



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA (PPGO) - MESTRADO



SABRINA BASSO

Avaliação do efeito da água ozonizada em diferentes concentrações em biofilmes
de *Candida albicans* – estudo *in vitro*

Cascavel - PR
2022

SABRINA BASSO

Avaliação do efeito da água ozonizada em diferentes concentrações em biofilmes de *Candida albicans* – estudo *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia

Orientador: Profa. Dra. Lilian Cristiane Baeza

Co-orientador: Prof. Dr. Christian Giampietro Brandão

Cascavel - PR
2022

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Basso, Sabrina

Avaliação do efeito da água ozonizada em diferentes concentrações em biofilmes de *Candida albicans* ? estudo in vitro / Sabrina Basso; orientadora Lilian Cristiane Baeza ; coorientador Christian Giampietro Brandão. -- Cascavel, 2022.

37 p.

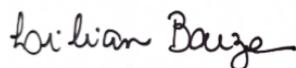
Dissertação (Mestrado Profissional Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2022.

1. *Candida albicans* . 2. Ozônio . 3. Biofilme dental . I. Baeza , Lilian Cristiane, orient. II. Brandão, Christian Giampietro , coorient. III. Título.

SABRINA BASSO

Avaliação do efeito da água ozonizada em diferentes concentrações em biofilmes de *Candida albicans* - estudo *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Odontologia, área de concentração Odontologia, linha de pesquisa Patologia Aplicada à Clínica Odontológica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Lilian Cristiane Baeza

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Veridiana Camilotti

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Luhana Santos Gonzales Garcia

Universidade Paranaense - UNIPAR (UNIPAR)

Cascavel, 25 de novembro de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de pesquisa à minha família, pai, mãe, irmão, esposo e amigas, que sempre me apoiaram em cada momento durante estes dois anos, onde cada dificuldade encontrada foi suprida com uma palavra de apoio e incentivo.

Ao meu pai, por ser pilar da minha formação, onde, um dos maiores sonhos da vida dele era de me formar Cirurgiã-dentista. E hoje, oito anos após minha graduação, formação na especialização em Endodontia, sigo nessa caminhada e concluindo este programa de mestrado.

A minha mãe, que em cada dificuldade que passei, esteve ali, me dizendo para não desistir, que a cada dia que se passava eu estava mais perto do meu objetivo final. Que em todos os dias, durante esses dois anos fez as refeições do meio-dia e me esperou para almoçar, e que em todos os dias me lembrava que estava ali para me apoiar.

Ao meu irmão, por me alegrar todas as vezes em que eu me sentia frustrada com os obstáculos encontrados nos meus dias de trabalho e estudos.

Ao meu esposo, que além de todo incentivo e apoio emocional, suportou cada ataque de nervos, noites sem dormir direito, ausências em casa, manhãs madrugadas para estar na universidade as 7 da manhã, te amo por tanto.

As minhas amigas, Camila, Kaohana, Ane, Julia, Suelen, Luhana e Sonia, que a todo momento estiveram do meu lado, desde a graduação. Foram capazes de suportar minhas reclamações, lamentações, risadas, surtos, mas que ainda assim nunca duvidaram da minha capacidade e nunca me deixaram desistir.

AGRADECIMENTOS

Deus é o pilar de tudo. Com a proteção divina e fé que não se quantifica, sou grata por cada respirar, cada amanhecer, sem ele nossa existência seria vazia!

Gratidão ao professor Christian Giampietro Brandão que não mediu esforços para me ajudar.

A professora Lilian Cristiane Baeza, mulher extraordinária, de inteligência inexplicável, um coração enorme e uma dedicação ao seu trabalho inigualável. Onde em cada momento foi o que precisava ser, divertida, dedicada, exigente, amiga, professora, que mesmo não sendo dentista sempre se esforçou para aprender mais que o necessário e dividindo seu conhecimento em cada detalhe. Obrigada por dar o seu melhor por mim!

Avaliação do efeito da água ozonizada em diferentes concentrações em biofilmes de *Candida albicans* – estudo *in vitro*

RESUMO

Este estudo teve como objetivo, comparar a ação antimicrobiana da água ozonizada (AO) nas concentrações de 43 e 70 µg/mL, ao hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl), sobre biofilme de *C. albicans*. Após formação do biofilme em placas de poliestireno, foram empregadas as metodologias de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), quantificação da biomassa por cristal violeta (CV), determinação da atividade metabólica e avaliação da expressão gênica por qRT-PCR. A contagem de UFC mostrou redução de 93,7% e 98,5% para AO 43 e 70 µg/mL e de 99,9% para NaOCl. A redução da biomassa foi de 71,8% para o NaOCl, e de aproximadamente 66% para ambas as concentrações de AO. Para viabilidade, houve redução de 43,3% e 58,3%, para AO nas concentrações 43 e 70 µg/mL, e 83,7% para o NaOCl. Os dados de qRT-PCR, mostraram pequena diminuição na expressão dos genes *als3*, *bcr1*, *hwp1* e *cph1*, para *als3* houve redução de 4,2%, *bcr1* 3,1 %, *hwp1* 9,7% e *cph1* 7,8%. Em conclusão, AO e NaOCl foram eficazes na redução do biofilme de *C. albicans*, no entanto a efetividade a AO, foi menor que o NaOCl, sugerindo que o ozônio possa ser utilizado como adjuvante na remoção de biofilmes.

Palavras-chave: ozônio, candidose oral, biofilme dental, desinfetante.

Evaluation of the effect of ozonated water at different concentrations on *Candida albicans* biofilms – in vitro study

ABSTRACT

This study aimed to compare the antimicrobial action of ozonized water (OA) at concentrations 43 and 70 µg/mL, to 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) on *C. albicans* biofilm. After biofilm formation on polystyrene plates, the following counting methodologies were applied: Colony Forming Units (CFU), quantification of biomass by crystal violet (CV), determination of metabolic activity and evaluation of gene expression by qRT-PCR. The CFU count showed a reduction of 93.7% and 98.5% for AO 43 and 70 µg/mL and 99.9% for NaOCl. The biomass reduction was 71.8% for NaOCl, and for AO concentrations in order of 66% for both. About viability, there was a reduction of 43.3% and 58.3% for AO at concentrations 43 and 70 µg/mL, and 83.7% for NaOCl. The qRT-PCR data demonstrated a small decrease in the expression of the genes *als3*, *bcr1*, *hwp1* and *cph1*, for *als3* there was a reduction of 4.2%, *bcr1* 3.1%, *hwp1* 9.7% and *cph1* 7.8%. Finally, AO and NaOCl were effective in reducing the biofilm of *C. albicans*, however the effectiveness of AO was lower than NaOCl, suggesting that ozone can be used as an adjuvant for biofilm removals.

Keywords: ozone, oral candidiasis, dental biofilm, disinfectant.

Dissertação elaborada e formatada conforme as
normas das publicações científicas:

Journal of Oral Science

Disponível em:

[https://www.jstage.jst.go.jp/guide/josnugd/8/27414/-
char/en/Instructions_October-2022.pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/guide/josnugd/8/27414/-char/en/Instructions_October-2022.pdf)

SUMÁRIO

1. Introdução:	12
2. Metodologia:	15
2.1. Modelo de estudo:	15
2.2. Microrganismo e condições de cultivo:	15
2.3. Preparo e obtenção das soluções:	15
2.4. Formação do biofilme:	15
2.5. Quantificação do biofilme por contagem de Unidades Formadas de colônias (UFCs)....	15
2.6. Quantificação da biomassa por Cristal Violeta (CV):	16
2.7. Determinação de atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução MTT:	17
2.8. Extração de RNA total:	17
2.9. Tratamento com DNase e síntese de cDNA:	18
2.10. PCR em Tempo Real (qRT-PCR):	18
2.11. Análise estatística:	19
3. Resultados:	20
4. Discussão:	22
5. Tabelas:	26
6. Figuras e legendas das figuras:	27
7. Conclusão:	31
8. Referências bibliográficas:	32
9. Anexos:	35

CAPÍTULO I

Avaliação do efeito da água ozonizada em diferentes concentrações em biofilmes de *Candida albicans* – estudo *in vitro*

INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é um ecossistema microbiológico em equilíbrio e, como em outras superfícies do corpo, tem uma microbiota diversificada, podendo formar biofilmes estrutural e funcionalmente muito organizados. Dentre os microrganismos que compõem esta microbiota, além das bactérias, grande parte é constituída de leveduras do gênero *Candida*, sendo a espécie *C. albicans* presente na cavidade bucal em, aproximadamente 50% da população humana, geralmente como comensal, sem causar prejuízos [1]. Entretanto, em determinadas circunstâncias, como imunossupressão, xerostomia e uso de próteses, por exemplo, podem se tornar patogênicas, ocasionando quadros como, candidose atrófica crônica, estomatite e doenças fúngicas disseminadas, que apresentam alto risco, em pacientes hospitalizados, como pneumonia aspirativa, que normalmente são induzidas por microrganismos das próteses [2,3].

C. albicans, tem sido considerada uma espécie resistente em infecções bucais e principalmente endodônticas e possível causadora de falhas nos tratamentos. Esta resistência pode ser atribuída aos fatores de virulência, como dimorfismo, formação de tubo germinativo, capacidade de realizar rápidas modificações fenotípicas, fenômeno denominado de “phenotypic switching” adesinas, produção de enzimas, como fosfolipases e proteinases e a habilidade de combater o estresse oxidativo e nítrico produzido por células fagocíticas, subsequentemente evadindo da ação do sistema imune, além da capacidade de formação de biofilmes [4].

Os biofilmes são estruturas complexas de microrganismos aderidos à uma superfície biótica ou abiótica, embebidas em uma matriz de substância polimérica extracelular (SPE). A complexidade estrutural do biofilme permite a organização de populações de microrganismos, além de oferecer proteção contra as respostas imunológicas do hospedeiro, ação de agentes antimicrobianos, e atuam como fontes de infecções [5].

Deste modo, as soluções irrigadoras são de grande importância, principalmente o tratamento endodôntico, pois, além de apresentarem propriedades antissépticas e capacidade de remover resíduos, lubrificam as paredes dentinárias, até mesmo aquelas que não possuem atividade antimicrobiana, apresentam eficácia física na diminuição da microbiota endodôntica. O NaOCl (hipoclorito de sódio) é um agente poderoso para eliminação de microrganismos em superfícies, no caso das próteses dentárias [6].

O NaOCl em diversas concentrações tem sido a solução mais utilizada durante décadas, embora sua concentração ideal, que varia entre as concentrações de 0,5% à 6%, não tenha sido universalmente definida, devido à sua excelente ação como solvente de material inorgânico e amplo espectro antimicrobiano [7]. Porém, o NaOCl apresenta alguns efeitos colaterais como hemorragia, ulcerações em pele e edema quando utilizados em altas concentrações [8,9], sua

citotoxicidade é a maior desvantagem quando injetado por acidente nos tecidos periapicais, apresentando ainda gosto e cheiro repulsivo, assim como tendência em manchar as roupas, e a capacidade de desencadear reações alérgicas. Dessa forma, soluções irrigadoras igualmente efetivas, porém mais seguras, são desejáveis [10].

Levando em consideração às limitações do NaOCl, o ozônio está sendo apresentado como um possível agente alternativo devido a sua capacidade antimicrobiana e baixa toxicidade [11]. O ozônio é um oxidante muito forte e seletivo, que por meio de oxidação, é capaz de destruir biomoléculas e paredes celulares de diversos microrganismos [12]. Ele pode corroborar em casos de infecções persistentes quando o NaOCl já foi utilizado e principalmente onde o NaOCl não deve ser usado devido a sua toxicidade [13].

O ozônio, também conhecido como oxigênio triatômico e trioxigênio, é um composto natural que consiste em três átomos de oxigênio. As propriedades microbiológicas e metabólicas, nas fases gasosa e aquosa, o tornam um desinfetante muito útil contra bactérias, fungos, protozoários e vírus [3,14]. A ozonioterapia é considerada uma terapia alternativa e tem vários efeitos positivos, mas, dependendo da dose, pode resultar em efeitos nocivos para o indivíduo. Os principais efeitos positivos relatados em humanos são baseados em três funções principais: antimicrobiano, equilíbrio antioxidante/oxidante e efeitos imunomoduladores [15].

É aceito que o potencial oxidante do ozônio induz a destruição das paredes celulares e membranas citoplasmáticas de bactérias e fungos [2], e durante esse processo, o ozônio ataca glicoproteínas, glicolipídios e outros aminoácidos inibindo e bloqueando o sistema de controle enzimático da célula [16] resultando em um aumento na permeabilidade da membrana, o elemento-chave da viabilidade celular, levando à cessação funcional imediata. Então, as moléculas de ozônio podem entrar prontamente na célula e causar a morte do microrganismo [2]. A terapia com ozônio tem sido testada como agente alternativo ao NaOCl, como fonte complementar de desinfecção no preparo químico-mecânico de canais, eliminação de microrganismos de próteses dentais e em doenças bucais. Alguns autores demonstraram que a terapia com ozônio tem resultados semelhantes quando comparados com o NaOCl na redução de microrganismos e biofilme de *C. albicans* [17,18].

Seja qual for o método de desinfecção eleito, existem limitações que dificultam esta desinfecção, como a complexidade anatômica dos canais radiculares, a presença de um ambiente químico complexo e a maturidade do biofilme presente.

Sendo assim esse trabalho teve por objetivo avaliar de maneira *in vitro* o comportamento do biofilme de *C. albicans* submetido a tratamentos a base de água ozonizada (AO) e NaOCl, assim como, comparar a atividade metabólica, produção de biomassa e

quantificação por Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) e avaliar, por qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real), a expressão dos genes *als3*, *bcr1*, *cph1*, *efg1* e *hwpl*, em células do biofilme de *C. albicans* com e sem tratamento com AO.

METODOLOGIA

2.1. Modelo de estudo

Estudo do tipo experimental qualitativo.

2.2. Microrganismo e condições de cultivo

Foi utilizada a cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 90028). O microrganismo foi estocado em caldo infusão cérebro-coração (BHI) (Oxoid, Brasil LTDA) com glicerol a -80 °C. Para os testes, a levedura foi inoculada em caldo BHI e incubada em estufa a 37 °C por 24 h. Posteriormente, foi cultivada em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid, Brasil LTDA) e em CHROMagar® *Candida* (Kasvi, São José do Pinhais, Paraná, Brasil) para verificar a pureza da cultura.

2.3. Preparo e obtenção das soluções

Água ozonizada (AO): A solução AO foi preparada 5 minutos antes da sua utilização por meio do aparelho gerador de ozônio (Ozone & Life Ltda, Modelo O&L1.5 RM, São José dos Campos, São Paulo, Brasil). Para tanto, foi utilizado oxigênio com grau de pureza medicinal e com fluxo regulado entre 1,0 L/min à 0,125 L/min de acordo com a concentração desejada. As concentrações de produção do gás ozônio permitidas por este aparelho variam de 5 a 70 µg/mL. Foi utilizada água bidestilada estéril, num volume de 50 mL e resfriada (8 °C \pm 2,0 °C). O gás ozônio foi ajustado no gerador para as concentrações requeridas para o modelo experimental, nas concentrações de 43 e 70 µg/mL.

Hipoclorito de sódio (NaOCl): Foi obtido do fabricante Asfer Industria química Ltda. em concentração de 2,5%.

2.4. Formação do biofilme

O biofilme de *C. albicans*, foi realizado de acordo com Chandra *et al.*, (2001) [19], com algumas modificações.

Primeiramente, foi preparado um inóculo a partir das leveduras previamente cultivadas Sabouraud Dextrose Caldo (SDB) (Oxoid, Brasil LTDA) incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação 3000 rpm, lavadas duas vezes em tampão salina fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,2 e ajustadas à concentração de 1×10^7 células/mL por contagem em câmara de Neubauer. Foram adicionados 200 µL do inóculo diluído em SDC, em placas de poliestireno de 96 poços, com fundo chato (TPP®, Switzerland). As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C, sem agitação, para aderência das células. Em

seguida, o sobrenadante foi removido e os poços gentilmente lavados três vezes, com PBS 0,01 M para remoção das células não aderidas. Em seguida, foram adicionados 200 µL de meio SDB e incubadas por 24 h a 37 °C, após esse período, o sobrenadante foi novamente removido e os poços gentilmente lavados três vezes, com PBS 0,01 M. Em seguida, foram adicionados 200 µL de meio SDC e incubadas por mais 24 h a 37 °C, totalizando 48 h. Decorrido esse período, o sobrenadante foi removido e adicionado as soluções de AO e NaOCl, deixando agir por 30 minutos. Após o período de tratamento, as soluções testadas foram removidas, os poços lavados três vezes com PBS 0,01 M, para posterior quantificação dos biofilmes. Como controle positivo os poços foram inoculados com *C. albicans*, sem tratamento com as soluções testadas.

2.5. Quantificação do biofilme por contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Após o tratamento e a formação do biofilme, as placas foram agitadas em vórtex por 5 minutos. Em seguida, 50 µL deste conteúdo foi transferido para tubos tipo Eppendorf contendo 450 µL de solução fisiológica 0,85% esterilizada obtendo uma diluição de 10^{-1} . A partir desta suspensão inicial, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} e alíquotas de 100 µL de todas as diluições foram semeadas em cinco em placas SDA com cloranfenicol. Como controle positivo, leveduras foram incubadas somente com meio de cultura. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, para posterior contagem de UFCs e os resultados foram expressos em UFC/mL.

2.6. Quantificação da biomassa por Cristal Violeta (CV)

O método de quantificação da biomassa foi adaptado da técnica descrita por Silva *et al.*, (2009) [20]. Após formação de biofilmes em placas de poliestireno de 96 poços (TPP®, Switzerland), e tratamento com as soluções irrigantes, estas foram removidas, e os poços lavados três vezes com PBS. Após a lavagem, os biofilmes foram fixados com 200 µL de metanol, por 15 minutos. Em seguida este foi removido, e as placas ficaram em temperatura ambiente até completa secagem. Então, 200 µL de solução de CV (1% v/v) foram adicionados a cada poço, seguido de incubação por 5 minutos. Após este período, a solução de CV foi removida, e os poços foram cuidadosamente lavados com água destilada estéril e 200 µL de ácido acético (33% v/v) foram adicionados para dissolução do corante. Por fim, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma nova placa de 96 poços e a absorbância foi medida em leitor de microplacas (Biotek modelo Epoch) em comprimento de onda de 570 nm.

2.7. Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução MTT

Uma medida semiquantitativa da formação de biofilme foi obtida a partir do ensaio de redução do 3, (-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo (MTT) (Sigma – Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), o qual se baseia na interação do sal tetrazolium com mitocôndrias ativas, produzindo o composto formazan. Como descrito por Wang *et al.*, (2012) [21]. Foram adicionados 100 µL de solução de MTT na concentração de 5 mg/mL, dissolvido em PBS, com incubação a 37 °C, por 3 horas. Após esse período, a solução foi removida, e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), por 15 minutos. O conteúdo de cada poço foi transferido para uma nova placa de 96 poços e a absorbância foi medida em leitor de microplacas (Biotek modelo Epoch) em comprimento de onda de 570 nm.

Tanto os resultados da quantificação da biomassa por CV e atividade metabólica por MTT foram expressos em porcentagem de inibição (% IN) de acordo com a seguinte fórmula:

$\% \text{ IN} = \{1 - [(AE-CN)/(CP-CN)]\} \times 100$, onde:

AE = absorbância dos poços tratados;

CN = absorbância dos poços contendo branco (apenas meio de cultura);

CP = absorbância dos poços sem tratamento (leveduras sem tratamento com as soluções irrigantes).

2.8. Extração de RNA total

A extração de RNA foi realizada no Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro – RJ. Para extração de RNA os biofilmes foram formados de acordo com item 2.4, em placas de poliestireno de 06 poços, com fundo chato (TPP®, Switzerland). Todo material plástico e reagentes utilizados foram DNase/RNase *free* e para ozonização foi usada água UltraPure™ DEPC (dietilpirocarbonato) (Sigma – Aldrich, San Luis, Missouri, EUA). O tratamento foi realizado com AO na concentração de 70 µg/mL, da mesma maneira que foi realizado para os métodos anteriores. As células foram tratadas nos tempos de 24 e 48 h, por uma hora. Após o tratamento, a AO foi retirada e foi colocado 1 mL de TRIzol *Reagent* (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA) no primeiro poço, o qual foi transferido para os seguintes até a remoção total de biofilme. Como controle, poços foram inoculados com *C. albicans*, sem tratamento com AO.

Para extração de RNA foi utilizado TRIzol *Reagent*, conforme protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração de RNA foi quantificada no aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e armazenadas a -80 °C.

2.9. Tratamento com DNase e síntese de cDNA

Quantidades iguais de RNA (1 µg) foram tratados com DNase I (1 U/mL) (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir, o RNA foi transcrito para cDNA utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA). Esta reação foi incubada a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C 120 min, 85 °C 5 minutos, 4 °C intermitente. Após este período foram adicionados 80 µL de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0) e armazenados a -20 °C até sua posterior utilização na qRT-PCR.

2.10. PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Os cDNAs foram então utilizados nos ensaios de qRT-PCR. As reações de amplificação foram realizadas por 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min, após a desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, em reações de 20 µL contendo 2 µL de cada oligonucleotídeo, 10 µL da mistura completa para PCR contendo SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e 4 µL da reação de cDNA molde. As sequências de oligonucleotídeos senso e antisense estão listados na Tabela 1. O gene constitutivo *act1* (“Actin 1”) foi usado como controle endógeno. Os oligonucleotídeos senso e antisense foram desenhados com base nas sequências genômicas completas obtidas do banco de dados de *C. albicans* (<http://www.candidagenome.org/>) e do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando-se o programa GeneRunner (<https://gene-runner.software.informer.com/6.0/>) As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores desenhadas para este estudo estão listadas na Tabela 1.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata para cada amostra de cDNA, no equipamento AriaMx Real-time PCR System (Agilent, Santa Clara, CA). Os valores de expressão foram normalizados através do método de comparação do ciclo limiar Ct (*cicle threshold*), pela seguinte equação: $2^{-\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = \Delta C_T \text{ alvo} - \Delta C_T \text{ endógeno}$ [22]. Os resultados também foram submetidos à análise da curva de desnaturação ou curva de *melting*, a fim de confirmar a especificidade da amplificação. Uma curva padrão relativa foi gerada agrupando

uma alíquota de cada amostra de cDNA diluída em série de 1:5 até 1:125. O teste t de Student foi aplicado nas análises estatísticas. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

2.11. Análise estatística

Quanto à análise estatística, o programa utilizado foi o GraphPad Prism 8.0[®]. Os ensaios para as análises de UFC, CV e MTT foram realizados em triplicata, repetido três vezes e os resultados foram avaliados pelo teste ANOVA e teste de Tukey para os dados normais. Para a análise da expressão gênica (RT-PCR), os resultados foram avaliados pela análise de diferença estatística entre duas médias através do teste t de Student com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Para avaliação do efeito da AO em comparação ao NaOCl, sobre o biofilme de *C. albicans*, foram utilizados alguns parâmetros fenotípicos de análise de biofilmes já estabelecidos na literatura, como contagem de unidades formadoras de colônia, atividade metabólica e biomassa. Todos os resultados obtidos, foram realizados a partir da formação de biofilme de *C. albicans* em placas de poliestireno, durante 48 horas, seguido dos tratamentos propostos. Inicialmente, foram testadas as concentrações de 09, 17, 43 e 70 µg/mL de AO avaliadas por meio de contagem de UFC, como não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de 09 e 17 µg/mL, foram escolhidas para este estudo as concentrações mais elevadas de 43 e 70 µg/mL.

Ao analisar os resultados obtidos através do método UFC, observou-se que os grupos tratados apresentaram reduções de $93,7 \pm 0,9$ %, $98,5 \pm 0,2$ % e $99,9 \pm 0,0$ % para os tratamentos com AO de 43, 70 µg/mL e NaOCl, respectivamente. Os resultados de contagem obtidos foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), para todos os tratamentos quando comparados com o grupo controle, sem tratamento (Figura 1).

Quanto a atividade da AO e NaOCl sobre a biomassa de biofilmes maduros (48 horas) de *C. albicans*. O percentual de inibição do biofilme foi determinado pela equação descrita no item 2.7. Os resultados obtidos pelo método do CV, mostraram reduções da biomassa de aproximadamente $71,8 \pm 1,1$ % para NaOCl, $66,6 \pm 0,5$ % para AO 43 µg/mL, e de $66,1 \pm 1,8$ % para AO 70 µg/mL. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Figura 2).

A viabilidade celular (VC) do biofilme maduro foi avaliada usando o ensaio de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-Il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Os resultados dos diferentes tratamentos AO e NaOCl, sobre a viabilidade celular dos biofilmes maduros indicaram uma redução da atividade celular. Foi observada redução média de $43,3 \pm 5,2$ % e $58,3 \pm 6,2$ %, para AO nas concentrações 43 e 70 µg/mL, respectivamente, e $83,5 \pm 0,5$ % para o NaOCl. Os valores foram estatisticamente significativos quando comparados os respectivos tratamentos ao controle, o tratamento com NaOCl foi significativo quando comparado aos tratamentos com AO em ambas as concentrações ($p < 0,05$) (Figura 3).

Previamente ao experimento de qRT-PCR, foi realizada a extração do RNA das amostras de biofilme nos tempos de 24 e 48 horas, com e sem tratamento com AO na concentração de 70 µg/mL. O perfil de expressão dos genes *als3*, *bcr1*, *cph1*, *efg1* e *hwp1* do biofilme de *C. albicans* foi avaliado por análise quantitativa de PCR em tempo real a fim de caracterizar a influência da água ozonizada sobre perfil transcricional destes. O gene *act1* foi utilizado como

controle endógeno. Assim, a expressão relativa dos genes *als3*, *bcr1*, *cph1*, *efg1* e *hwp1* foi calculada de acordo com a variação da expressão destes em relação à expressão do gene *act1*.

Os valores de expressão relativa, após 48 h de formação do biofilme com tratamento, mostraram uma pequena diminuição na expressão dos genes *als3*, *bcr1*, *hwp1* e *cph1*, para *als3* houve redução de 4,2 %, *bcr1* 3,1 %, *hwp1* 9,7 % e *cph1* 7,8 %, já no tempo de 24 h observou-se um pequeno aumento na expressão de todos os genes avaliados em relação ao controle. Os valores de *fold-change*, para nenhum dos genes e nos diferentes tempos não ultrapassou 2x *fold*, indicando que essas pequenas alterações na expressão não são significativas no ponto de vista transcricional, como demonstrado na Figura 4.

DISCUSSÃO

Na atual pesquisa, água ozonizada reduziu parcialmente o biofilme de *C. albicans*, com diminuição no número de células, biomassa e atividade metabólica, no entanto, em comparação ao NaOCl, esses resultados foram menos expressivos, pois o NaOCl praticamente eliminou todo o biofilme. A exceção foi para redução da biomassa, quantificada pelo método de cristal violeta, tanto o tratamento com AO e NaOCl, tiveram resultados similares, aproximadamente 67 e 72%, respectivamente. Estes resultados se devem ao fato de o cristal violeta corar tanto células vivas quanto mortas, pois ele cora a biomassa em si e não apenas as células que sobreviveram ao tratamento [20], isso pode explicar as diferenças observadas nos outros métodos, como contagem de UFCs e viabilidade celular por MTT.

Este resultado apoia o estudo de Boch e colaboradores (2016) [13], onde avaliaram o efeito do ozônio gasoso sobre biofilme de *Enterococcus faecalis*, foi observado que com a utilização de NaOCl, ocorreu uma redução de 99,9% dos microrganismos, enquanto no grupo do ozônio, 85,4% foram erradicados, porém nenhuma amostra deste grupo foi isenta de bactérias. O que os levou a concluir que o ozônio pode reduzir a quantidade de patógenos, organizados em biofilme, significativamente. Porém, esse método de desinfecção ainda não é alternativo ao NaOCl.

A ozonioterapia foi introduzida na área da Odontologia por Edward Fisch em 1931, que empregou o ozônio durante cirurgias dentais, com a finalidade de desinfecção e cicatrização de feridas orais. A sua utilização consolidou-se ao longo dos anos e abrangeu a maioria das especialidades odontológicas [23]. O gás ozônio e água ozonizada em altas concentrações têm surgido como agente antimicrobiano potencial [3]. O valor da concentração, aqui obtido (43 e 70 µg/mL), pode ser considerado satisfatório para atuar como antimicrobiano, uma vez que, em outros estudos, já foi demonstrada esta ação contra microrganismos em concentrações ainda menores [2,24]. A dose segura de ozônio é variável, dependendo da localização e do objetivo do tratamento. Atualmente, propõe-se uma variação de 10 a 80 µg/mL de ozônio seja benéfica e sem toxicidade [25].

Levando-se em consideração que a ozonioterapia está disponível em diferentes tipos de veículos, seja na forma de gás, sob tratamento tópico ou na forma de água ozonizada, para aplicação direta ou parenteral [15]. A forma de aplicação, tempo, concentração, susceptibilidade do microrganismo e tipos de células, planctônicas ou biofilme, além da aplicação *in vivo*, *in vitro* ou *ex-vivo* podem gerar diferentes resultados. No caso de um estudo *in vivo*, deve-se considerar a ação do ozônio sobre o sistema imune do indivíduo, pois a ozonioterapia parece ter papel na modulação de citocinas pró-inflamatórias [26].

Para Hubbezoglu *et al.*, (2014) [18] associaram AO e ultrassom, com completa desinfecção completa dos canais radiculares, concluindo que a eficácia é semelhante ao NaOCl. O que não foi observado em nosso estudo, já que a técnica utilizada para aplicação da AO não teve agitação/movimentação dos fluidos, o que pode ter diminuído a eficácia, pois, cientificamente já foi comprovado que a ação mecânica é capaz de reduzir os microrganismos presentes nas superfícies.

Kaya *et al.*, (2014) [27] avaliaram a eficácia antimicrobiana de quatro tratamentos, sendo eles, jato de plasma de pressão atmosférica (LTAPP), fornecimento de sistema de ozônio gasoso, NaOCl (2,5%) e solução salina, sobre *E. faecalis* em paredes do canal radicular e túbulos dentinários. Os resultados mostraram a eficácia antibacteriana de NaOCl, LTAPP, ozônio e solução salina em ordem decrescente, respectivamente. A amostragem microbiana da dentina demonstrou uma eficácia superior do LTAPP em comparação ao NaOCl no terço médio da raiz, enquanto ambos tiveram efeitos semelhantes nos terços coronal e apical. NaOCl e LTAPP foram melhores que ozônio na porção coronal e terço médio dos canais radiculares.

Huth e colaboradores (2009) [17] realizaram experimento tipo dose-resposta para ozônio aquoso e gasoso cobrindo uma faixa de concentração ampla, para avaliar se havia uma concentração que poderia competir com agentes antimicrobianos já utilizados. Em células planctônicas o ozônio aquoso eliminou completamente *C. albicans* quando usado em concentrações 5 µg/mL. O gás de ozônio em concentrações de 1 gm³ por 1 min, eliminou quase completamente, com uma redução média de mais de 99%. Além disso, relataram que a eliminação completa dos microrganismos poderia ser obtida na forma gasosa a 32 gm³ por 1 minuto ou a uma concentração mais baixa para maior tempo de contato.

A ação sinérgica da clorexidina 2% e do ozônio gasoso, realizado em modelo *ex vivo*, utilizando dentes humanos uniradiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* e *C. albicans*, por três dias, mostrou que a ação combinada dos dois compostos por curto período (gás ozônio por 24 segundos) promoveu a eliminação completa dos microrganismos testados [28]. Os resultados obtidos se devem à ação sinérgica dos dois compostos, quando comparados a este estudo, não obtivemos remoção total de *C. albicans* utilizando AO.

Nesse estudo, optou-se pela utilização do ozônio aquoso, como uma possível solução de irrigação. Em solução aquosa, o ozônio é relativamente instável e apresenta meia-vida de 20 a 30 minutos, a 20 °C em pH 7,0. A estabilidade do ozônio em solução aumenta com a redução da temperatura e a acidificação [29]. A decomposição do ozônio em meio aquoso é caracterizada por uma rápida diminuição da concentração inicial, sendo que os radicais hidroxila (OH) são os principais produtos desta decomposição [30]. Diferentes fatores físico-

químicos podem ter influência na ação da água ozonizada. O ozônio é dissolvido facilmente em água com pH inferior a 7,0, o aumento do pH acelera o processo de decomposição resultando na produção de radicais livres potencialmente reativos [31]. Outro fator para estabilidade do ozônio, se deve à propriedade apresentada de diversos equipamentos geradores. O diâmetro das bolhas introduzidas no sistema também é um fator determinante para a solubilização do ozônio, o ideal são bolhas de 1 a 3 mm. Quanto menores as bolhas, maior a superfície de contato, e, portanto, maior sua estabilidade [32].

Na atual pesquisa, utilizamos água bidestilada com pH 7,1, temperatura de 8 °C e com geração de ozônio no próprio local de aplicação, sendo a AO utilizada imediatamente após o preparo, devido a sua instabilidade, e com tratamento por 30 minutos, sem homogeneização, no entanto, a ação inibitória não ocorreu conforme esperado, observamos que AO teve uma ação desinfetante, com eliminação parcial do biofilme. Os índices maiores de viabilidade celular para os grupos tratados com AO em comparação ao NaOCl, indicando a instabilidade do ozônio na água. Outra questão é a aplicação sobre células planctônicas ou biofilme. No estudo de César e colaboradores (2012) [33], a AO foi eficaz na sanitização de instrumentos odontológicos contaminados com células de *C. albicans*, após 30 minutos de exposição nenhuma UFC viável foi detectada. O tempo de contato dos microrganismos na instrumentação foi de 30 minutos, seguido de incubação por 2 horas e posteriormente realizado a sanitização. Diferentemente do nosso estudo, no qual o tratamento da AO foi sobre aglomerados microbianos aderidos as placas de poliestireno por 48 horas, vale ressaltar que, estes, caracterizaram-se como biofilmes maduros, condição que implica na redução da penetração de agentes antimicrobianos até as camadas mais profundas, sobretudo em concentrações e tempos insuficientes. Estes dados corroboram com outros estudos, no que se refere à resistência do biofilme aos desinfetantes [34,35].

A formação e desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* é tipicamente classificado em quatro estágios: i) adsorção e adesão de células leveduriformes a uma superfície; ii) formação de microcolônias e produção de matriz extracelular; iii) maturação; e iv) dispersão de células do biofilme maduro [1]. Esses estágios são acompanhados por uma complexa remodelação fenotípica, sustentada por inúmeras mudanças na expressão gênica [36].

Ao total, 51 fatores de transcrição já foram identificados, os quais contribuem para formação e desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. Coletivamente, esses reguladores transcricionais influenciam a expressão de aproximadamente 1.000 genes envolvidos na adesão, formação de hifas, metabolismo, produção de SPE e resistência a medicamentos [1]. No presente trabalho, avaliamos a expressão dos genes *als3*, *bcr1*, *cph1*, *efg1* e *hwp1* em

biofilmes de *C. albicans* formado em placas de poliestireno por 24 e 48 horas tratados com AO 70 µg/mL. Os genes *efg1* (“Enhanced Filamentous Growth”), e *cph1* (“Candida PseudoHyphal regulator”) são exemplos de fatores de transcrição que estão relacionados à morfogênese, os quais formam um circuito regulador na diferenciação das hifas [37]. O gene *bcr1* (“Biofilm and Cell wall Regulator”) tem papel importante, atua como um regulador positivo da adesão, sendo requerido para a expressão de proteínas da superfície celular como *als1* (“Agglutinin like Sequence”) e *hwp1* (“Hyphal Wall Protein”) [38].

Shichiri-Negoro e colaboradores (2021) [39], avaliaram o efeito de partículas ultrafinas de ozônio em água (< 200 nm de diâmetro) sobre biofilmes de *C. albicans*. Os tratamentos com 9 e 11 ppm suprimiram o crescimento de *C. albicans* e a formação de biofilme em 24 horas em resina de polimetilmetacrilato sem prejudicar as propriedades da superfície, além de regular negativamente a expressão dos genes *als1* e *als3*. Já neste estudo, os valores de expressão relativa, após 48 horas de formação do biofilme com tratamento, mostraram uma pequena diminuição na expressão dos genes *als3*, *bcr1*, *hwp1* e *cph1*, para *als3* houve redução de 4,2 %, *bcr1* 3,1 %, *hwp1* 9,7 % e *cph1* 7,8 %, já no tempo de 24 horas observou-se um pequeno aumento na expressão de todos os genes avaliados em relação ao controle. Os valores de *fold-change*, para nenhum dos genes e nos diferentes tempos não ultrapassou 2x *fold* (Figura 4), indicando que essas pequenas alterações na expressão não são significativas no ponto de vista transcricional, não corroborando com os resultados obtidos com o estudo de Shichiri-Negoro e colaboradores (2021) [39], que pode ter se dado devido a forma de aplicação do ozônio. O gene *als3* é mais expresso quanto maior a quantidade de filamentos presentes, biofilmes iniciais e intermediários (entre 6 e 12 horas) podem expressar mais o gene *als3* que os biofilmes maduros [40], o que pode explicar a não alteração na expressão, mesmo após tratamento com AO. Com base nos resultados obtidos, concluímos que a AO mostrou efetividade para a redução de *C. albicans*, embora menor que o NaOCl, sugerindo que esta possa ser utilizada como adjuvante no tratamento de biofilmes de *C. albicans*, principalmente em casos em que o NaOCl não possa ser utilizado.

TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos senso e antisenso utilizados nas reações de qRT-PCR para avaliação da expressão gênica.

Gene	Localização	Sequência		Função
		5' - 3'		
<i>act1*</i>	orf19.5007 C1_13700W	Sns: CGGTTCTGGTATGTGTAAAGC Ans: CCCATACCAACCATGATACCT		Integridade estrutural do citoesqueleto celular
<i>als3</i>	orf19.1816 CR_07070C	Sns: CAACTTGGGTTATTGAAACAAAA Ans: AACAGAAACCCAAGAACAACC		Adesina - aderência à célula hospedeira
<i>hwp1</i>	orf19.1321 C4_03570W	Sns: CAGGTAGACGGTCAAGGTGA Ans: TGGGTAATCACAAGGCTCTTG		Proteína de parede celular das hifas
<i>efg1</i>	orf19.610 CR_07890W	Sns: GCCTCGAGCACTTCCACTG Ans: TTCATCTTCCCACATGGTAGT		Principal regulador transcricional envolvido na morfogênese
<i>bcr1</i>	orf19.723 CR_06440C	Sns: CAGGGACATCACAAGTACTTC Ans: TTGTTGTGGTGGGTGGTGGATA		Regula a formação de biofilme e da parede celular
<i>cph1</i>	orf19.4433 C1_07370C	Sns: TATGACGCTTCTGGGTTTCC- Ans: TCCCATGGCAATTTGTTGTTG		Fator transcricional e regula a formação de pseudo-hifa

Sns: Oligonucleotídeo senso (5'-3'); Ans: Oligonucleotídeo antisenso (3'-5'); orf: *Open Reading Frame*; *Candida* Genome Database: (<http://www.candidagenome.org/>); *act1** (*Actin1*): gene endógeno; *als3* ("Agglutinin-like Sequence 3"); *hwp1* ("Hyphal Wall Protein"); *efg1* ("Enhanced Filamentous Growth"); *bcr1* ("Biofilm and Cell wall Regulator") e *cph1* ("Candida PseudoHyphal regulator").

FIGURAS E LEGENDAS DAS FIGURAS

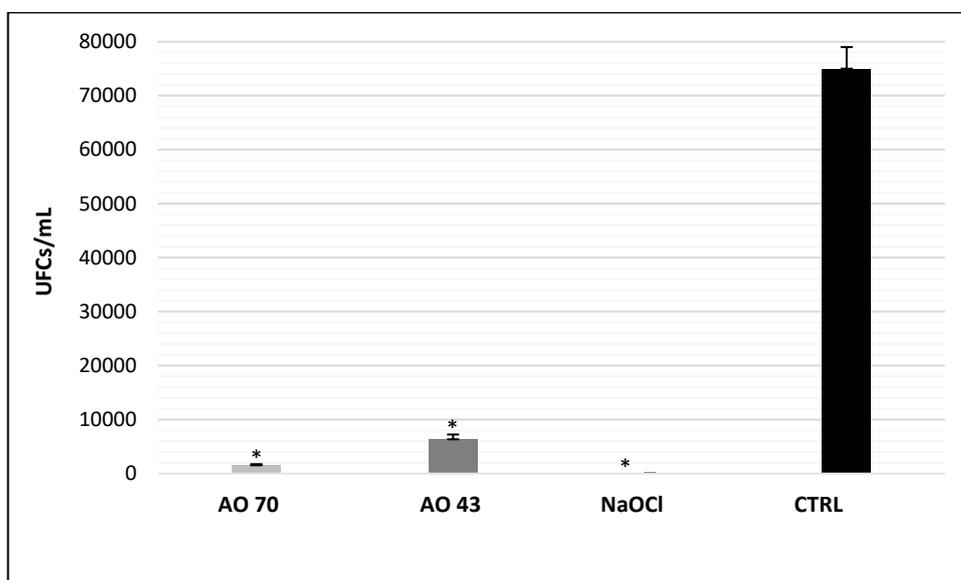


Figura 1. Gráfico com a contagem de UFCs/mL recuperadas após tratamento do biofilme de *C. albicans* com água ozonizada 70 µg/mL (AO 70), 43 µg/mL (AO 43) e hipoclorito de sódio (2,5%) (NaOCl), comparado com ao controle (CTRL) sem tratamento. * Indica que houve diferença estatística entre os grupos analisados em relação ao controle ($p < 0,05$).

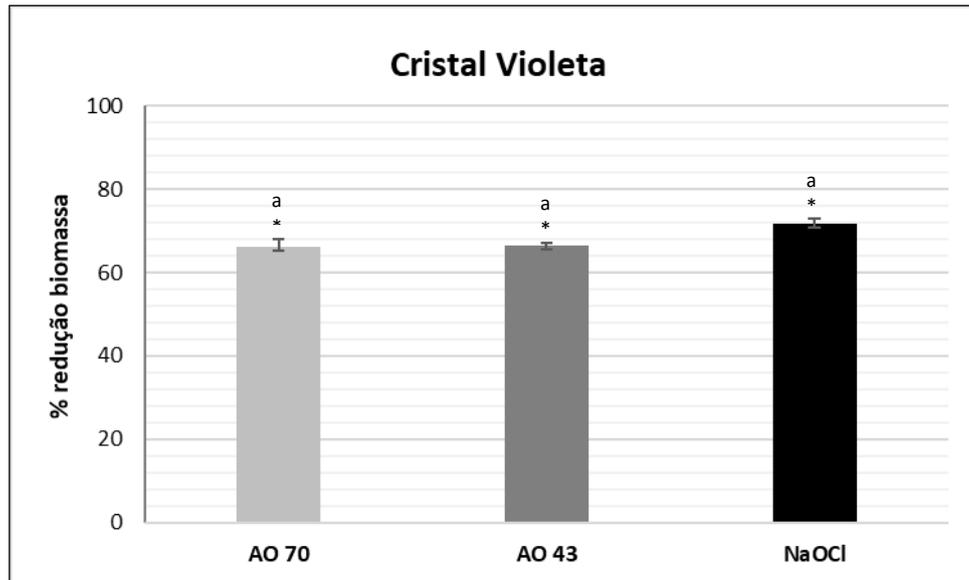


Figura 2. Gráfico mostrando os efeitos da água ozonizada 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (AO 70), 43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (AO 43) e hipoclorito de sódio (2,5%) (NaOCl), na redução de biomassa do biofilme de *C. albicans*, observado pela técnica de cristal violeta (CV). Média da Densidade óptica (% de inibição) \pm desvio padrão. * Indica que houve diferença estatística entre os grupos analisados em relação ao controle. Letra “a” indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

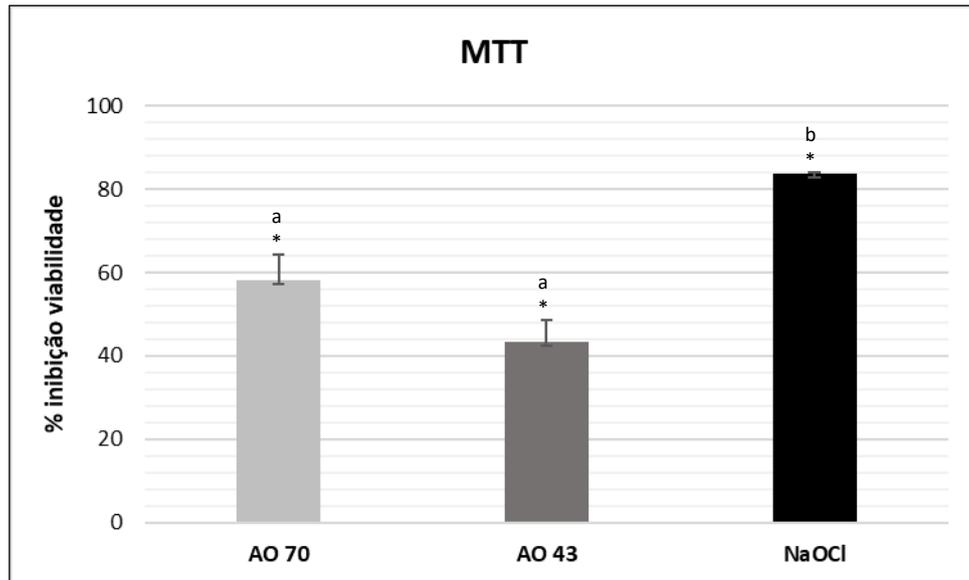


Figura 3. Gráfico representando os efeitos da água ozonizada 70 $\mu\text{g/mL}$ (AO 70), 43 $\mu\text{g/mL}$ (AO 43) e hipoclorito de sódio (2,5%) (NaOCl) na redução da atividade metabólica mitocondrial pelo ensaio de MTT (3, (-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo) sobre o biofilme de *C. albicans*. Média da Densidade óptica (% de inibição) \pm desvio padrão. * Indica que houve diferença estatística entre os grupos analisados em relação ao controle. Letras "a, b" indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

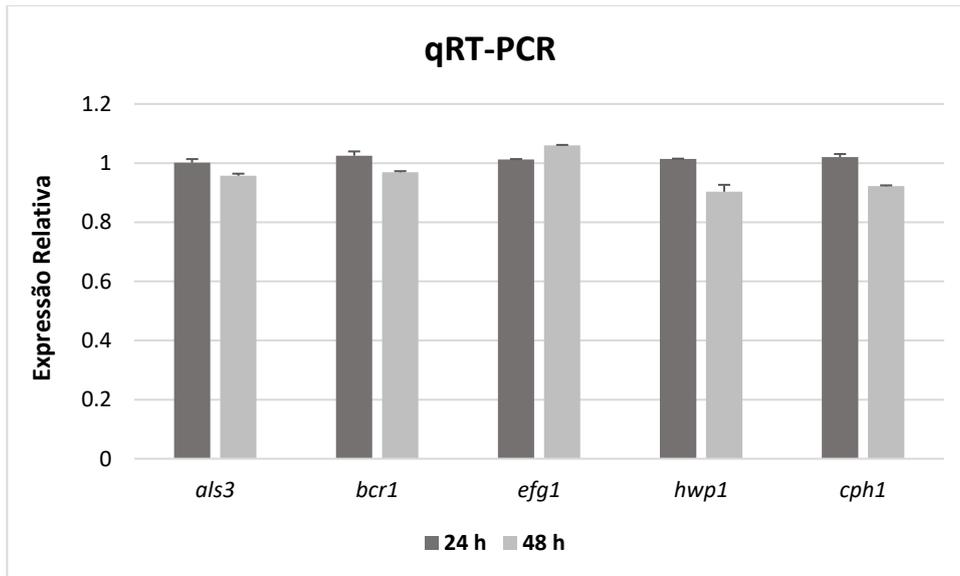


Figura 4. Expressão gênica diferencial de transcritos de *Candida albicans* após tratamento com água ozonizada na concentração de 70 µg/mL, nos tempos de 24 e 48 h. A partir do uso da técnica de PCR em tempo real, a expressão relativa de transcritos dos genes *als3*, *bcr1*, *cph1*, *efg1* e *hwp1*. Os dados foram normalizados usando o gene constitutivo que codifica para *act1* como controle endógeno, e são apresentados como expressão relativa comparando com cada controle experimental fixado no valor 1. Teste *t* Student foi usado para análise estatística para comparação entre 2 médias considerando bicaudal. As barras de erro representam o desvio padrão das três réplicas biológicas.

CONCLUSÃO

- A água ozonizada se mostrou efetiva na redução parcial do biofilme de *C. albicans*, com diminuição no número de células, biomassa e atividade metabólica, no entanto, em comparação ao NaOCl, esses resultados foram menos expressivos, pois o NaOCl eliminou quase totalmente o biofilme.
- A análise de expressão gênica mostrou pequena redução no tempo de 48 h de tratamento com água ozonizada para os genes *als3*, *bcr1*, *hwp1* e *cph1*. Em termos transcricionais essas diferenças não são significantes, sugerindo que a água ozonizada pode atuar na expressão de outros genes funcionais de *C. albicans*, não envolvidos na formação do biofilme.
- Podemos dizer também que, com base nos resultados obtidos, a AO mostrou efetividade para a redução de *C. albicans*, embora menor que o NaOCl, sugerindo que esta possa ser utilizada como adjuvante no tratamento de biofilmes de *C. albicans*, principalmente em casos em que o NaOCl não possa ser utilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP (2021) *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit Rev Microbiol* 47, 91–111.
2. Arita M, Nagayoshi M, Fukuizumi T, Okinaga T, Masumi S, Morikawa M et al. (2005) Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral microbiol immunol* 20, 206–210.
3. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M (2004b) Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 30, 778–781.
4. Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4, 119–128.
5. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL (2005) *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell* 4, 633–638.
6. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA et al. (2006). Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 39, 10–17.
7. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2007) Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J* 18, 294–298.
8. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozłowski A, Brandt M (2004) Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J* 37, 272–280.
9. Goswami M, Chhabra N, Kumar G, Verma M, Chhabra A (2014) Sodium hypochlorite dental accidents. *Paediatr Int Child Heal* 34, 66–69.
10. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, De Souza-Filho FJ (2004) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 97, 79–84.
11. Restaino L, Frampton EW, Hemphill JB, Palnikar P (1995) Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 61, 3471–3475.
12. Holmes J (2003) Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology* 20, 106–114.
13. Boch T, Tennert C, Vach K, Al-Ahmad A, Hellwig E, Polydorou O (2016) Effect of gaseous ozone on *Enterococcus faecalis* biofilm—an in vitro study. *Clin Oral Investig* 20, 1733–1739.

14. Ebensberger U, Pohl Y, Filippi A (2002) PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination. *Dent Traumatol* 18, 262–266.
15. Pivotto AP, Banhuk FW, Staffen IV, Daga MA, Ayala TS, Menolli RA (2020) Clinical uses and molecular aspects of ozone therapy: a review. *J Health Biol Sci* 20, 37-49.
16. Celiberti P, Pazera P, Lussi A (2006) The impact of ozone treatment on enamel physical properties. *Am J Dent* 19, 67–72.
17. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E et al. (2009) Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J* 42, 3–13.
18. Hubbezoglu I, Zan R, Tunc T, Sumer Z (2014) Antibacterial efficacy of aqueous ozone in root canals infected by *Enterococcus faecalis*. *Indian J Med Microbiol* 7, e11411.
19. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ et al. (2001) Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* 80, 903–908.
20. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J (2009) Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol* 47, 681-689.
21. Wang H, Wang F, Tao X, Cheng H (2012). Ammonia-containing dimethyl sulfoxide: an improved solvent for the dissolution of formazan crystals in the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. *Anal Biochem* 421, 324–326.
22. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25, 402–408.
23. Suh Y, Patel S, Kaitlyn R, Gandhi J, Joshi G, Smith NL et al. (2019) Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Med Gas Res* 9, 163–167.
24. Sadatullah S, Mohamed NH, Razak FA (2012) The antimicrobial effect of 0.1 ppm ozonated water on 24-hour plaque microorganisms in situ. *Braz Oral Res* 26, 126-131.
25. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA (2017) Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res* 7, 212–219.
26. Cattel F, Giordano S, Bertiond C, Lupia T, Corcione S, Scaldaferrri M et al. (2021) Ozone therapy in COVID-19: A narrative review. *Virus research*, 291, 198207.
27. Kaya BU, Kececi AD, Gültaş HE, Çetin ES, Ozturk T, Oksüz L et al. (2014) Efficacy of endodontic applications of ozone and low-temperature atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Lett Appl Microbiol* 58, 8-15.

28. Noites R, Pina-Vaz C, Rocha R, Carvalho MF, Gonçalves A, Pina-Vaz I (2014) Synergistic antimicrobial action of chlorhexidine and ozone in endodontic treatment. *BioMed res. int.* (Online) 592423.
29. Weavers LK, Wickramanayake GB (2001) Disinfection and Sterilization Using Ozone. In: *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5 th edition. S. S. Block (ed.). New York, Lippincott Williams & Wilkins.
30. Kim JG, Yousef AE, Khadre MA (2003) Ozone and its current and future application in the food industry. *Adv Food Nutr Res* 45, 167-218.
31. Wysok B, Uradziński J, Gomółka-Pawlicka M (2006) Ozone as an alternative disinfectant – A review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 15/56(1): 3–8.
32. Khadre MA, Yousef AE, Kim JG (2001) Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *J Food Sci* 66, 1242-1252.
33. César J, Sumita TC, Junqueira JC, Jorge AO, do Rego MA (2012) Antimicrobial effects of ozonated water on the sanitization of dental instruments contaminated with *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, or the spores of *B. atrophaeus*. *J Infect Public Health* 5, 269-274.
34. Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM (2021) Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol* 131(1):11-22.
35. Romera D, Aguilera-Correa JJ, Gadea I, Viñuela-Sandoval L, García-Rodríguez J, Esteban J (2019) *Candida auris*: a comparison between planktonic and biofilm susceptibility to antifungal drugs. *J Med Microbiol* 68, 1353-1358.
36. Rajendran R, May A, Sherry L, Kean R, Williams C, Jones BL et al. (2016) Integrating *Candida albicans* metabolism with biofilm heterogeneity by transcriptome mapping. *Scientific Reports*, 6, 35436.
37. Maiti P, Ghorai P, Ghosh S, Kamthan M, Tyagi RK, Datta A (2015) Mapping of functional domains and characterization of the transcription factor Cph1 that mediate morphogenesis in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, 83, 45–57.
38. Nobile CJ, Mitchell AP (2006) Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cellular Microbiology* 8, 1382–1391.
39. Shichiri-Negoro Y, Tsutsumi-Arai C, Arai Y, Satomura K, Arakawa S, Wakabayashi N (2021) Ozone ultrafine bubble water inhibits the early formation of *Candida albicans* biofilms. *PloS one*, 16, 0261180.
40. Nailis H, Kucharikova S, Ricicova M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H et al. (2010) Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiol* 16;10:114.

ANEXOS

9.1 Instruções para os Autores do Periódico Journal of Oral Science



October 2022

Journal of Oral Science Instructions to Contributors

Policy

The Journal is produced quarterly by Nihon University School of Dentistry for the purpose of publishing original articles, short communications, invited reviews, and case reports pertinent to dentistry and related fields. All papers are subjected to peer-review. Issue contents are available online ([https:// www.jstage.jst.go.jp/browse/josnurd/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/josnurd/)).

Submission of manuscripts

Manuscripts that are being submitted should be complete in all respects, and deal with original material not previously published, or being considered for publication elsewhere. The original, written in English, complete with tables and/or figures, should be submitted to the JOS manuscript submission site (<https://mc.manuscriptcentral.com/josnurd>). The preferred storage medium is a file in MS Word format. In accordance with the journal's copyright, all manuscripts must be accompanied by the Affirmation of Originality and Assignment of Copyright Form signed by all authors.

If accepted, the manuscript should not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editor and Publisher. Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a Transfer of Copyright Agreement form.

Ethics

Manuscripts that reveal a lack of proper, ethical consideration for human subjects or experimental animals will not be accepted for publication. The authors must declare that all experiments on human subjects were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net>) and that all procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the subjects. The authors must also certify that formal approval to conduct the experiments described has been obtained from the human subjects review board of their institution and could be provided upon request.

All animal experiments should be carried out in accordance with institutional and national guidelines for the care and use of experimental animals that are in compliance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. Manuscripts should be accompanied by a statement that all efforts were made to minimize animal suffering, to reduce the number of animals used, and to utilize alternatives to in vivo techniques, if available. The name of IRB and approval code/reference number must be provided in the Materials and Methods section.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Style of manuscripts

General

Manuscripts should be prepared with 1.5- or double-spacing on A4 or Letter size MS Word file with ample margins (at least 2.5 cm) on all four sides. A standard 12-point font should be used.

Number pages at the bottom, as follows:

Page 1

The manuscript title must not include a subtitle, punctuation symbols, or any trade names of experimental materials.

Title Page: complete title; first name, middle initial, surname of each author where the work was done; mailing address, FAX number, and e-mail address of the corresponding author.

Use of punctuation symbol, question mark, or setting subtitle is not allowed for the JOS article title.

Statements about equal contributions by two or more authors are not permitted.

Page 2

Abstract: not more than 200 words, followed by 3 to 6 keywords. Prepare a structured abstract only for the original article with sub-heading; Purpose, Methods, Results, and Conclusion.

Beginning on page 3:

Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, Conflict of interest, References, Tables, Figures and Figure legends. All pages should be numbered consecutively and stored in one file, the title page being page 1.

Materials and Methods

Give manufacturer's name and location (city, country) in parentheses for reagents and instruments; e.g. "The composite (Clearfil Majesty, Kuraray Medical Inc., Tokyo, Japan)..." Quantitative results must be supported by appropriate experimental design, statistical tests, and *P*-values.

References

References should be limited to less than 40 for original articles. They should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. References should include the beginning and ending page numbers. Identify tables and figures within the text by Arabic numbers in parentheses such as (Table 1), (Fig. 2), and (Figs. 3-5). References should be identified in the text by Arabic numbers in square brackets such as [1], [2,3], and [1,3,4-8]. Use the style of the examples below. Abbreviations of journals should conform to those of Index Medicus.

Sample
references
[Journals]

1. Goh V, Hassan FW, Baharin B, Rosli TI (2022) Impact of psychological states on periodontitis severity and oral health-related quality of life. *J Oral Sci* 64, 1-5.
List all authors when six or fewer (Ex. Ref. 1); when seven or more, list first six and add et al. (Ex. Ref. 2).
2. Lotif MAL, Valadas LAR, Fechine FV, Fonseca SGC, Bandeira MAM, Dantas TCFB et al. (2022) A double-blind randomized clinical trial of Brazilian red propolis dentifrice efficacy in orthodontic patients. *J Oral Sci* 64, 28-32.
3. Takeuchi Y, Koizumi H, Imai H, Furuchi M, Takatsu M, Shimoe S (2022) Education and licensure of dental technicians. *J Oral Sci*, Jul 16, doi: 10.2334/josnusd.22-0173.

[Others]

4. International Organization for Standardization (2009) *Dentistry--Polymer-based restorative materials*. ISO 4049:2009, Geneva.
5. Ibaragi K, Kazama H, Oguri M (2003) Dental catalyst for chemical polymerization and use thereof. US Patent 6660784 B2, Dec 9.

Abstracts, websites, and books cannot be cited in the reference list. They may be cited within the text in square parentheses or in the table.

Ex: in the text [Kojima K et al., *J J Dent Mater* 6(Spec 10): 112-3, 1987]

Advance publications may be cited in the reference list (Ex. Ref. 3). Articles written in languages other than English should be avoided. The author(s) has(ve) the responsibility for correct citation of the references.

Figures and tables

Figures will be published in color in the online version with no charge, even though the color illustrations are produced in black and white in the printed issue. Each illustration should be numbered consecutively with Arabic numbers and accompanied by a legend clearly describing it. All illustrations must be submitted in a form and condition suitable for reproduction either across a single column (=8.8 cm) or a whole page (=18.4 cm). Each table should be clearly titled and provided with a comprehensive legend. Statistical measures of variation, SD, SEM etc. should be identified. Tables should be numbered separately in Arabic numbers (Table 1, 2 etc.).

Case Report

The journal only publishes case reports if they deal with new scientific hypotheses on known diseases or represent new disease entities or cases with a highly unusual appearance or extremely rare cases.

1. Number of authors: limit to six or less.
2. Abstract: describe how the case is unique (not more than 100 words).
3. Introduction: State why the case needs to be reported.

4. Case Report: give a short description of the case with documentations.
5. Discussion: describe what makes the case novel from past reports.
6. References: not more than 10 references.

Short Communication

The journal publishes short communications with new information.

1. Number of authors: limit to six or less.
2. Abstract: not more than 100 words.
3. Text: approximately 2,000 words including abstract and legends.
4. Discussion: describe what makes the report novel.
5. The total number of tables and figures should not exceed four (4).
6. References: not more than 10 references.

Language and editing service

Prepare the text, tables, and figures in American or British English. Authors who feel their English language manuscript may require editing should use an English language editing service available from a native English-speaking person/company. Certification of language editing should be submitted if the authors used an editing service.

Proof

Proofs will be sent to the authors. Only printer's errors must be corrected; no change in, or additions to, the edited manuscript will be allowed at this stage. The corrected proofs must be returned within 2 days of receipt, preferably by e-mail. If the Editor receives no reply after approximately 2 weeks, the assumption will be made that there are no errors to correct and the article will be published after in-house correction.

Publication fee and reprints

After acceptance of each article, the authors will be charged for publication; JPY 22,000 per article (limit 4 pages). The charge for extra pages exceeding the limit of 4 is JPY 5,500 per page. There is no submission/reviewing charge for the peer review process. Payment can be accepted by credit card only. Please note that articles will not be published until the required payments are fully paid. Reprints are not available from the publisher.

Copyright and Permission

All accepted manuscripts become the property of Journal of Oral Science.

Articles published in Journal of Oral Science after January 2023 are licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0).

Anyone may download, reuse, copy, reprint, or distribute the article marked by the CC BY-NC-ND 4.0 without modifications or adaptations for non-commercial purposes if they cite the original authors and source properly.

Commercial photocopying and re-using

If you wish to photocopy or re-use any work in the Journal of Oral Science commercially, permission must be obtained from the following organization to which licensing of copyright clearance is delegated by the copyright owner.

Japan Academic Association for Copyright Clearance, Inc.
(JAACC)6-41 Akasaka 9-chome, Minato-ku, Tokyo 107-0052
Japan
Phone: +81-3-3475-5618 FAX: +81-3-3475-5619
E-mail: info@jaacc.jp

Inquiries should be addressed to:

Editorial Office, Journal of Oral Science, Nihon University School of
Dentistry, 1-8-13 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan
E-mail: jos@nihon-u.ac.jp