

**UNIVERSIDADE BRASIL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS ITAQUERA**

PÂMELA PETRÂNGELO ESPINDOLA

**OZONIOTERAPIA COMO UM POSSÍVEL TRATAMENTO PARA
DERMATOFITOSSES: ESTUDO *IN VITRO***

Itaquera – SP
2023

CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

PÂMELA PETRÂNGELO ESPINDOLA

OZONIOTERAPIA COMO UM POSSÍVEL TRATAMENTO PARA DERMATOFITOSSES: ESTUDO *IN VITRO*

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Profa. Dra. Ma. Livia Assis Garcia
Orientadora

Itaquera – SP
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

E75o ESPINDOLA, Pâmela Petrângelo.

Ozonioterapia como um possível tratamento para dermatofitoses: estudo *in vitro* – revisão de literatura / Pâmela Petrângelo Espindola. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2023.
30 f. il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso de Medicina Veterinária da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Ma. Lívia Assis Garcia.

1. Ozonioterapia 2. *Microsporum gypseum*. 3.
Dermatofitose. I. Garcia, Lívia Assis. II. Título.

CDD 615.83

TERMO DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me dar a oportunidade de realizá-lo e por me proporcionar mais uma formação. Dedico também, aos meus pais que sempre me apoiaram ao longo desta jornada e a todos que de alguma forma foram importantes e essenciais para que este sonho pudesse ser concretizado.

Obrigada Deus, Jesus e Espírito Santo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira a Deus por sua generosidade, amor e paciência comigo. Sou grata por Ele nunca desistir de mim e me dar todas as oportunidades e ferramentas necessárias para que eu possa realizar sempre meus sonhos.

Agradeço minha orientadora por sua dedicação, paciência e orientação em cada momento e processo realizado. Obrigada a todos meus professores, colegas e amigos que fiz nesta jornada.

Agradeço a instituição Universidade Brasil pela oportunidade de ensino, estágio e de formação, bem como, pelo apoio, incentivo e bolsa recebida como aluna de Iniciação Científica.

Agradeço também meus pais, minha família e amigos que sempre me apoiam e acreditam que eu posso ser e estar onde desejar. Com muita luta, lágrimas e sorrisos... concluo mais uma página na minha vida e a encerro com gratidão e orgulho. E agora?! Bora pra próxima!

“Porque assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos, mais altos do que os vossos pensamentos.” Isaías 55:9.

Obrigada Deus, Jesus e Espírito Santo!

RESUMO

A dermatofitose é uma infecção fúngica, predominantemente causada por dermatófitos como o *Microsporum gypseum*, e é uma condição notoriamente difícil de tratar. Atualmente, cães e gatos estão sendo cada vez mais inseridos como membros familiares na vida humana, e isto, se dá devido sua importante relação afetiva e seus inúmeros benefícios. No entanto, eles podem ser portadores sintomáticos e assintomáticos de patógenos zoonóticos. O objetivo deste trabalho foi a avaliação e comparação, *in vitro*, do potencial antimicrobiano da ozonioterapia na técnica tópica (Bag) com diferentes concentrações em *M. gypseum*. Foram utilizados fungos dermatófitos *M. gypseum* (ATCC 24102) incubados a 28° C por 14 dias. Posteriormente, foram divididos em 4 grupos experimentais de acordo com a dose de ozonioterapia utilizada: GC (controle sem ozonioterapia); G10 (placa ozonizada na concentração de 10 µg/ml); G30 (placa ozonizada na concentração de 30 µg/ml) e G60 (placa ozonizada na concentração de 60 µg/ml). A aplicação foi realizada utilizando aparelho portátil de ozonioterapia – Ozônio Line®, durante 30 minutos. Após 24 horas, foram realizadas as contagens dos conídios através de microscópio óptico. Os principais resultados mostraram que o uso da ozonioterapia tópica foi eficaz em reduzir a porcentagem de germinação de *M. gypseum* em todos as doses. No GC houve crescimento normal do fungo. No grupo com concentração de 10 µg/ml foi observada redução da germinação (G10). No grupo com 30 µg/ml foi observada ausência de germinação e foi identificado detritos celulares (G30). Já no grupo com a dose de 60 µg/ml, houve uma erradicação completa do fungo (G60). Assim, pode-se concluir que a ozonioterapia utilizada de maneira tópica com destaque para a maior dose promoveu ação antifúngica sobre um dos principais dermatófitos responsáveis por complicações críticas das dermatofitoses, podendo ser proposto como um coadjuvante em tratamentos clínicos na medicina veterinária.

Palavras-chave: Ozonioterapia. *Microsporum gypseum*. Dermatofitose.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
<i>et al.</i>	E outros
G10	Grupo 10
G30	Grupo 30
G60	Grupo 60
GC	Grupo Controle
<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporum gypseum</i>
<i>M. canis</i>	<i>Microsporum canis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogênico
Prof	Professor
PVC	Policloreto de Vinila
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
<i>sp.</i>	Espécie
XIX	Dezenove

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
≤	Menor ou Igual
%	Porcentagem
cm	Centímetro
g	Gramma
HCl	Ácido Clorídrico
KOH	Hidróxido de Potássio
ml	Mililitro
N°	Número
NaOH	Hidróxido de Sódio
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
p	Probabilidade
µg/ml	Microgramas por Mililitro
µl	Microlitro
x	Veze

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 MATERIAIS.....	17
3.2 PREPARO DO MEIO DE CULTURA	17
3.3 PREPARO DA SUSPENSÃO DOS FUNGOS	17
3.4 PROTOCOLO DE OZONIOTERAPIA.....	20
3.5 CONTAGEM DE CONÍDIOS.....	20
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4 RESULTADOS.....	20
5 DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, cães e gatos estão sendo cada vez mais inseridos como membros familiares na vida humana. Isto se dá devido sua importante relação afetiva e seus inúmeros benefícios, no entanto, eles podem ser portadores sintomáticos e assintomáticos de patógenos zoonóticos (OLIVEIRA *et al.*, 2015; OSAKI *et al.*, 2018). As zoonoses são infecções naturalmente transmitidas entre animais e seres humanos de forma direta ou indireta. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), elas representam mais de 60% das doenças infecciosas em humanos e manifestam-se principalmente em países tropicais e semitropicais, como o Brasil (CRMVSP, 2022; OSAKI *et al.*, 2018; PAVANELLI *et al.*, 2019).

Dentre as zoonoses, as dermatofitoses estão entre as principais patologias. São infecções contagiosas causadas por fungos dermatófitos que acometem as camadas superficiais de tecidos queratinizados e semi-queratinizados, como pele, pelos e unhas. São as mais comuns entre os gatos. Tem como origem as espécies *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (THOMAS *et al.*, 1989; MILLER *et al.*, 2013; MORIELLO, 2014; ROSSI & ZANETTE, 2018). Cerca de 40% da população humana são afetados e representam 30% das infecções fúngicas cutâneas. Hoje, são responsáveis por uma das dermatopatias mais comuns que prejudicam a qualidade de vida entre os cães e gatos (KASZUBA, A., SENEZKO, F. & LIPOWCZAN, 1998 apud JERICÓ, M. M., NETO, J. P DE A., KOGIKA, 2015).

Estima-se que de 10 a 15% dos seres humanos se infectarão em algum momento de sua vida (CORDEIRO, 2015). As dermatofitoses são antroponoses, causam afecções que acometem primariamente os animais e podem ser transmitidas ao homem via contato direto dos esporos fúngicos (BETANCOURT *et al.*, 2009; WALLER *et al.* 2014). Os felinos são considerados os maiores transmissores (BOND, 2010).

No Brasil, cerca de 30% das dermatites são causadas por dermatófitos. O *Microsporum canis* aparecem em 92% dos casos de dermatofitoses em gatos, já nos cães é de 65% (GAMBALE *et al.*, 1987). Estudos demonstram que cães e gatos são portadores assintomáticos de *M. canis*, com prevalência de 4 a 9% entre os cães e de 17 a 80% entre os gatos (VIANIL *et al.*, 2001; SCOTT, MILLER, GRIFFIN, 2001).

Em Bari (Itália), um estudo relatou o *Microsporum canis* isolado em 36,4% dos cães e 53,6% em gatos que conviviam com seus tutores com diagnóstico de *Tinea*

corporise e em 14,6% dos gatos em que seus tutores não tinham sinal da doença. Demonstrando assim, que cães e gatos representam uma das principais fontes de fungos dermatofíticos para o homem (CAFARCHIA *et al.*, 2006).

Relata-se maior índice assintomáticos em felinos devido sua imunidade adquirida por infecções primárias ou por cepas menos virulenta que causam alterações leves (SCOTT, MILLER, GRIFFIN, 2001). Ocorre uma variação entre os estudos no isolamento destes fungos, onde, segundo Roehe (2014) o *Trichophyton mentagrophytes* tem os cães e gatos como hospedeiro mais comum e estão presentes em 1,7 a 24% dos casos confirmados em cães e de 1,6 a 13,6% em gatos.

De acordo com o estudo de Balda *et al.* (2018) que objetivou determinar a presença do *Microsporum sp.* e *Trichophyton* entre animais com e sem raça definida, verificou-se maior predominância entre cães de raça definida (75%), sendo o Yorkshire Terrier 23,3% destes. Já em gatos, foram igualmente associados. Clinicamente se apresentaram como alopecia, eritema, escamas, crostas e prurido em apenas 50% dos cães e em 11,2% nos gatos.

Em outro estudo realizado no Ceará (Brasil), foi relatado a presença de dermatófitos em 14,3% nos cães e em 36,8% em gatos, sendo o *M. canis* o mais comum em 95% dos casos, o *M. gypseum* em 2,5% e *Trichophyton mentagrophytes var. mentagrofítes* em 2,5%. Dentre os achados, o *M. canis* está presente em 92,6% dos cães e em 100% dos gatos (BRILHANTE *et al.*, 2003). No estado de São Paulo estão presentes em 30% dos animais atendidos e 13% no Rio de Janeiro (RAMADINHA *et al.*, 2010).

As dermatopatias representam cerca de 30 a 40% dos atendimentos clínicos em pequenos animais (WILLEMSE, 2002). Sendo o maior e um dos principais órgãos, a pele tem como função a proteção anatômica e fisiológica contra agentes e ameaças ambientais. Fatores endógenos e exógenos podem comprometer a pele e por ela estar mais exposta, as afecções é de fácil percepção. Assim, as dermatopatias contribuem para o crescimento e desenvolvimento da área dermatológica veterinária, sendo de grande importância para saúde humana e animal (MILLER *et al.*, 2013).

Para se instalarem e causarem infecções, os dermatófitos adentram a epiderme e passam a resposta imune através de substâncias, principalmente queratolíticas. Nas infecções por *Trichophyton mentagrophytes* ocorre forte hipersensibilidade cutânea, já na *M. canis*, ocorre reação intensa da resposta

inflamatória (VIANIL *et al.*, 2001; ELEUTERIO *et al.*, 1973). A relação das atividades enzimáticas e reações teciduais ocorre pelo fator antigênico das enzimas, quanto maior grau de inflamação, mais rápida será a resolução e quanto menor, mais lentas. Isto, devido ao processo inflamatório levar a renovação celular que conseqüentemente, promove a eliminação do fungo (VIANIL *et al.*, 2001; DEBOER & MORIELLO, 1993).

As manifestações clínicas variam de acordo com a resposta imune do hospedeiro. Apresentam-se de forma clínica a partir de eritemas, pequenas vesículas papulares, fissura e escamação. Manifestam-se de forma diferente de acordo com o fungo transmissor, podendo estar em lugares diferentes do corpo. Classificadas de acordo com a região que ela acomete, podem ser granulomatosas ou inflamatórias (DICIONÁRIO DERMATOLÓGICO, 2009). Alopecia, eritema, crostas e escamação da pele são os sinais clínicos mais comuns nos seres humanos (BOND, 2010). Em cães ocorre descamação, alopecia, crostas, pápulas foliculares, pústulas e lesões anulares. Em gatos, observa-se regiões irregulares ou anulares de alopecia, com ou sem descamação (SCOTT, MILLER, GRIFFIN, 2001).

O diagnóstico se dá por meio de diversas técnicas laboratoriais. A forma direta se dá por meio da retirada de pelos no centro da lesão e posterior visualização em microscópio, após, clareados por uma solução de KOH a 20%, levemente aquecidos, na busca por artroconídios formadores de cachos fora ou dentro do pelo. A lâmpada de *Wood* pode ser utilizada, porém, ainda há discordância na relação positivo e negativo. Por cultura, utiliza-se o meio de avulsão dos pelos e raspados de pele, mas o longo período de crescimento *in vitro* dificulta o uso. No histopatológico, os tecidos corados com prata metenamina ou PAS (*Periodic Acid Schiff*) são possíveis observar partículas fúngicas, além de reações inflamatórias e hiperqueratose de epiderme e folículos pilosos. Já as técnicas moleculares, esta visa identificar o gene fúngicos por PCR, porém, são pouco utilizadas por seu alto custo (LACAZ *et al.*, 1991; GROSS, 2005; KANO *et al.*, 2002).

Por serem diagnosticada apenas por achados clínicos externos, admite-se que sua frequência seja muito maior do que os registros e pesquisas apontam (NEVES *et al.*, 2011). Assim, as dermatopatias contribuem para o crescimento e desenvolvimento da área dermatológica veterinária, sendo de grande importância para saúde humana e animal (HILL *et al.*, 2006).

O tratamento pode ser realizado de forma tópica com antifúngicos (Anfotericina B, Miconazol, Cetoconazol e Terbinafina), antissépticos (Clorexidina e substâncias queratolíticas) ou de forma sistêmica com antifúngicos (Griseofulvina, Itraconazol e Cetoconazol). Manejo e desinfecção ambiental são importantes, além da separação dos indivíduos doentes dos hígidos (SCOTT, MILLER, GRIFFIN, 2001).

A prevenção se dá por meio de higiene dos hospedeiros e ambientes, pois os esporos dermatófitos resistem até 18 meses no ambiente. As vacinas não apresentaram relevância na proteção, apenas minimizam a resposta inflamatória, o que causa melhor conforto ao paciente e maior permanência do fungo na epiderme (JERICÓ, NETO, KOGIKA, 2015).

O ozônio (O_3) é um gás natural atmosférico descoberto no século XIX e possui uma forma triatômica de oxigênio com estrutura dinamicamente instável devido à presença de estados mesoméricos e possui odor característico (SRIKANTH *et al.*, 2013; HÄNNINEN 2019; ELVIS & EKTA, 2011). Sua função na atmosfera é formar uma camada que filtra as radiações ultravioletas e é considerado um poluente obtido a partir da reação entre óxidos de nitrogênio e luz solar (LANGE *et al.*, 2018).

A terapia através do ozônio, ozonioterapia, vem sendo muito utilizada na medicina humana e veterinária (mistura de O_3 e O_2), pois entende-se que o mesmo pode causar oxidação leve e transitória a nível celular e desencadear efeitos terapêuticos celulares (CASO *et al.*, 2012). Esse processo gera aumento na disponibilidade de oxigênio e ATP para a atividade celular (BAYSAN & LYANH, 2016). Muitos estudos vêm sendo realizados com o ozônio a partir da ozonioterapia, demonstrando e comprovando de forma consistente suas funções antioxidantes e seu efeito imunoestimulante, com efeitos colaterais mínimos, possibilitando sua ampla utilização (ELVIS & EKTA, 2011; NOGALES *et al.*, 2008).

Ainda, a ação antimicrobiana do ozônio tem sido referenciada na literatura desde o início de sua utilização em soldados alemães que sofriam de gangrena gasosa durante a Primeira Guerra Mundial devido ao seu forte efeito bactericida sobre *Clostridium* anaeróbico (DI PAOLO, BOCCI & GAGGIOTTI, 2004; TRAVAGLI *et al.*, 2010). A justificativa de sua utilização é devido ao fato de o gás gerar os radicais livres de oxigênio liberados pelo ozônio, atuando assim, como um forte

oxidante para matar diretamente micro-organismos (MERHI *et al.*, 2019; MURPHY *et al.*, 2016).

Diante de seus benefícios, esta terapia vem sendo empregada na medicina humana no tratamento de diversas patologias como abscessos, acne, eczema, psoríase, vírus da imunodeficiência humana e síndromes de imunodeficiência adquirida, fibromialgia, artrite, asma, câncer, inflamação, doença cardíaca, distúrbios hepáticos, uveíte, cistite, feridas crônicas, dislipidemia, osteomielite, doença de Raynaud, doença de Parkinson, sepse, sinusite, cárie dentária, infecções da cavidade oral, pé diabético e hérnias de disco vertebrais (BAYSAN & LYNCH, 2005; RE *et al.* , 2008; MERHI *et al.*, 2019; MURPHY *et al.*, 2016).

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar, *in vitro*, o potencial antimicrobiano da ozonioterapia em Bag com diferentes concentrações em *Microsporum gypseum* (fungo dermatófito).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, foi realizado o cultivo do fungo *Microsporium gypseum*. Após seu crescimento, ele foi separado em placas e identificados em diferentes grupos, na qual, cada um deles foram submetidos a ozonioterapia na técnica de Bag com diferentes concentrações, pelo mesmo período de exposição. Além, de um grupo controle sem o uso do ozônio. Por fim, posteriormente a aplicação do gás, todas as placas foram observadas, analisadas e comparadas quanto a germinação dos conídios presentes (BMM, 2019; TOOME, 2021).

3.1 Materiais

Foi utilizado o isolado de fungo *Microsporium gypseum* (ATCC 24102) crescidos em placas de Petri no meio de cultura SDA - *Sabouraud Dextrose Agar*. Para a aplicação do gás ozônio foi utilizado um equipamento de ozonioterapia portátil – Ozônio Line®, através da técnica de Bag. A observação e contagem dos conídios foi realizada por microscopia óptica (BMM, 2019).

3.2 Preparo do meio de cultura

Foram preparados 140 ml do meio SDA. Para 140 ml de água destilada, foi utilizado 9,1g de SDA. Foi acrescentado 1,4 ml de Benomyl 0,001% no meio de cultura. A solução foi agitada e em seguida o pH do meio de cultura foi ajustado para 6,9. Foi utilizado NaOH – Hidróxido de Sódio e HCl – Ácido Clorídrico para fazer o ajuste do pH dos meios de cultura. Após ajuste do pH, o meio de cultura foi autoclavado a 120 °C por vinte minutos. Após a preparação do meio, ele foi distribuído em 14 placas de Petri de poliestireno (60 cm x 15 cm) sendo 10 ml em cada placa (BMM, 2019).

3.3 Preparo da suspensão dos fungos

Após o crescimento da colônia do fungo dermatófito *M. gypseum* (ATCC 24102) em placa de Petri por 14 dias a 28°C, foi realizada a preparação de suspensões contendo o fungo. Com o auxílio de uma espátula que favorece a retirada dos fungos presentes nas placas, foram colocados 6 ml da solução de Tween 80% na placa de Petri com o fungo em crescimento. Na sequência, essa

suspensão foi transferida para um tubo de ensaio contendo 4 ml de solução do Tween 80%. Na sequência foram aspirados 40 µl para a câmara de Neubauer para a conferência do número de conídios presentes na suspensão. Após a contagem dos conídios a suspensão foi ajustada a 1×10^5 conídios/ml. Com uso de uma pipeta foi adicionado 40 µl/ml de suspensão do fungo no centro da placa de Petri contendo o meio SDA. Após 30 minutos a placa foi submetida aos diferentes protocolos de ozonioterapia. Destaca-se que o fungo foi disponibilizado pelo Prof. Drauzio do Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Campus de São Paulo (BMM, 2019).

3.4 Protocolo de Ozonioterapia

A ozonioterapia foi realizada utilizando um aparelho de ozônio portátil (Ozônio Line®). O equipamento foi calibrado e passou por revisões periódicas de acordo com as recomendações do fabricante para evitar aplicações ou concentrações incorretas. Foram utilizadas concentrações diferentes de ozônio através da técnica de aplicação direta na placa usando bolsa plástica padronizada (Bag), com sonda de PVC Nº 16 estéril por radiação ionizante para evasão do gás e descartado após uso. A aplicação da ozonioterapia foi realizada durante 30 minutos com diferentes dosimetrias para cada grupo, sendo essas:

GC: grupo controle sem ozonioterapia;

G10: grupo com placa ozonizada da concentração de 10 µg/ml;

G30: grupo com placa ozonizada da concentração de 30 µg/ml;

G60: grupo com placa ozonizada da concentração de 60 µg/ml.

O ozônio é um gás altamente instável, produz odor característico, e é dissociado rapidamente em oxigênio quando exposto em temperatura ambiente. Para minimizar este problema a terapia foi administrada em uma sala com um sistema de ventilação e espaço devidamente arejado dentro da cabine de fluxo laminar, assim como, utilizado máscara de proteção durante todo experimento (TOOME, 2021).

3.5 Contagem de conídios

No período experimental de 24 horas após os tratamentos foram realizadas as contagens dos conídios através de microscopia óptica (TOOME, 2021).

3.6 Análise estatística

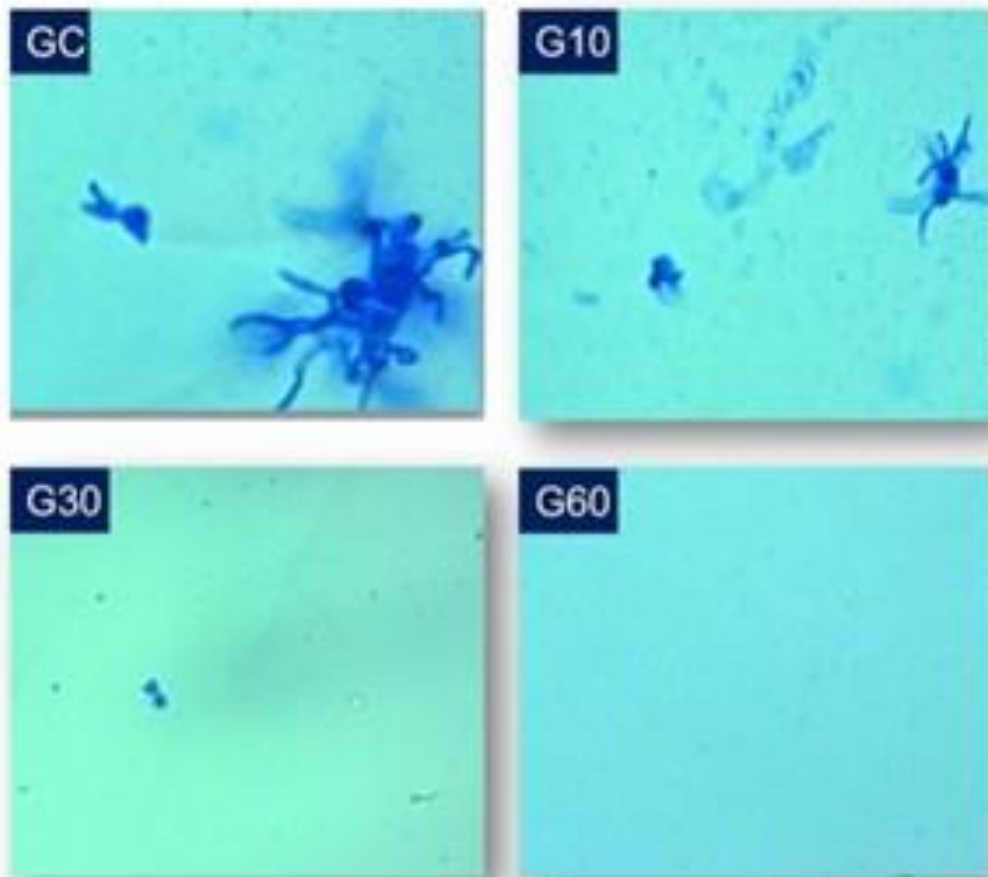
Os dados foram impostos estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações entre os grupos foram feitas utilizando *ANOVA One Way* com *post hoc* de *Tukey*. Nos casos não paramétricos, o teste de *Kruskall-Wallis* com *post hoc* de *Dunn* foi adotado. As análises foram realizadas no software *GraphPad Prism*, versão 6.01 (*GraphPad Software*, San Diego CA, EUA). Para as estatísticas das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) (COSTA, 2020).

4 RESULTADOS

A figura 1 representa a análise e comparação referente a germinação de conídios de *M. gypseum* (ATCC 24104) cultivados *in vitro* após a ozonioterapia nos diferentes grupos e concentrações.

Foi observado que no GC houve crescimento normal do fungo. Nos grupos tratados com ozônio na concentração de 10 µg/ml foi observada redução da germinação (G10). No grupo que houve o tratamento com 30 µg/ml foi observada ausência de germinação e foi identificado detritos celulares (G30). Já no grupo onde houve o tratamento com a dose de 60 µg/ml, ocorreu a erradicação do fungo (G60).

Figura 1 – Representação da germinação de conídios de *M. gypseum* (ATCC24104).



Fonte: Pessoal, (2023).

4 DISCUSSÃO

Considerando o grande interesse de muitos profissionais que buscam a fundamentação que norteia o uso da ozonioterapia na eliminação de fungos patogênicos, o presente estudo teve o intuito de avaliar a influência do gás ozônio tópico utilizada em doses de aplicações em um dos dermatófitos mais predominantes nas dermatofitoses. Os principais resultados mostram que o uso da ozonioterapia tópica foi eficaz em reduzir a porcentagem de germinação de *M. gypseum* em todas as doses, apresentando uma erradicação completa na concentração de 60 µg/ml (BOCCI *et al.*, 2009).

Para investigar os complexos mecanismos de eliminação de microorganismos presentes nas dermatofitoses, modelos *in vitro*, os fungos dermatófitos *M. gypseum* têm sido utilizados. Sabe-se que a patogênese da dermatofitose está diretamente relacionada a interação e adesão de fungos patogênicos aos tecidos do hospedeiro (VERMOUT *et al.*, 2018). A infecção pelos dermatófitos ocorre quando os artroconídios aderem a pele do hospedeiro, seguido de germinação e invasão de estruturas queratinizadas por hifas fúngicas. No modelo utilizado no presente estudo, ou seja, na inoculação dos fungos *M. gypseum*, foram originados biofilmes após o período experimental de 72 horas. De acordo com Percival *et al.* (2012), a formação de biofilmes oferece uma série de vantagens aos microorganismos, incluindo proteção contra o meio ambiente, comunicação microbiana, aumento da virulência, melhor cooperação metabólica, capacidade pronunciada de resistência a agentes antimicrobianos e defesa do hospedeiro. Todas essas características podem explicar a infecção persistente, resistência e o tratamento a longo prazo necessário para as dermatofitoses (VLASSOVA *et al.*, 2011). Ainda, a presença de biofilme é considerada um dos principais fatores que contribuem para a reincidência da infecção dermatofítica crônica (COSTA-ORLANDI *et al.*, 2014).

Devido às limitações de opções terapêuticas atuais, é claramente necessário estudos que objetivam investigar novas abordagens para tratar dermatofitoses na prática dermatológica. Contudo, padronizar protocolos para tratamento de determinados fungos, tendo em vista a grande variedade de espécies dentro da medicina veterinária. Sendo este, um tema de pesquisa contínuo devido ao grande número de espécies criadas hoje como pet, como por exemplo, répteis (lagartos, serpentes, quelônios e cágados), aves (papagaios, araras, calopsitas, galinhas e

tucanos) e mamíferos (cães, gatos, coelhos, ouriços, hamsters, chinchilas, porquinhos-da-índia e twister), entre outros animais que são acometidos por fungos (VERMOUT *et al.*, 2018; CAFARCHIA *et al.*, 2006).

Como citado anteriormente, é possível evidenciar os efeitos antimicrobianos do ozônio na inativação de bactérias, fungos, protozoários e vírus relatados por vários autores em diferentes situações clínicas, assim como, na desinfecção de ambientes e superfícies de interesse na rotina hospitalar e clínica médica veterinária (PERCIVAL *et al.*, 2012).

Sabe-se que devido à alta dissociação do O₃ e diferentes formas de administração da técnica, existe uma dificuldade de estabelecer uma padronização de parâmetros de tratamento a ser utilizado de maneira segura e efetiva. Assim, estudos que utilizaram a ozonioterapia, cujos métodos de determinação de concentração e tempo de ozonização não são claros, produzem resultados dúbios e passíveis de questionamentos, dificultando a desmistificação e consolidação da ozonioterapia como uma terapia integrativa na prática clínica (BOCCI *et al.*, 2009; VERMOUT *et al.*, 2018).

Além disso, os efeitos biológicos do ozônio podem ser duvidosos, dependendo de sua concentração e forma de aplicação. No presente estudo, o gás de ozônio aplicado através de Bag em todas as doses experimentais foram capazes de reduzir a porcentagem de germinação do dermatófito, inferindo que mesmo em baixas concentrações, o ozônio foi capaz de desempenhar um importante papel contra agentes específicos causadores de onicomicoses, entretanto, a erradicação completa foi com doses mais altas, sendo ela de 60 µg/ml (VERMOUT *et al.*, 2018; BOCCI *et al.*, 2009).

Com base no exposto, acredita-se que a redução da germinação e/ou erradicação dos fungos patogênicos após o uso da ozonioterapia tópica esteja baseada no princípio da pró-oxidação ocasionado pelo gás ozônio, quando o gás interage com a parede da estrutura fúngica como os lipídios de membrana lipídica, resulta na formação de espécies reativas de oxigênio e produtos de peroxidação lipídica altamente reativos e capazes de depletar importantes enzimas citosólicas dos micélios fúngicos e gerar citotoxicidade das celular, inibindo a germinação de esporose a formação de biomassa (BOCCI *et al.*, 2009).

5 CONCLUSÃO

A ozonioterapia utilizada de maneira tópica com destaque para a maior dose, promoveu ação antifúngica sobre um dos principais dermatófitos responsáveis por complicações críticas das dermatofitoses, podendo assim, ser proposta como um coadjuvante em tratamentos clínicos.

REFERÊNCIAS

- BALDA, A. C. *et al.* Estudo retrospectivo de casuística das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 133–140, 2018. DOI: 10.22456/1679-9216.16835. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/16835>. Acessado em: 15 de agosto de 2022.
- BAYSAN, A. & LYNCH, E. **The use of ozone in dentistry and medicine**. Prim. Dent. Care 12, 47–52. Bhatt, J., Bhat, A.R., Kuldeep, D., Amarpal, A., 2016. An overview of ozone therapy in equine-an emerging healthcare solution. J.E.B.A.S. 4, 203–210. 2005.
- BMM. Microbiologia Básica para Farmácia, 2019. Universidade de São Paulo. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4919326/mod_resource/content/1/Apostila%20BMM%200160%20-%20Diurno%202019%20Final.pdf. Acessado em: 15/03/2023.
- BETANCOURT, O. *et al.* Microsporium canis em gatos dermatologicamente sanos em Temuco, Chile. **Iberoamericana de Micologia**, v.26, n.3, p.206-210, 2009.
- BOCCI, V, *et al.* O paradoxo do ozônio: o ozônio é um oxidante forte e também um medicamento médico. **Med. Res. Rev.**, 29: 646-682, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/med.20150>>. Acessado em: 15 de maio de 2023.
- BOND, R. Superficial veterinary mycoses. **Clinics in Dermatology**, v.28, p.226-236, 2010.
- BRILHANTE, R. S. N. *et al.* High rate of Microsporium canis feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features. **Mycopathologia**, v. 156, n. 4, p. 303-308, 2003.
- CAFARCHIA, C. *et al.* Isolation of Microsporium canis from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with M. canistinea corporis. **Veterinary Dermatology**, v.17, n.5, p.327-331, 2006.
- CASO, P. D. *et al.* Tratamento de canal radicular biofilmes de *Enterococcus faecalis* com gás ozônio e ativação passiva por ultrassom. **J. Fim.** 38, 523-526. 2012.
- CORDEIRO, L. V. Perfil epidemiológico de dermatofitoses superficiais em pacientes atendidos em um laboratório da rede privada de João Pessoa-PB. **Universidade Federal da Paraíba**. 2015.
- COSTA, B. Z. **Atividade antidermatofítica do clioquinol combinado com ciclopirox e terbinafina em ensaios in vitro e ex vivo**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, 2020.

COSTA-ORLANDI, C. B. *et al.* *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-27, Jul 2014.

CRMVSP. CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Zoonoses correspondem a mais de 60% das doenças humanas.** Disponível em: < <https://crmvsp.gov.br/zoonoses-correspondem-a-mais-de-60-das-doencas-humanas/>>. Acessado em: 14 de agosto de 2022.

DEBOER J.; MORIELLO K. A. Humoral and immune responses to *Microsporum canis* in naturally occurring feline dermatophytosis. **J Med Veter Mycol.** 31:21-132. 1993.

DICIONÁRIO DE DERMATOLOGIA. Lidia Almeida Barros. **Dicionário de dermatologia** - São Paulo: Cultura Acadêmica, Editora UNESP, ISBN 978-85-7983-034-1. 2009.

DI PAOLO, N., BOCCI, V., & GAGGIOTTI, E. Ozone therapy. **The International journal of artificial organs**, 27(3), 168–175. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/039139880402700303>>. Acessado em 15 de agosto de 2022.

ELEUTERIO M. K. *et al.* Role of keratinases in dermatophytosis. 3. Demonstration of delayed hypersensitivity to keratinases by the capillary tube migration test. **Dermatologica.**147(4):255- 60. PMID: 4780776. 1973.

ELVIS, A. M. & EKTA, J. S. Ozonoterapia: uma revisão clínica. **J. Nat. Sci. Biol. Med.** 2, 66- 70. 2011.

GAMBALE W. *et al.* Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo. **Rev Fac Med Vet Zoot Univ São Paulo.** 24:187-91. 1987.

nm

GROSS T. L. L. Skin diseases of the dog and cat clinical and histopathologic diagnosis. 2nd ed. **Oxford: Blackwell Science**, p. 288-91. 2005.

HÄNNINEN, K. Contribuição de moléculas excitadas de ozônio e oxigênio para a formação da camada de ozônio estratosférico. **Ambiente.** Eco Res. 7, 121-134. 2019.

HILL, P. B. *et al.* Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. **Veterinary Record**, [s. l.]. v. 158, p. 533-539, 2006.

JERICÓ, M. M.; NETO, J. P DE A.; KOGIKA, M. M. **Dermatófitos. Tratado de medicina interna de cães e gatos.** - 1. ed. - Rio de Janeiro: Roca, pag. 2351, 2015.

KANO R. *et al.* Molecular identification of *Trichophyton rubrum* isolate from a dog by chitin synthase I (CHS I) gene analysis. **Med. Mycol.** 40:439-42. 2002.

KASZUBA, A., SENECKO, F. & LIPOWCZAN, G. Fungal flora in human skin and skin appendages infections in the region of Łódz, Poland. *Mycoses.* 41(5- 6):249-53. 1998. Apud: JERICÓ, M. M.; NETO, J. P. DE A.; KOGIKA, M. M. **Dermatófitos.**

Tratado de medicina interna de cães e gatos. - 1. ed. - Rio de Janeiro: Roca, pag. 2351, 2015.

LACAZ C. S.; PORTO E.; MARTINS J. E. C. Micologia médica – **Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** 8 a ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LANGE, S. S. *et al.* What are the net benefits of reducing the ozone standard to 65 ppb? An alternative analysis. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 15, 1586. 2018.

MERHI, Z. *et al.* Ozone therapy: a potential therapeutic adjunct for improving female reproductive health. **Med. Gas. Res.** 9, 101–105. 2019.

MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K. L. Fungal and Algal Skin Diseases. In **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology** (7^a ed.) Elsevier, St. Louis, Missouri, 2013.

MORIELLO, K. Feline dermatophytosis: Aspects pertinent to disease management in single and multiple cat situations. **Journal of Feline Medicine Surgery**, 16: 419-431, 2014.

MURPHY, K. *et al.* Percutaneous treatment of herniated lumbar discs with ozone: Investigation of the mechanisms of action. **J. Vasc. Interv. Radiol.** 27 1242–1250.e3. 2016.

NEVES, R. DE C. DA S. M. *et al.* Retrospectiva das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, nos anos de 2006 a 2008. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.8, p.1405-1410, ago, 2011.

NOGALES, C.G. *et al.* 2008. Ozone therapy in medicine and dentistry. **J. Contemp. Dent. Pract.** 9, 75–84. 2008.

OLIVEIRA, L. M. B. *et al.* Dermatofitose canina causada pelo fungo antropofílico *Trichophyton tonsurans* - Relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 1, p. 91-98. <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20150009>. 2015.

OSAKI, S. C.; SNAK, A.; PEREIRA, P. Considerações sobre zoonoses em cães e gatos. In: COSTA, M. T.; DAGNONE, A. S. **Doenças Infeciosas na Rotina de Cães e Gatos no Brasil.** 1^a ed. Curitiba: Medvep, 303p. 2018.

PAVANELLI, G. C. *et al.* Análise integrativa das principais zoonoses de ocorrência no Brasil. **Revista Valore.** n. 4, p. 302-309, 2019.

PERCIVAL, S.L. *et al.* A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. **Wound Repair Regen**, v. 20, n. 5, p. 647-57, 2012.

RAMADINHA, R. R. *et al.* Lufenuron no tratamento da dermatofitose em gatos? **Pesq. Vet. Bras**, v. 30, n. 2, p. 132-138, fevereiro, 2010.

RE, L. *et al.* Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. **Arch. Med. Res.** 39, 17–26. 2018.

ROEHE, C. **Gatos portadores de dermatófitos na região metropolitana de Porto Alegre RS, Brasil.** Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014.

ROSSI, C. N.; ZANETTE, M. F. Dermatofitose em cães. In: COSTA, M.T.; DAGNONE, A.S. **Doenças Infecciosas na Rotina de Cães e Gatos no Brasil.** 1ª ed. Curitiba: Med vep, 303p. 2018.

SCOTT D. W.; MILLER G. H.; GRIFFIN C. E. **Small animal dermatology.** 6th ed. Philadelphia: Saunders, 2001.

SRIKANTH, A. *et al.* Aplicação de ozônio no tratamento da doença periodontal. **J. Farmácia.** Ciência Bioaliada. 5, S89-S94. 2013.

TOOME, L. H.; MORAES, P. R. DE S. **Ozonioterapia no tratamento de infecções fúngicas.** In: Anais do 2º CONIGRAN - Congresso Integrado Unigran Capital. Anais. Campo Grande(MS) Unigran Capital, 2021. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/conigran2021/362553-OZONIOTERAPIA-NO-tratamento-de-infeccoes-fungicas>. Acesso em: 05/03/2023.

THOMAS, M. L. E.; SCHEIDT, V. J.; WALKER, R. L. Inapparent carriage of *M. canis* in cats. **The Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian,** v.11, n.5, p.563-570, 1989.

TRAVAGLI, V. *et al.* Ozônio e óleos ozonizados em doenças de pele: uma revisão. **Hindawi.** Vol. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2010/610418>>. Acessado em 15 de maio de 2023.

VERMOUT, S. *et al.* Pathogenesis. **Mycopathologia,** 166:267-275, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18478361>>. Acessado em: 5 de março de 2023.

VIANI F. C. *et al.* Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. **Med Mycol.** 39:463-8. 2001.

VLASSOVA, Natália *et al.* Novos horizontes para a microbiologia cutânea: o papel dos biofilmes nas doenças dermatológicas. **Jornal Britânico de Dermatologia,** v. 4, pág. 751-759, 2011.

WALLER, S. B. *et al.* Microsporose Canina e Humana: Um Relato de Caso Zoonótico. **Science And Animal Health,** v. 2, n. 2, p. 137-146, 2014.

WILLEMSE, T. **Dermatologia clínica de cães e gatos.** 2. ed. São Paulo: Manole, 2002.