervosas sensitivas. Essas células estão distribuídas pelas

camadas ou estratos da epiderme que são: o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso e o estrato córneo (BERNARDO; SANTOS; SILVA, 2019).

A camada basal é composta por células cubóides, basófilas, dispostas sobre uma membrana basal que se situa entre a epiderme e a derme. Esta camada possui células-tronco (*stem cells*) da epiderme que apresentam atividade mitótica, podendo também ser denominada germinativa. A camada espinhosa é formada por células com tonofilamentos de queratina em seu citoplasma, os quais se ligam às junções intercelulares do tipo desmossomos. Essa ligação é fundamental para manter a coesão e resistência das células ao atrito. Mais externamente, a camada granulosa compõe-se de células poligonais achatadas com citoplasma carregado de grânulos de querato-hialina, além dos grânulos lamelares que formam uma barreira lipídica, impedindo a entrada de substâncias e tornando a pele impermeável, evitando a desidratação. A camada lúcida não é visível em todas as regiões do corpo, tornando-se mais evidente em pele espessa, onde suas células não possuem núcleo, são compactadas e desprovidas de organelas citoplasmáticas; e por último, o estrato córneo, composto de células achatadas, mortas e sem núcleo, repletas de queratina, que promovem uma barreira de proteção e descamam de forma contínua (SILVA, SILVA; BLAZQUEZ, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

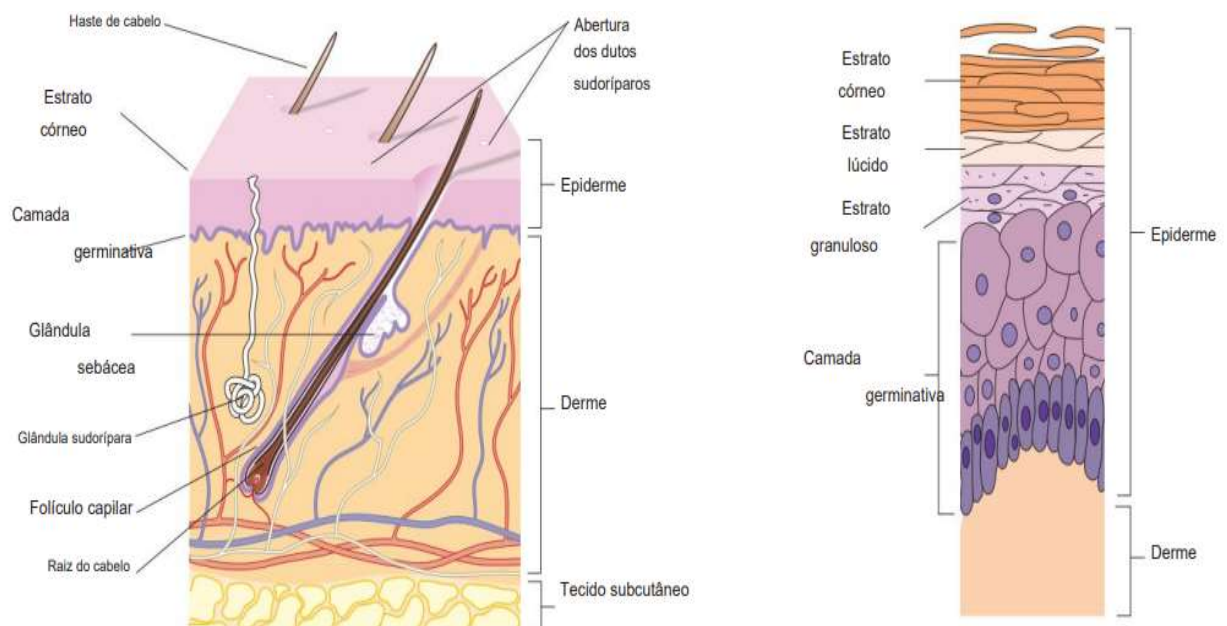


Figura 1. Epiderme e principais componentes da derme. Fonte: Mclafferty et al., 2012.

A derme está localizada abaixo da epiderme e sobre a camada subcutânea ou hipoderme, e possui a função de fornecer nutrientes e suporte estrutural à epiderme. A derme pode ser dividida em duas camadas: a derme papilar, mais superficial, e a derme reticular, mais profunda. A camada papilar é formada por tecido conjuntivo frouxo, dando origem às papilas dérmicas que ancoram a derme na epiderme, além de comportar nervos e vasos, responsáveis por nutrí-la. Já a camada reticular é constituída de tecido conjuntivo denso, com feixes de colágeno e fibras elásticas, que conferem a derme resistência e elasticidade. Contém ainda folículos pilosos, glândulas anexas (sebáceas e sudoríparas), vasos linfáticos, e terminações nervosas sensoriais. Outros tipos celulares que podem ser encontrados são: fibroblastos, células dendríticas dérmicas, mastócitos e macrófagos (MCLAFFERTY et al., 2012; MONTANARI, 2016).

A hipoderme ou tela subcutânea, é composta por tecido conjuntivo frouxo onde os adipócitos são as células em maior número. É responsável por promover o deslizamento da derme sobre as estruturas adjacentes, proteção contra o frio, atuando ainda como importante reserva energética. Quando o tecido adiposo se encontra mais desenvolvido, pode ser denominado ainda de panículo adiposo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023).

3.2 Cicatrização da pele

Uma lesão é originada por quaisquer estímulos que danifiquem a continuidade dos tecidos funcionais e pode ser causada por fatores externos ou internos, físicos, químicos, térmicos ou provenientes de condições patológicas específicas. Os eventos que culminam na regeneração e reparo tecidual ocorrem após o início de uma lesão. O processo de reparo culmina na substituição de componentes especializados pela deposição de colágeno, enquanto na regeneração ocorre o processo de proliferação e diferenciação celular através de células preexistentes ou células-tronco; ambos podem ocorrer de forma mútua (GONZALEZ et al., 2016).

Uma ferida ocorre quando há descontinuidade e perda da função normal e características morfológicas da pele. A cicatrização de feridas cutâneas conta com a ação conjunta de diversos tipos celulares e seus produtos, visando restaurar a integridade estrutural da camada epitelial, podendo também se estender ao tecido conjuntivo associado, que pode ou não estar envolvido no caso de uma ferida. O reparo de feridas comporta eventos celulares e bioquímicos e pode

ser dividido nas seguintes etapas: hemostasia, inflamação, proliferação ou granulação e remodelamento (GONZALEZ et al., 2016; DUBEY et al., 2022).

3.2.1 Hemostasia

Esta fase inicia assim que o dano pela ferida acontece, quando as células na borda da ferida são rompidas, assim como os vasos nas proximidades. É necessário que a hemorragia local cesse de forma imediata, o que é alcançado pela ativação e agregação plaquetária, culminando na formação de um coágulo composto por fibrina, que oblitera os vasos. O coágulo também age como ponto para ligação dos fatores de crescimento, que irão preceder diversos eventos importantes no processo de reparo como a angiogênese, inflamação e migração de tipos celulares como queratinócitos e fibroblastos (SHAW; MARTIN, 2009).

As próprias plaquetas são essenciais na manutenção do fator vascular e de um ambiente propício agindo na liberação de mediadores químicos como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), crescimento transformase- α e β (TGF- α , TGF - β), e fator de crescimento epidérmico (EGF); além de influenciar o aumento da permeabilidade e influxo de células e formação de matriz extracelular (SORG et al., 2016).

3.2.2 Fase inflamatória

Esta fase inicia logo após o sangramento ser controlado, levando ao aumento da inflamação. Neste momento, ocorre a migração de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, linfócitos e monócitos. Ocorre também a ativação de células do sistema imune que já fazem parte do tecido, como mastócitos e células de Langherans, levando a uma liberação de quimiocinas e citocinas. A migração das células inflamatórias é responsável pelos principais sinais da inflamação, incluindo o aparecimento de edema e eritema no local da ferida (SHAW; MARTIN, 2009; GONZALEZ et al, 2016).

Destaca-se o papel dos neutrófilos na limpeza de detritos celulares e destruição de microrganismos invasores através da produção de espécies reativas de oxigênio. Outras células inflamatórias também produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs). Somado a isso, os neutrófilos são responsáveis pela liberação de diversas citocinas e fatores de crescimento, como IL-17 e VEGF, agindo como quimiotáticos para outras células

inflamatórias, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (LAROCHE et al., 2018; DUBEY et al, 2022).

Decorridos dois dias (48h), a chegada de monócitos no tecido aumenta, amadurecendo posteriormente em macrófagos, que podem ser de dois tipos: M1, que são pró-inflamatórios e M2, anti-inflamatórios. São responsáveis pela eliminação de células apoptóticas e liberação de fatores de crescimento, que estimulam o processo de reparo tecidual (fator de crescimento de fibroblastos [FGF]-2); PDGF e VEGF), e de fatores inflamatórios, como as citocinas (IL-1). À medida que contribuem para a resolução da inflamação, os macrófagos adquirem um caráter reparador que promove a regeneração tecidual através da estimulação do queratinócitos, da angiogênese e de fibroblastos (GUO; DIPIETRO, 2010; LAROCHE et al., 2018)

Outra célula que possui papel fundamental nesta fase é o mastócito, célula do sistema imune que reside no tecido cutâneo. Os mastócitos degranulam e liberam grande variedade de substâncias vasoativas e pró-inflamatórias como histamina, serotonina, fator de necrose tumoral (TNF), VEGF, IL-6, IL-8, cininas e proteases. Somada a ação durante a fase inflamatória, os mastócitos possuem relevância na fase proliferativa através da interação com os fibroblastos, favorecendo a síntese de colágeno (KOMI; KHOMTCHOUK; SANTA MARIA, 2020).

3.2.3 Fase proliferativa

Esta fase é iniciada nas primeiras 48 horas, onde os principais objetivos são o fechamento completo da ferida e, conseqüentemente, reposição do tecido danificado. Para isso, os eventos que ocorrem durante esta fase incluem a fibroplasia, a angiogênese e a reepitelização, podendo perdurar de duas a três semanas (GONZALEZ et al., 2016). A reepitelização tem como principal objetivo o restabelecimento das funções da epiderme que foram perdidas, devendo ocorrer a reestruturação dos estratos de queratinócitos, que se multiplicam e se diferenciam durante esse processo (OLIVEIRA, 2019).

A fibroplasia é marcada pela migração e proliferação de fibroblastos e a síntese de componentes da matriz extracelular. Esses eventos são regulados pela liberação de substâncias quimioatraentes como EGF e o PDGF, enquanto o PDGF e TGF- β promovem a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, adquirindo a capacidade de contração e expansão, movimentando-se sobre a ferida. Durante esse processo ocorre a deposição de fibronectina e, posteriormente, de colágeno. Os fibroblastos são ainda responsáveis pela secreção de proteoglicanos, fibronectina, elastina e laminina (ISAAC et al., 2010).

O colágeno do tipo III está em maior quantidade em uma ferida, localizado predominantemente na derme papilar. Os miofibroblastos se ligam às fibras de colágeno de maior espessura, puxando-as em sua direção, sendo este evento determinante para que haja a contração da ferida e é estimulado por TGF- β e PDGF (GORDON, 2016). Ocorrendo de maneira simultânea a esses eventos, novos vasos são formados, determinando a angiogênese. Células endoteliais migram para o local da ferida tendo como principais fatores que estimulam esse processo o VEGF, FGF e o TGF- β . Os vasos neoformados são característicos do tecido de granulação, nutrindo e oxigenando o tecido que está em crescimento. Além disso, o endotélio está envolvido na síntese de PDGF, TNF- β e FGF (ISAAC et al., 2010; GONZALEZ et al., 2016).

3.2.4 Fase de remodelação

Esta fase se inicia de duas a três semanas após a injúria tecidual e pode durar por anos. Seu principal objetivo é obter a reorganização do tecido lesado e maior resistência, utilizando de mecanismos de degradação e ressíntese da matriz extracelular. Neste momento, há a mudança do tipo de colágeno e de sua disposição. Na ferida, o colágeno do tipo III é o mais abundante, enquanto o colágeno do tipo I é menos sintetizado; nesta fase ocorre uma inversão do padrão de síntese, havendo a degradação do tipo III, enquanto o colágeno do tipo I tem sua síntese aumentada pelos fibroblastos. Concomitantemente a essa substituição, sua disposição e organização também é alterada, onde suas fibras deixam de ser dispostas aleatoriamente para se entrelaçarem (ISAAC et al., 2010).

3.3 Plasma à frio gerado por barreira dielétrica (DBD)

3.2.1 Plasma DBD: origem e mecanismos de ação

Na física, “plasma” é utilizado para denominar um gás eletricamente condutor, constituído por partículas parcialmente carregadas de íons e elétrons que expressam comportamento coletivo. A geração do plasma inicia-se com o lançamento de elétrons e fótons com energia suficiente sobre os átomos neutros e moléculas de fase gasosa. Essa interação dá origem às espécies carregadas. Sua primeira identificação foi em 1879 pelo físico inglês William Crookes como um novo estado da matéria e em 1929 o cientista americano Irving Langmuir utilizou o termo “plasma” para caracterizar um gás ionizado. A partir de suas características, o plasma é considerado o quarto estado da matéria e apresenta-se como o estado mais abundante,

constituindo cerca de 99% do universo (ALVES; PINHEIRO; RIBEIRO, 2019; DUBEY et al., 2022).

A depender das necessidades de aplicação, diversos tipos de plasmas podem ser gerados sob condições diferentes, sendo que a característica de maior importância é a pressão do gás. Quando o gás é submetido a uma temperatura específica, a pressão é responsável por definir a densidade total das partículas contidas no gás e a probabilidade de colisões mútuas entre partículas, que nada mais é que a frequência de colisão. A pressão e a frequência de colisão são grandezas diretamente proporcionais, ou seja, à medida que uma se eleva, a outra também, fazendo com que aumente a probabilidade de que as partículas cheguem a um estado de equilíbrio energético de estado estacionário (BÁRDOS; BARÁNKOVÁ, 2010).

Os gases que podem ser utilizados para impulsionar a ação do plasma são: hélio, argônio, oxigênio, nitrogênio, o ar ambiente, dentre outros gases estáveis. A interação entre os elétrons que compõem o plasma e as partículas de oxigênio e nitrogênio do meio geram as EROs, que são alguns dos principais responsáveis por seu mecanismo de ação (ALVES JUNIOR, 2020).

De maneira geral, o plasma pode ser classificado em dois tipos principais: plasma natural e plasma de laboratório. O plasma natural é encontrado em grandes quantidades em todos o universo, a exemplo da aurora boreal. Já os plasmas de laboratório ou artificiais são gerados a partir de eventos não naturais, podendo ser classificados em plasmas físicos (fusão termonuclear), plasmas térmicos (altas temperaturas) e plasmas frios (temperatura ambiente). O método utilizado para produção do plasma depende do tipo de plasma que se deseja obter. Uma alta tensão de maneira pulsada é o método mais comumente utilizado para obtenção de plasmas térmicos e frios (NASCIMENTO NETO, 2014).

O plasma atmosférico à frio (CAP) pode ser utilizado para diversos fins como a esterilização de superfícies e materiais (principalmente termosensíveis), controle da poluição do ar, alterações de superfícies e aplicações biomédicas, com objetivo de promover inativação microbiana, coagulação sanguínea, descontaminação de instrumentos médicos, aplicações odontológicas e na cicatrização de feridas (ALVES; PINHEIRO; RIBEIRO, 2019). Os métodos para obtenção desse tipo de plasmas são: jatos de plasma à pressão, onde o gás é estimulado em uma câmara cercada de eletrodos energizados que irão produzir o plasma; plasma de microdescarga, com milhões de minúsculas descargas elétricas individuais são reunidas em uma área; e a descarga por barreira dielétrica (IZADJOO et al., 2018).

Quando uma alta tensão de maneira pulsada é empregada entre dois eletrodos metálicos, principalmente se um dielétrico for disposto entre eles, é obtido o plasma de descarga em barreira dielétrica (DBD). Ocorre um acúmulo de microdescargas sobre a superfície do dielétrico, rompendo a rigidez do gás e do próprio dielétrico, gerando microdescargas aleatórias entre os eletrodos, ionizando o gás e gerando o plasma (MENG et al., 2017).

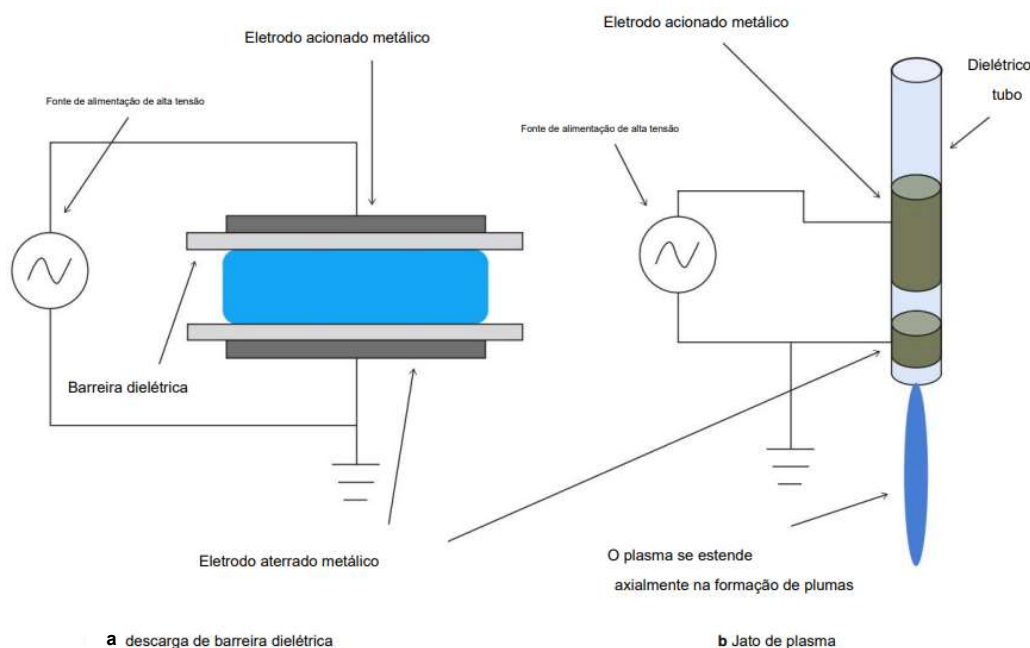


Figura 2. Principais configurações de fontes de plasma frio à pressão atmosférica: (a) descarga por barreira dielétrica; (b) jato de plasma frio. AT - Alta tensão. Fonte: Oconnor et al. (2014).

3.2.2 Plasma DBD na cicatrização de feridas

Há relatos do uso do plasma na medicina desde 1914, em publicações feitas por Jacques-Arsene d'Arsanval sobre o dispositivo que, posteriormente, passou por análises e confirmou-se ser bastante eficaz na erradicação de microrganismos, além de biofilmes microbianos, crescimento de fungos e vírus quando aplicado em feridas abertas. Em feridas, também são descritos efeitos sobre a regeneração tecidual por meio do aumento da microcirculação cutânea, estimulação de células do sistema imune e aumento da proliferação de queratinócitos (HOFFMANN; BERGANZA; ZHANG, 2013).

O plasma frio engloba uma gama de componentes biologicamente ativos, partículas carregadas, radiação ultravioleta e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo essas últimas consideradas os principais agentes responsáveis pelos efeitos produzidos por esta

terapia. No que diz respeito a inativação das bactérias, se dá por meio de um mecanismo físico, que ocorre pelos efeitos dos radicais livres e espécies reativas, e o mecanismo biológico é desencadeado por eventos celulares que causam danos a membrana celular e seu DNA. As ERONs são capazes de atingir a cápsula externa das bactérias, causando a exposição de sua membrana celular. Essas espécies têm em sua composição moléculas reativas (óxido nítrico - NO, Peróxido de Hidrogênio - H₂O₂, ozônio - O₃, NO₂, entre outras), que são capazes de penetrar nas células e causar danos ao DNA (OCONNOR et al., 2014).

Além disso, diversos outros efeitos são produzidos pela geração do plasma, o que inclui sinalização para fatores de crescimento, regulação do metabolismo, efeito antioxidantes, promove coagulação sanguínea, angiogênese, estimula e regula respostas imunes e inflamatórias, age na síntese de colágeno, diminuição do pH, regula a expressão de interleucinas (IL-8), ativação de integrinas, dentre outros fatores que contribuem diretamente para a melhoria e rapidez do processo de cicatrização de feridas (DAESCHLEIN et al., 2012; LENDECKEL et al., 2015).

Assim, diversos estudos vêm sendo realizados a fim de padronizar seus parâmetros a depender do resultado que se espera. Típa e Kroesen (2011) utilizaram em seu estudo utilizaram o jato de plasma a uma frequência de 13,56MHz. Para isso, foi escolhido o gás foi o hélio numa taxa de fluxo de 1L /min e voltagem aplicada a ferida foi de 200-400V. Assim, os autores relataram os efeitos do CAP na desinfecção das feridas e contribuindo positivamente também no processo de reparo tecidual.

Daeschlein et al. (2012) utilizaram o gás argônio com fluxo de 8L/min, para verificar o efeito de três fontes diferentes de plasma (jato de plasma pulsado e não pulsado e o DBD), na ponta dos dedos de indivíduos voluntários no estudo, com uma tensão de 1-5 kV, frequência de 1,5 MHz e tempo de 3 a 240 segundos, a 12 mm de distância. Ao final, concluíram que o plasma foi bem aceito e tolerado pelos indivíduos.

Nasruddin et al (2014) utilizou o CAP em seu estudo com camundongos. Para isso, foi empregada uma alta tensão de baixa frequência (20 kHz), com uma tensão pico a pico de 25 kV; foram aplicados dois eletrodos de anel quando gás argônio comercial (99,995% de pureza) a uma vazão de 5 slm. Ao final, concluíram que o plasma frio acelerou a cicatrização da ferida através da modificação da reepitelização, o estágio final da inflamação e da contração da ferida, não pelo efeito de suas espécies reativas, mas também pelo aquecimento gerado em sua produção. Dessa forma, apesar dos estudos

mostrarem-se promissores quanto ao uso do CAP na cicatrização de feridas, ainda existem lacunas a serem preenchidas que ofereçam segurança para seu uso e eficiência no processo de cicatrização de feridas.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Animais e princípios éticos

Para as avaliações foram utilizados 22 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 os experimentos, com água e ração *ad libitum*. A aprovação para realização desse experimento foi obtida junto a Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UFERSA (parecer nº 33/2020) e foram obedecidas às diretrizes nacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório (CONCEA, 2019).

Os 22 animais foram submetidos ao protocolo cirúrgico (abaixo descrito) no qual em cada animal foram realizadas 3 incisões circulares (uma direcionada para o tratamento controle e duas direcionadas para o tratamento de plasma). Assim, o presente estudo foi dividido em 3 dias de eutanásias para coleta de amostras: 7 dias (n=4), 14 dias (n=6) e 21 dias (n=12); n (número de animais eutanasiados). Para cada dia de avaliação

4.2 Dispositivo DBD

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/min e potência de 2,4 W.

4.3 Procedimento cirúrgico

Inicialmente, os animais 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) por via subcutânea (SC) para garantir analgesia (MACEDO et al., 2015).

Após 15 minutos, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular 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. Em seguida, realizada tricotomia, subsequente antisepsia com álcool iodado a 2% e administração de lidocaína (2 mg/kg) por via subcutânea na região, para garantir o bloqueio local.

Após a tricotomia, foram realizadas três incisões circulares na pele do dorso. Realizou-se a incisão com um punch de 4mm de diâmetro. Após o procedimento cirúrgico os animais receberam tramadol (3 mg/kg) por via SC a cada 24 horas, durante 3 dias.

Após o procedimento, os animais foram divididos conforme descrição anterior, sendo que todas as feridas foram fotografadas a partir do dia 0 (dia da cirurgia). Dessa forma, duas das feridas receberam tratamento com o plasma a frio com frequência de 10 Hz, enquanto terceira ferida recebeu apenas os cuidados de assepsia e limpeza diários com solução salina 0,9% estéril, caracterizando-se como o controle.

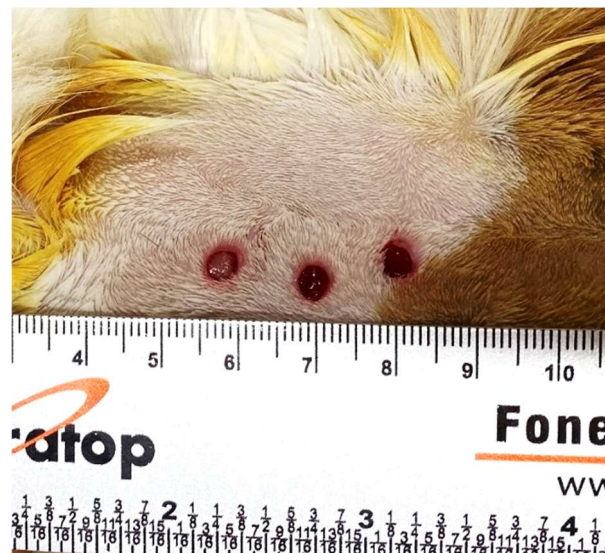


Figura 3. Confeção das feridas experimentais em porquinhos-da-índia.

Fonte: Arquivo pessoal (2022).

4.4 Tratamento das feridas com plasma DBD

No tratamento de CAP foi realizado um jateamento de gás hélio durante um minuto e uma distância de 3mm entre a ponta do bocal e a superfície a ser tratada, na frequência de 10 Hz por um minuto em cada ferida. As radiações foram feitas imediatamente após a cirurgia e a cada 24 horas, por três dias consecutivos (HUSSNI, 2010; WOEDTKE; METELMANN; WELTMANN, 2014).

4.5 Coleta dos fragmentos e processamento histológico

A avaliação histológica foi realizada a partir de amostras das feridas obtidas nos dias 7, 14 e 21, conforme explicação anterior. No momento da coleta os animais foram submetidos novamente ao protocolo anestésico com xilazina e cetamina. Os animais tiveram o plano anestésico aprofundado e em seguida realizou-se a eutanásia utilizando Cloreto de Potássio (19,1%), 2 mL, por via intracardiaca. Cada ferida foi removida em fragmento circular com punch de 8mm e fixada em paraformaldeído a 4% por 24h.

Após fixação, as amostras foram desidratadas utilizando concentrações crescentes de etanol, submetidas à diafanização em xilol e inclusão em parafina. Em seguida, secções seriadas de 5µm foram obtidas em micrótomo. Parte das secções foram coradas com hematoxilina e eosina para análise do tecido de granulação das feridas, comparando com o tecido original.

4.6 Quantificação da área do tecido de granulação

Para determinar a área do tecido de granulação nas amostras, foi realizada a seguinte metodologia: foram fotomicrografadas as secções histológicas nos quais se identificaram as feridas, utilizando a objetiva de 4x. Essas imagens foram analisadas com o auxílio do software Image Pro Plus® versão 4.5, aplicando a medição direta da área da lesão sobre cada imagem. Os valores de área obtidos foram avaliados e comparados estatisticamente.

4.7 Sistema de pontuação histológica

Para a determinação dos ESCORES histológicos foram adotadas a metodologia de Vyver et al. (2021) seguido das seguintes adaptações: os parâmetros avaliados no presente estudo foram reepitelização, espessura epidérmica, queratinização, presença de tecido de granulação/ remodelamento tecidual. Cada parâmetro foi avaliado a partir de fotomicrografias obtidas de lâminas histológicas das feridas. Essa avaliação foi realizada às cegas e por dois

observadores independentes. A contribuição de cada parâmetro no escore total foi de 25%. Os dados foram analisados seguindo a somatória dos scores de cada parâmetro.

4.7.1. Reepitelização

Para o parâmetro de reepitelização foram adotadas as seguintes classificações na forma de score (pontos): completa (3 pontos, quando a reepitelização foi de 95% a 100%), parcial (2 pontos, quando a reepitelização foi maior que 0% e menor que 95%) e nenhuma (1 ponto, quando não houve reepitelização).

4.7.2. Espessura epidérmica

Para o parâmetro de espessura epidérmica foram adotadas as seguintes classificações na forma de score (pontos): normal (3 pontos, quando a epiderme se encontrava em uma espessura de 95% a 105%); hipertrofia (2 pontos, quando a epiderme apresentava uma espessura superior a 105%) e hipoplasia (1 ponto, quando a epiderme apresentava uma espessura inferior a 95%). Este parâmetro foi realizado apenas em tecidos cuja reepitelização foi completa.

4.7.3. Queratinização

Para o parâmetro de queratinização foram adotadas as seguintes classificações na forma de score (pontos): sim (3 pontos, quando há camadas frouxamente anexadas/perdidas OU paraqueratótico espesso ou estrato córneo) e não (1 ponto, quando não há nada de queratinização). Este parâmetro foi realizado apenas em tecidos cuja a reepitelização foi completa.

4.7.4. Presença de tecido de granulação/remodelamento tecidual

Para o parâmetro de presença de tecido de granulação/remodelamento tecidual foram adotados as seguintes classificações na forma de score (pontos): intacta (3 pontos, quando não há tecido de granulação devido ao completo remodelamento tecidual, sem infiltrados granulares, ou seja, quando os seguintes parâmetros forem visíveis dentro área da ferida: derme, apêndices da pele e panículo carnosos), presente (2 pontos, quando há tecido de granulação caracterizado pela presença de infiltrados granulares, mas de forma homogênea, ou seja, quando os seguintes parâmetros forem visíveis dentro área da ferida: deposição de colágeno e derme)

e ausente (1 ponto, quando há tecido de granulação caracterizado pela presença de infiltrados granulares, mas este não é homogêneo, apresentando regiões de ausência tecidual).

4.8 Análise estatística

Os dados serão digitados em planilha eletrônica e avaliados através do programa GraphPad Prism (versão 5), dos quais serão expressos em valores de média, desvio padrão, mínimos, máximos, frequência simples e porcentagem. Após averiguação dos pressupostos paramétricos. Para comparação dos resultados entre os grupos experimentais, o teste paramétrico t-Student ou não-paramétrico de Mann-Whitney será realizado, de acordo com as características de cada uma das variáveis. As diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS.

5. Microscopia do tecido de granulação

Em relação a análise microscópica das feridas, foi possível observar de maneira qualitativa uma melhor cicatrização das feridas tratadas com CAP em comparação ao grupo controle, principalmente nos dias 14 e 21. Foi evidenciado ainda uma diminuição do tecido de granulação no grupo tratado com CAP ao longo do processo de cicatrização. No que diz respeito a queratinização, mais especificamente o estrato córneo, este encontrava-se mais espesso no grupo tratado com CAP do que no grupo controle nos dias 14 e 21.

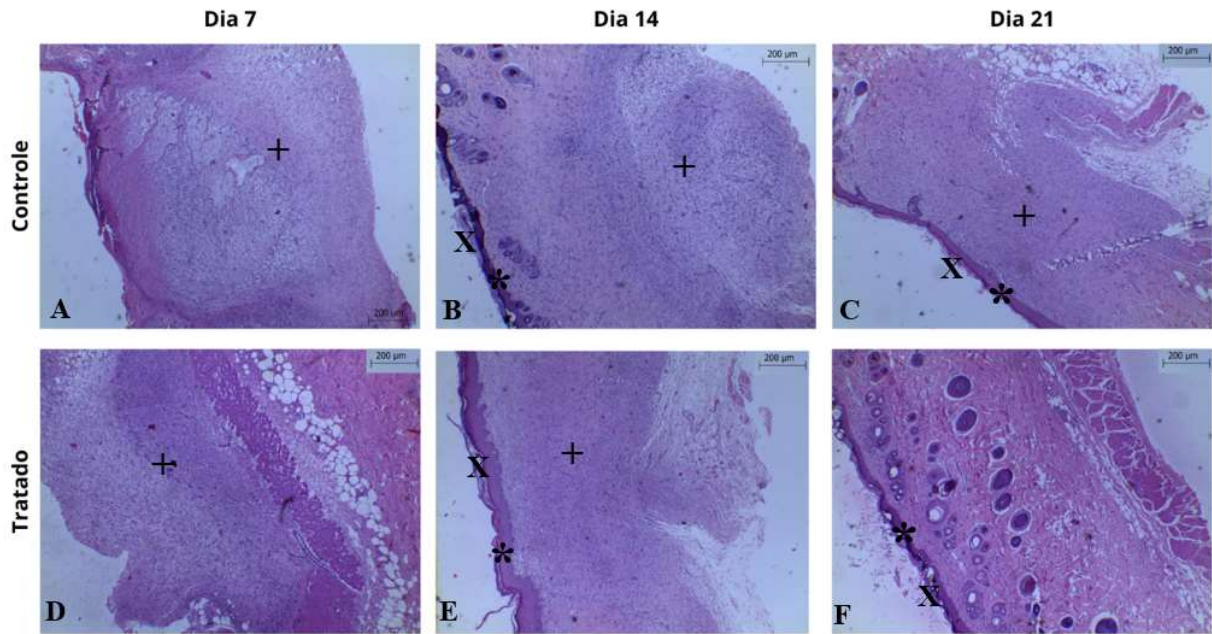


Figura 4 – Fotomicrografias das feridas cutâneas de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) tratados por CAP. A, B e C – Ferida sem tratamento nos dias 7, 14 e 21, respectivamente. D, E e F – Feridas tratadas com CAP nos dias 7, 14 e 21, respectivamente. * Epiderme; + tecido de granulação; X – estrato córneo.

Na avaliação quantitativa da área de tecido de granulação, observou-se que o tratamento de CAP foi capaz de reduzir significativamente o tecido de granulação nos dias 14 e 21 do processo de cicatrização, quando comparadas a ferida sem tratamento (Figura 5). Somado a isso, foi possível observar a redução do tecido de granulação das feridas controle e tratamento ao longo do processo de cicatrização (Figura 6).

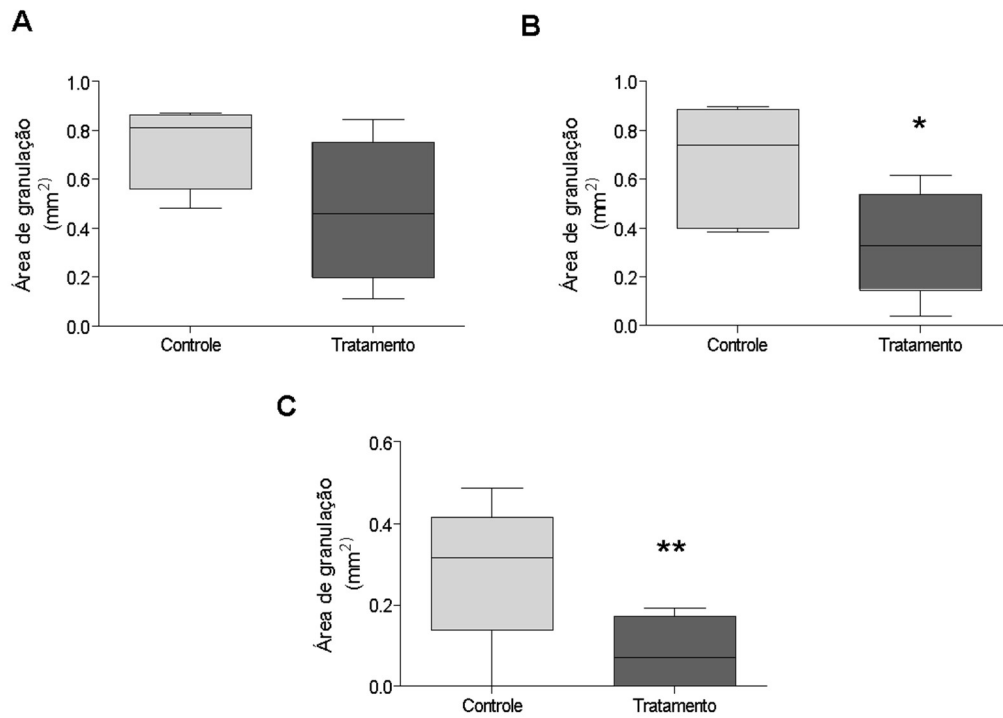


Figura 5: Análise da área do tecido de granulação das feridas experimentais. Análise da área de tecido de granulação após (A) sete, (B) quatorze e (C) vinte e um dias do procedimento cirúrgico nas incisões do grupo controle ou tratamento com plasma. Valores expressos como média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (Teste T-Student).

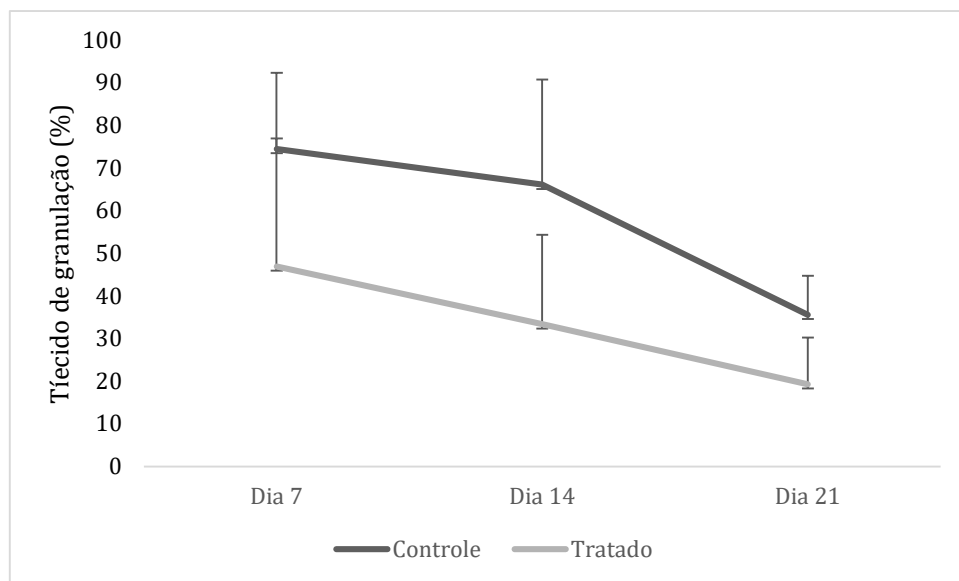


Figura 6. Curva de avaliação da redução do tecido de granulação em feridas agudas de porquinhos-da-índia. É possível observar a curva de redução do tecido de granulação das feridas controle e tratadas ao longo do processo de cicatrização.

5.2 Escore histológico

Quanto à avaliação pelo estabelecimento de escores dos parâmetros reepitelização, espessura epidérmica, queratinização e presença de tecido de granulação/remodelamento tecidual, verificou-se: para a reepitelização, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratamento nos dias avaliados. Em relação a espessura epidérmica, houve tendência a uma diminuição da espessura da epiderme no grupo tratado com CAP, assim como observou-se tendência a maior queratinização neste mesmo grupo, entretanto para ambos os parâmetros não houve diferença estatística; para o parâmetro de presença de tecido de granulação/remodelamento tecidual, não foram observadas diferenças significativas nos dias avaliados (Figura 7).

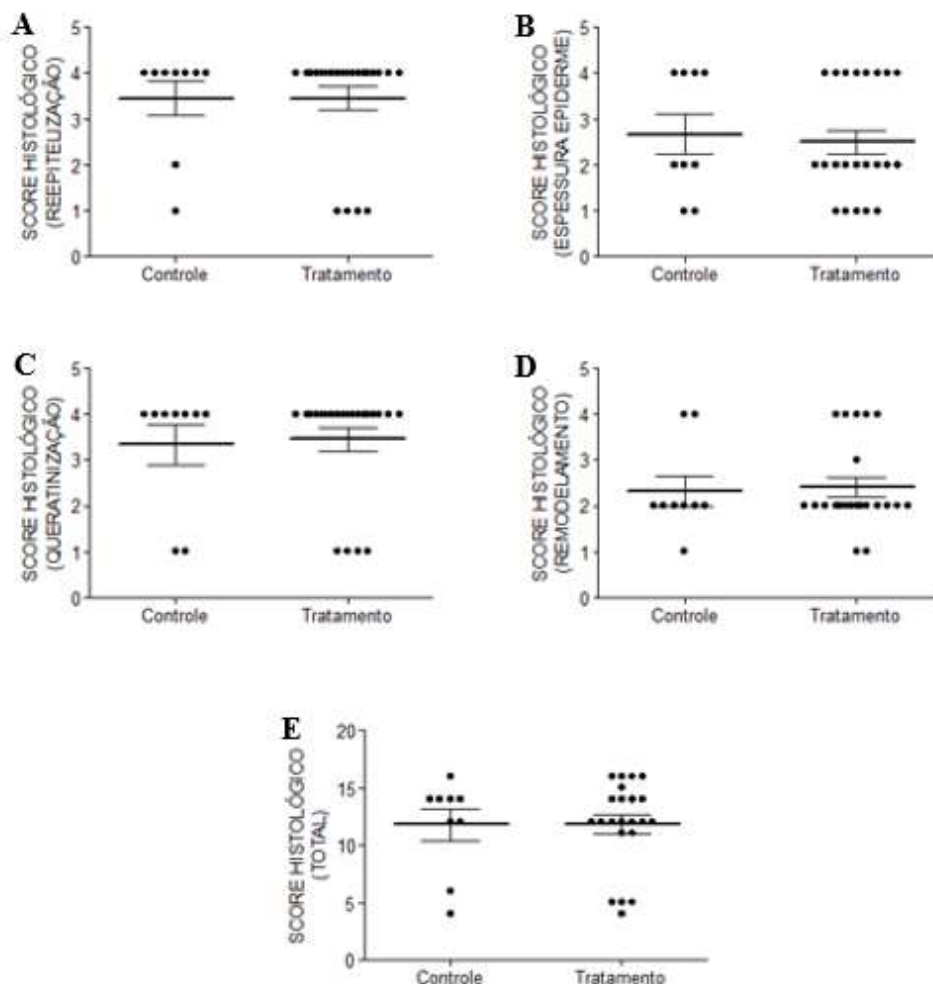


Figura 7. Parâmetros avaliativos das feridas agudas de porquinhos-da-índia tratadas com CAP. (A) reepitelização; (B) espessura epidérmica; (C) queratinização; (D) remodelamento e (E) score total.

6 DISCUSSÃO

O tratamento com o plasma atmosférico a frio gerado por barreira dielétrica foi capaz de acelerar a cicatrização nas feridas tratadas, sendo evidenciado pela diminuição da área do tecido de granulação nos dias 14 e 21 do processo de cicatrização, além da tendência a diminuição da espessura epidérmica e aumento da queratinização no grupo tratado com o CAP, em comparação ao grupo controle.

O tecido de granulação, presente na fase proliferativa da cicatrização, é constituído por vasos neoformados, tecido conjuntivo, fibroblastos e células inflamatórias. Dessa forma, a redução do tecido de granulação no tecido tratado com o CAP no presente estudo pode ser explicada pelo fato das ERONs produzidas orquestrarem e regularem a formação de vasos sanguíneos, induzindo a proliferação do tecido endotelial; além disso, essas espécies reativas promovem a fibroplasia. Outro mecanismo seria pela ação do ON que também age na síntese de fatores de crescimento, promovendo a angiogênese, além de ser importante na reepitelização, remodelamento e contração da ferida (DUNNILL et al., 2015; DUBEY et al., 2022). Resultados semelhantes foram descritos por Kubinova et al. (2017), onde os autores sugerem uma diminuição do tecido de granulação no dia 7 da avaliação, contribuindo no processo de contração e reepitelização da ferida.

Outro fator importante é que o CAP age na regulação das fases de hemostasia e inflamação da cicatrização. No presente estudo o plasma foi aplicado nas primeiras 72 horas, que compreende essas fases do reparo tecidual. Durante a fase inicial do processo, as espécies reativas e radicais livres são responsáveis pela formação de trombos e pela sinalização para migração de células do sistema imune, como neutrófilos e monócitos. Como já descrito anteriormente, essas células são essenciais na regulação da inflamação, limpeza da ferida e de restos celulares, atuando como quimiotáticas para outras células e na liberação de fatores de crescimento, contribuindo para resolução mais rápida da inflamação (ZOROV; JUHASZOVA; SOLLITT, 2014). Em um estudo realizado por Nasruddin et al. (2014), observou-se que, aos 7 dias após a lesão, havia menos macrófagos e neutrófilos no grupo experimental que no controle, sugerindo que houve uma aceleração da fase inflamatória no grupo tratado com o plasma.

Somado a isto, é possível destacar a ação antimicrobiana do CAP, a qual também contribui para redução da inflamação durante o reparo tecidual. Essa ação ocorre por meio de

estímulos físicos e biológicos da ERON's sobre a membrana celular e o DNA. Além disso, o ozônio, que também é produzido durante a geração do CAP, possui efeitos antissépticos, imunomoduladores e antioxidantes conhecidos e discutidos na literatura (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al., 2005). Não foram observados sinais de contaminação nas feridas tratadas com CAP no presente estudo.

A aplicação do CAP também é capaz de induzir a proliferação e migração de queratinócitos através da regulação da síntese do fator de crescimento de queratinócitos (KGF), mediada pelas ERONs, contribuindo para o restabelecimento das camadas da epiderme (STALLMEYER et al., 1999; WITTE; BARBUL, 2002). Isso pode justificar a tendência para maior queratinização observada nos animais do grupo tratado com CAP no presente estudo, apesar de não haver uma diferença estatisticamente significativa. Nastuta et al. (2011), em um experimento com ratos em que comparava o efeito da aplicação do plasma na ferida ao seu controle e do plasma aplicado a um curativo de poliuretano e seu controle, relatou que o tratamento com o plasma, utilizando o gás hélio, foi capaz de produzir espécies reativas dentro do tecido vivo, promovendo aumento da proliferação de fibroblastos e queratinócitos, diminuição da inflamação e melhorando a reepitelização.

No que diz respeito aos dados obtidos na avaliação por meio do escore histológico, já discutidos acima, pode-se supor que o aumento utilizado nas fotomicrografias que foram disponibilizadas não seria o ideal para avaliação de alguns parâmetros, podendo ter interferido diretamente nos resultados encontrados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A terapia com o plasma atmosférico à frio foi capaz de acelerar o processo de cicatrização de feridas em porquinhos-da-índia, bem como concedeu qualidade ao processo. O CAP apresenta-se como uma terapia promissora na área, porém ainda são necessários mais estudos que possam consolidar seu uso nas diferentes espécies. O fato do modelo experimental escolhido no presente estudo ser um animal silvestre em condição de cativeiro e estar mais propenso a complicações por contaminações e infecções também abre uma gama de possibilidades para o uso terapia plasmática como uma das abordagens possíveis.

REFERÊNCIAS

- 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. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 5, n. 4, p. 3914-3919, 2019.
- ALVES JUNIOR, C. Plasma frio atmosférico – novas oportunidades de pesquisa numa plataforma versátil e portadora de futuro. **Matéria (Rio de Janeiro)**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 1-7, 2020.
- BÁRDOS, L.; BARÁNKOVÁ, H. Cold atmospheric plasma: sources, processes, and applications. **Thin Solid Films**, [S.L.], v. 518, n. 23, p. 6705-6713, set. 2010.
- BERNARDO, Ana Flávia Cunha; SANTOS, Kamila dos; SILVA, Débora Parreiras da. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em foco**, v. 1, n. 11, p. 1221-33, 2019.
- DAESCHLEIN, G. et al. Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. **Journal of Hospital Infection**. v. 81, p. 177-183, 2012.
- DUBEY, S. K. et al. Cold atmospheric plasma therapy in wound healing. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 112, p. 112-123, jan. 2022.
- DUNNILL, C. et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ros and emerging ros :modulating technologies for augmentation of the healing process. **International Wound Journal**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 89-96, 21 dez. 2015.
- GAN, L. et al. Cold atmospheric plasma applications in dermatology: a systematic review. **Journal Of Biophotonics**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 1-16, 21 dez. 2020.
- GONZALEZ, Ana Cristina de Oliveira *et al.* Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 91, n. 5, p. 614-620, out. 2016.
- GORDON, S. Phagocytosis: an immunobiologic process. **Immuni.**, v. 44, p.463-476, 2016.
- «Guinea Pig». Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. **Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics and Proteomics** 15 de julho de 2004.

GUO, S.; DIPIETRO, L.A.. Factors Affecting Wound Healing. **Journal Of Dental Research**, [S.L.], v. 89, n. 3, p. 219-229, 5 fev. 2010.

HOFFMANN, C.; BERGANZA, C.; ZHANG, J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. **Medical Gas Research**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 21, 2013.

HUNTER, J. A. A.; SAVIN, J. A.; DAHL, M. V. Sebaceous and sweat gland disorder. **Clinical Dermatology**. 3rd ed. PLACE: Blackwell Scientific Publication, p. 157-242, 2002.

HUSSNI, C. A et al. 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. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med (São Paulo)**, v. 89, n.3/4, p. 125-31, 2010.

IZADJOO, M. et al. Medical applications of cold atmospheric plasma: state of the Science. **Journal of Wound Care North American**, v. 27, n. 9, 2018.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**; autor-coordenador Paulo Abrahamsohn. - 14. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

KOMI, D. E. A.; KHOMTCHOUK, K.; SANTA MARIA, P. L. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v.58, p.298–312, 2020.

KUBINOVA, S. et al. Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats. **Scientific Reports**. v. 7, 2017.

LAROUCHE, J. et al. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v.7, n. 7, p.209-231, 2018.

LEAL, E.; CARVALHO, E. Cicatrização de feridas: o fisiológico e o patológico. **Revista Portuguesa de Diabetes**. v. 9, n. 3, p. 133-143, 2014.

LENDECKEL, D. et al. Proteomic changes of tissue-tolerable plasma treated airway epithelial cells and their relation to wound healing. **BioMed Res Int**, v. 2015, p.1–17, 2015.

MACEDO, A.S. et al. Tibial osteosynthesis in a guinea pig (*Cavia porcellus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.67 n.1, 2015.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. E. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - parte i. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 78, n. 4, p. 393-408, ago. 2003.

MARTINES, E. et al. Wound healing improvement in large animals using an indirect helium plasma treatment, **Clinical Plasma Medicine**, v.17, n.18, 2020.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. **European Journal of Pharmacology**, v.523, p.151–161, 2005.

MCLAFFERTY, E. et al. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. **Nursing Standard**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 35-42, 19 set. 2012.

MENG, Y. et al. Enhancement of germination and seedling growth of wheat seed using dielectric barrier discharge plasma with various gas sources. **Plasma Chemistry and Plasma Processing**, Tallahassee, v. 37, p.1105–1119, 2017.

MONTANARI, T. **Histologia**: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 3.ed. Porto Alegre: Ed. da autora, 2016.

NASCIMENTO NETO, A. B. **Desenho e Construção de um protótipo gerador de jato de plasma frio a pressão atmosférica para aplicações biomédicas**. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Materiais; Projetos Mecânicos; Termociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

NASRUDDIN et al. Cold plasma on full-thickness cutaneous wound accelerates healing through promoting inflammation, re-epithelialization and wound contraction. **Clinical Plasma Medicine**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 28-35, jul. 2014.

NASTUTA, A. V. et al. Stimulation of wound healing by helium atmospheric pressure plasma treatment. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.44, n.10, 2011.

O'CONNOR, N. et al. Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? **Journal Of Hospital Infection**, [S.L.], v. 88, n. 2, p. 59-65, out. 2014.

OLIVEIRA, L. P. **Efeito do laser de baixa potência em doses crescentes no processo de cicatrização cutânea em ratos**. 2019. 53f. Dissertação (Programa de pós graduação em ciências animais). Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Goiânia, 2019.

RUH, A. C. *et al.*. Inflamação: entre a regeneração e a cicatrização. **Publicatio Uepg: Ciências Biológicas e da Saude**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 11-19, 2013.

SHAW, T. J.; MARTIN, P.. Wound repair at a glance. **Journal Of Cell Science**, [S.L.], v. 122, n. 18, p. 3209-3213, 15 set. 2009.

SILVA, A. P.; SILVA, E. A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.. Processo de Queratinização no Desenvolvimento do Sistema Tegumentar em Mamíferos: Revisão. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 2, p. 201-207, 2008.

SORG, H. *et al.* Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **Eur Surg Res.**, v.58, n. 1-2, p. 81-94, 2017.

STALLMEYER, B. *et al.* The Function of Nitric Oxide in Wound Repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. **Journal Of Investigative Dermatology**, [S.L.], v. 113, n. 6, p. 1090-1098, dez. 1999.

TIPA, R. S.; KROESEN, G. M.W. Plasma-Stimulated Wound Healing. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 39, n.11, 2011.

VYVER, M. V. *et al.* Histology Scoring System for Murine Cutaneous Wounds. **Stem Cells And Development**, [S.L.], v. 30, n. 23, p. 1141-1152, 1 dez. 2021.

WITTE, M. B; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **The American Journal Of Surgery**, [S.L.], v. 183, n. 4, p. 406-412, abr. 2002.

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

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 94, n. 3, p. 909-950, jul. 2014.