

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA E
USO DE ANTIBIÓTICOS EM LESÕES PODAIS (Bumblefoot) EM PINGUINS
DE MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*)

CRISTIANE LASSÁLVIA NASCIMENTO

Dissertação apresentada junto
ao programa de Pós- Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
de título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Nascimento, Cristiane Lassálvia.

Estudo comparativo do efeito da terapia fotodinâmica e uso de antibióticos em lesões podais (Bumblefoot) em pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) / Cristiane Lassálvia Nascimento. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Roberto Teixeira

Coorientador: Alyne Simões

Capes: 50501003

1. Pinguins - Doenças. 2. Fototerapia. 3. Antibióticos. 4. Pés - Ferimentos e lesões. 5. Dermatite Digital. 6. Pododermatite.

Palavras-chave: Bumblefoot; Pinguim; Pododermatite; *Spheniscus magellanicus*; Terapia fotodinâmica.

Nome de Autor: Cristiane Lassálvia Nascimento

Título: ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA TERAPIA
FOTODINÂMICA E USO DE ANTIBIÓTICOS EM LESÕES PODAIS
(Bumblefoot) EM PINGUINS DE MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*).


COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Prof. Dr. Sheilla Canavese Rahal

Prof. Dr. Alyne Simões Gonçalves

Data da defesa: 22/07/2014



Amo a los pájaros perdidos
que vuelan desde el más allá
a confundirse con un cielo
que nunca más podre recuperar

AGRADECIMENTOS

“Creio na bondade sem a garantia prévia da gratidão. Sem que se assegure da memória devedora. Sem que se estabeleça, pelo ato generoso, uma servidão vitalícia no beneficiado. Bondade paga-se no puro e simples ato de sua realização. Como um fruto justifica a existência útil da árvore. Bondade antevendo a recompensa é apólice de sociedade mutualista rendendo do capital intocável do favor inicial. Os pássaros não são devedores dos frutos e da água da fonte. Eles testificam, perante a natureza, a continuidade da missão cultural.”

- Câmara Cascudo, em "O Tempo e Eu"

Que os frutos desse trabalho testemunhem o valor de toda bondade investida nele, meus profundos agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira;

Aos Professores, Dra. Sheilla Canavese Rahal, Dra. Maria Jaqueline Mamprim e Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja;

À minha co-orientadora, Alyne Simões

Ao Fábio Sellera.

Aos colegas e amigos do Aquário de Santos, Gustavo Dutra, Sergio Silva, Márcio Gomes, Demétrio Martinho e Paulo de Tarso.

Aos amigos do Centro de Lasers e Aplicações – CLA do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/ USP, Profa. Dra. Martha Ribeiro Simões e seus discípulos Caetano, Tânia e Luiz Suzuki.

À minha família, Sergio, Luana e Lara.

Aos meus pais, Neusa e Joadir.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento clínico para pododermatite em aves segundo Oaks, 1993.....	12
Tabela 2 – Parâmetros de irradiação utilizados nas lesões de pododermatite em pinguim de Magalhães tratados com TFD.....	28
Tabela 3 - Microrganismos isolados a partir de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) que apresentaram resistência a maior número de antibióticos:.....	30
Tabela 4 Número de identificação dos pinguins utilizados no experimento, número de lesões por animal, frequência e porcentagem das amostras coletadas de cada indivíduo.....	36
Tabela 5 – Frequência e porcentagem do local afetado por pododermatite encontradas em pinguins de Magalhães do plantel deste estudo:.....	36
Tabela 6 – Frequência e porcentagem do lado afetado por pododermatite encontrados em pinguins de Magalhães do plantel deste estudo.....	37
Tabela 7 – Frequência e porcentagem de amostras coletadas nos grupos terapia fotodinâmica e antibiótico.....	37
Tabela 8 – Comparação entre o número de lesões curadas e respectivas frequência e porcentagem acumulada nos grupo antibiótico e terapia fotodinâmica.....	38
Tabela 9 – Prevalência de cada espécie bacteriana isolada do total de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) no grupo tratado com TFD e prevalência após o tratamento.....	51
Tabela 10 – Prevalência da resistência a antimicrobianos do total de amostras bacterianas isoladas de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) em ambos os grupos.....	52
Tabela 11 – Prevalência da resistência a antimicrobianos em amostras bacterianas isoladas de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) colhidas após a TFD:.....	53

Tabela 12 – Valores P resultantes de comparações múltiplas através de método de Tukey entre os grupos C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5" (cinco segundos), 10" (dez segundos de TFD), 30" (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *E. coli* proveniente de lesões podais em *S. magellanicus*, em teste de sensibilidade à Terapia Fotodinâmica *in vitro*..... 55

Tabela 13 – Valores P resultantes de comparações múltiplas através de método de Tukey entre os grupos C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5" (cinco segundos), 10" (dez segundos de TFD), 30" (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *P. aeruginosa* proveniente de lesões podais em *S. magellanicus*, em teste de sensibilidade à Terapia Fotodinâmica *in vitro*..... 56

Tabela 14 – Valores P resultantes de comparações múltiplas através de método de Tukey entre os grupos C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5" (cinco segundos), 10" (dez segundos de TFD), 30" (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *P. mirabilis* proveniente de lesões podais em *S. magellanicus*, em teste de sensibilidade à Terapia Fotodinâmica *in vitro*..... 57

Tabela 15 – Valores P resultantes de comparações múltiplas através de método de Tukey entre os grupos C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5" (cinco segundos), 10" (dez segundos de TFD), 30" (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *S. aureus* proveniente de lesões podais em *S. magellanicus*, em teste de sensibilidade à Terapia Fotodinâmica *in vitro*..... 59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pinguim de Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) vocalizando em recinto de cativeiro, arquivo pessoal, Aquário de Santos.....	7
Figura 2 - Excerto de “Boke of St Albans” (1486), mais antiga referência conhecida para afecções podais em aves, neste caso, em rapinantes (COOPER, 2002).....	10
Figura 3 - Diagrama de uma placa de 96 poços marcadas para o experimento, sendo grupos dispostos em colunas e diluições em linhas.....	32
Figura 4 - Relação entre momento do tratamento em dias e a mediana das áreas de lesão em cm ² nos grupos terapia fotodinâmica (PDT) e antibiótico (ANT).....	38
Figura 5 – Porcentagem de animais com lesão nos diversos momentos de observação nos grupos terapia fotodinâmica (PDT) e antibiótico (ANT) (tempo até completa cicatrização).....	39
Figura 6 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 49.....	40
Figura 7 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães n. 49.....	40
Figura 8 - Evolução lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar e tarsometatarso esquerdo do P. de Magalhães n. 94.....	41
Figura 9 - Evolução lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar e tarsometatarso direito do P. de Magalhães n. 94.....	41
Figura 10 - Evolução lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 257.....	42
Figura 11 - Evolução lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar e tarsometatarso direitos do P. de Magalhães n. 257.....	42
Figura 12 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 264.....	43
Figura 13 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães n. 264.....	43

Figura 14 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 23.....	44
Figura 15 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar direito do Pinguim de MAGALHÃES N. 67.....	44
Figura 16 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 37.....	45
Figura 17 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães n. 37.....	45
Figura 18 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 68.....	46
Figura 19 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães N. 68.....	46
Figura 20 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em tarsometatarso direito do Pinguim de Magalhães N. 68.....	47
Figura 21 - Evolução lesão pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar e tarsometatarso direitos do P. Magalhães n. 235.....	47
Figura 22 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 80.....	48
Figura 23 Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães n. 80.....	48
Figura 24 – Prevalência de microrganismos encontrados no total de amostras coletadas das lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) ao longo de todo período de observação em ambos os grupos:.....	49
Figura 25 – Prevalência de microrganismos encontrados nas amostras coletadas das lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) ao longo de todo período observado no grupo TFD que sobreviveram ao tratamento:.....	50
Figura 26 – Comparação entre prevalência de micro-organismos isolados de amostras de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) ao longo de todo período de observação nos grupos antibiótico (ANT) e terapia fotodinâmica (TFD):.....	50

<p>Figura 27 – Prevalência em porcentagem dos quatro microorganismos mais encontrados nas lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ANT) e terapia fotodinâmica (PDT).....</p>	51
<p>Figura 28 – Comparação da prevalência da resistência a antimicrobianos em amostras bacterianas isoladas de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) entre os grupos: antibiótico (ANT) e terapia fotodinâmica (PDT).....</p>	53
<p>Figura 29 – Média do Número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL) nos diversos grupos de teste de sensibilidade à TFD <i>IN VITRO</i>, sendo os grupos: C (controle total), L (luz), AM (azul de metileno), 5'' (cinco segundos), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria <i>E. coli</i> proveniente de lesões podais de <i>S. magellanicus</i>.....</p>	54
<p>Figura 30 – Média do Número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL) nos diversos grupos de teste de sensibilidade à TFD <i>in vitro</i>, sendo os grupos: C (controle total), L (luz), AM (azul de metileno), 5'' (cinco segundos), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria <i>P. aeruginosa</i> proveniente de lesões podais de <i>S. magellanicus</i>.....</p>	56
<p>Figura 31 – Média do Número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL) nos diversos grupos de teste de sensibilidade à TFD <i>in vitro</i>, sendo os grupos: C (controle total), L (luz), AM (azul de metileno), 5'' (cinco segundos), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria <i>P. mirabilis</i> proveniente de lesões podais de <i>S. magellanicus</i>.....</p>	57
<p>Figura 32 – Média do Número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL) nos diversos grupos de teste de sensibilidade à TFD <i>IN VITRO</i>, sendo os grupos: C (controle total), L (luz), AM (azul de metileno), 5'' (cinco segundos), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria <i>S. aureus</i> proveniente de lesões podais de <i>S. magellanicus</i>.....</p>	58
<p>Figura 33 - Mediana do número total de eritrócitos em milhões por microlitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: ATB e TFD. Valor de referência 1,01 a 2,41 milhões/ μL:.....</p>	60
<p>Figura 34 - Mediana do valor de hemoglobina em miligramas por decilitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos:</p>	

antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 13,1 a 17,9.....	60
Figura 35 - Mediana do valor de hematócrito em porcentagem de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 41% a 54,8%:.....	61
Figura 36 - Mediana do valor de volume corpuscular médio (VCM) em fentolitros de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 158,3 a 543,1 fentolitros:.....	61
Figura 37 - Mediana do valor de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em gramas por decilitros de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 28,1 a 39,3 g/ dL:.....	62
Figura 38 - Mediana do valor de leucócitos totais por microlitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 6810 a 17950 / μ L:.....	62
Figura 39 - Mediana do número de heterófilos por microlitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 2542 a 9472/ μ L:.....	63
Figura 40 - Mediana do número de linfócitos por microlitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 2267 a 9383/ μ L:.....	63
Figura 41 - Mediana do número de monócitos por microlitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 0 a 1369/ μ L:.....	64
Figura 42 - Mediana do número de basófilos por microlitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 98 a 1369/ μ L:.....	64
Figura 43 - Mediana do valor de aspartato aminotransferase (AST) em unidades internacionais por litro (AST) de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 27 a 375 UI/ L:.....	65
Figura 44 - Mediana do valor de ácido úrico em miligramas por decilitro de pinguins	

de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 0,80 a 13,21 mg/ dL.....	65
Figura 45 - Mediana do valor de creatinoquinase (CK) em unidades internacionais por litro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 47 a 447 UI/ L:....	66
Figura 46 - Mediana do valor de proteínas totais em gramas por decilitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 5,0 a 6,6 g/ dL.....	66
Figura 47 - Mediana do valor de albumina em gramas por decilitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 1,5 a 2,1 g/ dL.....	67
Figura 48 - Mediana do valor de globulina em gramas por decilitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 3,5 a 4,9 g/ dL.....	67
Figura 49 - Mediana do valor de glicose em miligramas por decilitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 189 a 243 mg/ dL.....	68
Figura 50 - Mediana do valor de colesterol em miligramas por decilitro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 232,01 a 309,35 mg/ dL.....	68
Figura 51 - Mediana do valor de fosfatase alcalina em unidades internacionais por litro de pinguins de Magalhães (<i>S. magellanicus</i>) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 0 a 387 UI/ L.....	69

LISTA DE ABREVIações

1' – um minuto

2' – dois minutos

5'' – cinco segundos

10'' – dez segundos

30'' – trinta segundos

°C – Graus Celsius

μM – micro molar

AM – grupo azul de metileno

ANT – grupo antibiótico

AST – aspartato aminotransferase

ATB – grupo antibiótico

Ca²⁺ – Cálcio divalente

CK-MB – creatinofosfoquinase fração muscular

Cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

CO₂ – dióxido de carbono

COX2 – ciclooxigenase 2

C – grupo controle total

D – direito

E – esquerdo

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

f – frequência

FLBP – fototerapia a laser de baixa potência

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Fs – fotossensibilizador

GC – grupo controle

GT – grupo teste

IACS – Instituto de Análises Clínicas de Santos

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IM – intramuscular

IUCN – Interantional Union for Conservation of Nature

kg – kilograma

L – grupo somente luz

mg – miligrama

Mg² – magnésio divalente

mL – mililitro

Nm – nanometro

P – valor P

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

PDT – Photodynamic therapy

P. mirabilis – *Proteus mirabilis*

RPM – rotações por minuto

S₀ – estado fundamental

S₁ – estado singleto

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SISBIO – Sistema de Informação e Autorização em Biodiversidade

S. magellanicus – *Spheniscus magellanicus*

spp – espécies

T₁ – estado tripleto

TFD – terapia fotodinâmica

UFC – unidade formadora de colônia

VO – via oral

W – watts

Sumário

<i>RESUMO</i>	1
<i>ABSTRACT</i>	2
<i>INTRODUÇÃO</i>	3
<i>REVISÃO DA LITERATURA</i>	6
Pinguins de Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	7
Bumblefoot	9
Terapia Fotodinâmica (TFD)	16
<i>OBJETIVOS</i>	22
<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i>	24
Animais e ambiente de experimentação	25
Procedimentos adotados para Terapia Fotodinâmica	29
Avaliação da área de lesão:	29
Microbiota associada e antibiogramas	30
Teste de resistência bacteriana in vitro à Terapia Fotodinâmica:	31
Exames hematológicos:	34
Análise estatística	35
<i>RESULTADOS</i>	36
Características das amostras coletadas:	37
Área de lesão:	38
Microbiota Associada:	50
Antibiogramas:	53
Teste de resistência in vitro à Terapia Fotodinâmica:	55
Exames hematológicos e bioquímicos:	60
<i>DISCUSSÃO</i>	70
<i>CONCLUSÃO</i>	75
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	77
<i>TRABALHO CIENTÍFICO</i>	82

NASCIMENTO, C.L. **Estudo comparativo do efeito da terapia fotodinâmica e uso de antibióticos em lesões podais (bumblefoot) em pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)**. Botucatu, 2014, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do estudo foi testar um protocolo de tratamento para pododermatite classe III em um grupo de *Spheniscus magellanicus* mantidos em cativeiro utilizando terapia fotodinâmica (TFD) e compará-lo com outro tratado com antibióticos (ATB). Todos os animais foram submetidos inicialmente à debridamento cirúrgico da área da lesão e em seguida aleatoriamente separados em um grupo TFD e outro ATB, contendo 11 lesões cada. No grupo ATB utilizou-se pomada antibiótica três vezes por semana e antibiótico e anti-inflamatório sistêmicos diariamente. No grupo TFD, terapia fotodinâmica foi aplicada três vezes por semana sem a utilização de medicação sistêmica. Fotografias da área da lesão, swab para cultura e antibiograma e sangue para hemograma e bioquímica sanguínea foram coletados no início e a cada 14 dias perfazendo um total de 84 dias. Os resultados reafirmaram a natureza recidivante dessas lesões que se iniciam a partir do ponto de apoio. A prevalência das bactérias ao longo do tempo não foi uniforme, sendo a realização de antibiogramas para escolha de uma droga apropriada necessário em diferentes momentos. Na comparação, o grupo TFD apresentou desempenho melhor com 63,62% de cura em um tempo médio de 42 dias, contra 9,09% de cura em um tempo médio de 70 dias no grupo ATB. Os achados do presente estudo atestam a eficácia da Terapia Fotodinâmica para o tratamento de pododermatite classe III para *Spheniscus magellanicus*.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica, pododermatite, azul de metileno, laser, cativeiro, reabilitação.

NASCIMENTO, C.L. **Comparative study of photodynamic therapy and the use of antibiotics in foot lesions (bumblefoot) in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*)**. Botucatu, 2014, .116 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of the study was to test a treatment protocol for pododermatitis class III in a group of captive *Spheniscus magellanicus* using photodynamic therapy (PDT) and compare it with another treated with antibiotics (ATB). All animals initially underwent surgical debridement of the lesion area and then they were randomly divided into one TFD and one ATB group, each containing 11 injuries. In the ATB group antibiotic ointment was used three times a week and systemic antibiotic and anti-inflammatory daily. In PDT group, photodynamic therapy has been applied three times a week without the use of systemic medication. Photos of the lesion area, swab for culture and sensitivity and blood for blood count and blood chemistry were collected on the first day and every 14 days for a total of 84 days. The results reaffirmed the relapsing nature of these lesions that begin from the point of support. The prevalence of bacteria over time was not uniform and there was need to carry out antibiograms at different times to select an appropriate drug. In comparison, the PDT group showed the best performance with 63.62% on an average healing time of 42 days, compared to 9.09% in an average healing time of 70 days in the ATB group. The findings of this study attest to the effectiveness of photodynamic therapy for the treatment of class III to pododermatitis *Spheniscus magellanicus*.

Key words: Photodynamic inactivation, foot pad dermatitis, pododermatitis, methylene blue, laser, captivity, rehabilitation.

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Segundo a União Internacional para Conservação da Natureza, a população mundial de Pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) é estimada em 1,3 milhões de pares. Não há consenso sobre o declínio populacional, mas está classificada como “quase ameaçada” na lista vermelha de espécies ameaçadas (IUCN, 2012).

O Brasil, por constituir parte da rota migratória destas aves, é de extrema importância no que tange a conservação da espécie (SILVA FILLHO e RUOPPOLO, 2006). Devido à alta incidência de aves marinhas na costa brasileira, diversos estudos têm se voltado para a reabilitação de pinguins, e a ocorrência de doenças e outros fatores limitantes têm se tornado cada vez mais conhecidos e aprofundados, na tentativa de solucioná-los (XAVIER et al., 2007). Dentre as doenças de maior importância nessas aves, que dificultam o processo de recuperação, estão a aspergilose, a malária e o bumblefoot (FOWLER e FOWLER, 2001).

Pinguins passam cerca de 75% da vida no mar, permanecendo em área seca somente nos períodos de muda das penas, nidificação ou mesmo descanso, quando habitam praias pedregosas ou arenosas, portanto, não estão adaptados à longa permanência sobre superfícies firmes e rugosas, como os pisos normalmente encontrados em zoológicos e centros de reabilitação (SILVA FILLHO e RUOPPOLO, 2006).

As lesões podais em aves são chamadas de pododermatites ou são também conhecidas pela palavra inglesa *bumblefoot*. É uma síndrome de múltiplas etiologias e, em aves, é um termo genérico utilizado para designar qualquer processo inflamatório nos membros pélvicos, desde simples enrijecimento ou tumefação dos dígitos até abscessos crônicos com afecção do tecido adjacente (HOCKING et al., 2008). É uma das mais frequentes e importantes complicações clínicas em aves marinhas mantidas em cativeiro ou em centros de reabilitação (ERLACHER-REID et al., 2011).

O tratamento de pododermatites em pinguins costuma ser longo e frustrante e os resultados podem diferir dependendo da experiência da equipe. Em sua maioria, envolve procedimento cirúrgico, para debridamento do tecido

necrótico, seguido ao uso de pomadas antibióticas tópicas e bandagem. Pode haver necessidade de várias cirurgias, além da associação com antibióticos sistêmicos. O tempo de tratamento pode variar de 1 a 3 meses e, em alguns casos, chegar a 2 anos (AZA AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION, 2005).

Segundo Bagnato (2007), o controle de microrganismos patogênicos é um dos campos mais desafiadores para a farmacologia. O aparecimento de grande variedade de microrganismos resistentes faz com que haja grande aumento da morbidade de infecções, que foram facilmente tratadas no passado. Portanto, antibióticos sistêmicos deveriam ser utilizados apenas nas infecções mais graves, evitando assim o desenvolvimento de possível resistência bacteriana, além de minimizar os efeitos colaterais associados a esse tipo de terapia. Uma alternativa que vem se intensificando nas últimas décadas é a Terapia Fotodinâmica (TFD). Essa técnica, desenvolvida para o tratamento de tumores, tem um princípio capaz de ser utilizado no controle microbiológico.

A TFD envolve o uso de agente fotossensibilizador (Fs), luz e oxigênio para destruir tanto células cancerosas (MARMUR et al., 2004; ZEITOUNI et al., 2003) como também microrganismos (bactérias, vírus e fungos), não apresentando efeitos genotóxicos e mutagênicos, o que impede o desenvolvimento de resistência microbiana (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007). Este fotossensibilizador precisa ser capaz de ser absorvido pela célula alvo, e ser ressonante ao comprimento de onda da fonte de luz utilizada, o que resultará em espécies altamente reativas de oxigênio, levando a injúria e morte celular (DOUGHERTY et al., 1998; KESSEL, 2004).

Esta técnica alternativa, que já está sendo investigada no tratamento de tumores cutâneos na medicina veterinária, pode oferecer uma alternativa eficaz ao tratamento de lesões infectadas em animais (VINCK et al., 2003).

REVISÃO DA LITERATURA

2 - REVISÃO DA LITERATURA

PINGUINS DE MAGALHÃES (*SPHENISCUS MAGELLANICUS*)

O Brasil tem o registro de ocorrência de quatro espécies de pinguins em seu território, destas o pinguim de Magalhães é a espécie mais frequente. Esta espécie é a única classificada como visitante sazonal, enquanto as demais, pinguim-rei (*Aptenodytes patagônica*), pinguim-de-testa-amarela (*Eudyptes chrylophus*) e pinguim-de-penacho-amarelo (*Eudyptes chrysocome*) são classificadas como vagantes, ou seja, são consideradas espécies de ocorrência irregular no país (SILVA FILLHO e RUOPPOLO, 2006).

Nomeado por Fernand Magellan, pois foi o primeiro europeu a avistá-los, é uma das quatro espécies, todas muito similares, do gênero *Spheniscus*. Não possuem cristas, a plumagem é preta e branca, cauda em forma de cunha, vocalizam um som alto e parecido com o zurrar de um jumento, pesam 3,6 kg e medem 69 cm em média. Possuem bico forte e negro, além de membros pelvicos e pernas pretos, eventualmente com áreas brancas ou despigmentadas. Não há subespécies nem dimorfismo sexual. Durante o período de reprodução no verão, as penas ao redor dos olhos caem e exibe a pele que se torna rosada, as penas voltam a crescer quando o inverno se aproxima (Figura 1) (ROOTS, 2006).

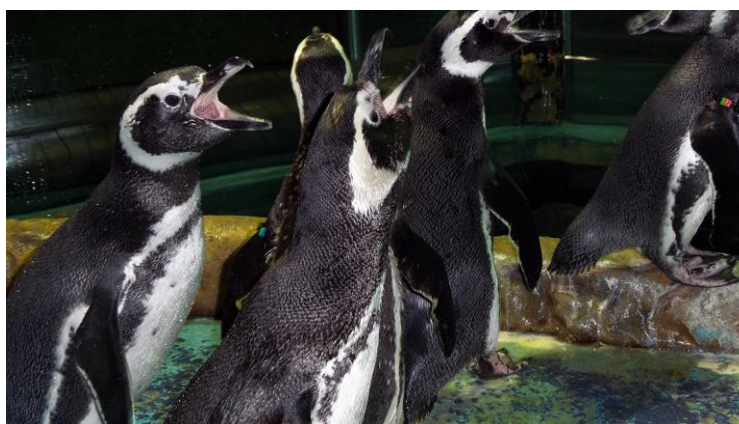


Figura 1 - Pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) vocalizando em recinto de cativeiro, arquivo pessoal, Aquário de Santos

Essas aves procriam na região da Patagônia Argentina, ao longo da costa oeste e ilhas do Chile, também formam colônias nas Ilhas Malvinas e Juan Fernandez. Alguns pinguins migram para o norte para escapar do inverno no sul, alcançando o sudeste do Brasil pela costa leste e a região central do Chile pela oeste (ROOTS, 2006). Excepcionalmente, juvenis são encontrados ao longo da costa brasileira podendo mesmo alcançar a região nordeste (RUOPPOLO et al., 2012). A população estimada de pinguins Magalhães na costa sul americana é de 1,3 milhão de aves, sendo a colônia mais numerosa a de Punta Tombo na Argentina, que se encontra em franco declínio (SILVA FILLHO e RUOPPOLO, 2006).

Pinguins de Magalhães possuem hábitos pelágicos durante o outono e inverno, de maio a agosto (RODRIGUES et al., 2010) e retornam para os locais de ninhos entre agosto e setembro. Cavam buracos na areia de até um metro, alargando a cavidade no final do túnel que preenchem com grama e gravetos. Dois ovos são postos e ambos os pais se revezam na incubação por 40 dias. Os juvenis estarão emplumados e independentes entre março e abril, aos 60 dias de vida (ROOTS, 2006).

Essas aves então migram acompanhando cardumes de anchoítas (*Engraulis anchoita*), que compõe até 72% da sua dieta, que inclui também cefalópodes e crustáceos. A migração é um período desafiador para os pinguins, principalmente os juvenis. Há diversas ameaças além de predadores naturais, como tubarões, orcas, lobos e leões marinhos (ROOTS, 2006), incluindo mudanças climáticas, pesca comercial, poluição marinha, desde derramamentos de óleo até lixo como garrafas e latas (RODRIGUES et al., 2010).

Ainda que os efeitos de grandes derramamentos de óleo sejam dramáticos, a poluição crônica das águas como a proveniente de descarga deliberada de petróleo de lavagem de tanques de navios, pode ser fator mais importante na mortalidade de aves marinhas. Por décadas a poluição crônica por óleo matou pinguins de Magalhães na Argentina e, mais recentemente, este problema foi bem documentado no Brasil (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006). Estimou-se que 42000 pinguins de Magalhães morriam por ano devido à contaminação crônica das águas do mar argentino (GANDINI et al., 1994).

Além da contaminação por óleo, é bem conhecido que a fome quando combinada com endoparasitismo contribuem para mortalidade de pinguins. Esses fatores são ainda mais impactantes quando associados à perda de temperatura corporal durante o jejum, o que leva a um aumento da demanda de energia, estimulando os pinguins a saírem da água e na sequência tornando-se anêmicos (GANDINI et al., 1994).

No Brasil é comum a ocorrência de pinguins encalhados, afetados por petróleo ou não, sendo uma grande porcentagem de animais jovens. Quando isso ocorre, normalmente, há intervenção humana e esses animais acabam sendo levados a algum dos diversos centros de reabilitação de fauna marinha que existem no país (SILVA FILLHO e RUOPPOLO, 2006).

Segundo a União Internacional para Conservação da Natureza, a população mundial de Pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) é estimada em 1,3 milhões de pares. Não há consenso sobre o declínio populacional, mas está classificada como “quase ameaçada” na lista vermelha de espécies ameaçadas (IUCN, 2012). O Brasil, por constituir parte da rota migratória destas aves, é de extrema importância no que tange a conservação da espécie (SILVA FILLHO e RUOPPOLO, 2006).

BUMBLEFOOT

Durante o período em que permanecem no cativeiro, pinguins estão sujeitos a contrair doenças que dificultam o processo de reabilitação (XAVIER et al., 2007). Dentre as doenças de maior importância nessas aves em recuperação estão a aspergilose, a malária e o “bumblefoot” (FOWLER e FOWLER, 2001). Problemas podais são comuns a várias espécies de aves. Pinguins, assim como tantas outras espécies, estão predispostos à pododermatites, doença também conhecida pela palavra inglesa “bumblefoot” (AZA AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION, 2005).

O termo “bumblefoot” não é científico, mas é usado para definir uma gama de condições inflamatórias e/ou degenerativas que afetam os pés de aves. Infecções podais são conhecidas há muito tempo por criadores de aves de rapina, a mais antiga referência em inglês parece ser a de “*Boke of St*

Albans”, publicado em 1486, no qual a autora, “*Dame Juliana Berners*”, afirma em inglês arcaico: “*When youre hawkes fete be swollen she hath the podagre*”, como pode ser visto em Figura 2. O termo ‘podagre’ era usado para descrever condições que causavam inchaço nos pés de rapinantes. Na sequência, a autora descreve uma condição para qual se refere como “pinne” (alfinete) no pé. Trabalhos do século 19 e começo do século 20 voltam a enfatizar infecções podais e o termo “corn” (milho) tornou-se popular. Recentemente o termo “bumblefoot” passou a ser cada vez mais usado (COOPER, 1980).

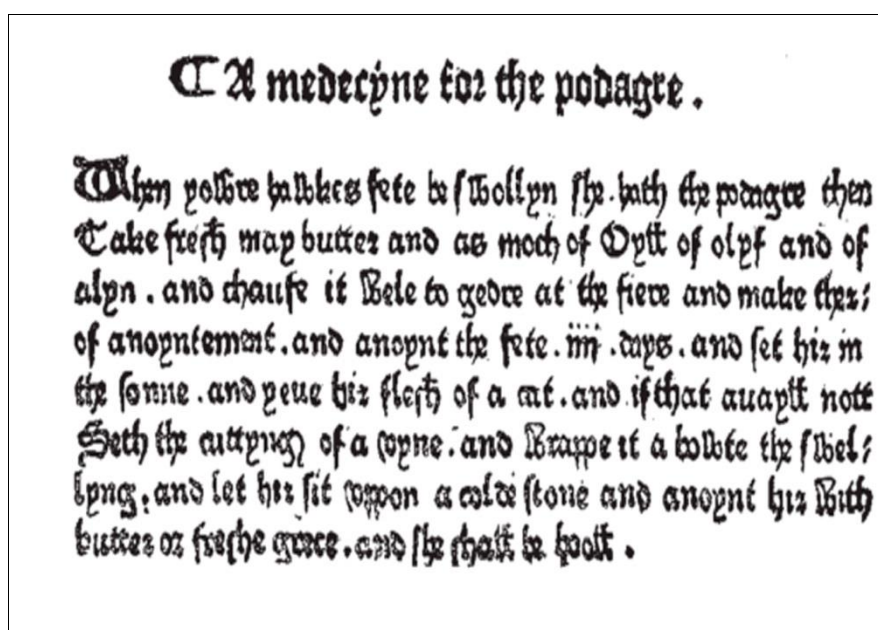


Figura 2 - Excerto de “Boke of St Albans” (1486), mais antiga referência conhecida para afecções podais em aves, neste caso, em rapinantes (COOPER, 2002).

As causas do “bumblefoot” em pinguins parecem ser análogas àquelas descrita para rapinantes: um processo multifatorial, relacionado principalmente a uma necrose isquêmica da superfície plantar em consequência à permanência em pé por longos períodos, apoiando-se sempre na mesma porção do pé. A perfusão dos tecidos dérmicos torna-se comprometida, o que permite que a microbiota da pele viole a derme (REIDARSON et al., 1999), subsequente erosão e formação de úlcera ocorre (SCHMIDT e LIGHTFOOT, 2006). Esta combinação de ferida de decúbito e infecção bacteriana é uma condição comum também em Anseriformes e Psitaciformes (SCHMIDT e LIGHTFOOT, 2006), sendo descrita em Ciconiiformes, Galliformes,

Passeriformes e Strigiformes (MARQUES et al., 2009). Os fatores predisponentes podem incluir obesidade, dietas inadequadas, inatividade e pisos ou poleiros inapropriados (SCHMIDT e LIGHTFOOT, 2006).

Em pinguins essa condição ocorre devido a mudanças no seu padrão normal de atividade, decorrente da permanência em cativeiro: diminuição do tempo de natação e sedentarismo, mantendo-se por tempo prolongado em pé sobre pisos abrasivos, úmidos e contaminados por fezes (AZA AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION, 2005).

Reiderson (1999) não encontrou diferenças na prevalência de lesões plantares relacionadas ao gênero em seu estudo. Já Erlacher-Reid (2011) concluiu que machos de pinguins africanos (*Spheniscus demersus*) em cativeiro desenvolvem mais lesões plantares do que as fêmeas, a despeito da dieta ser a mesma para ambos. No entanto, o autor relaciona esse achado ao maior peso dos machos em relação às fêmeas. O mesmo estudo concluiu ainda que pinguins com peso entre 3,5 kg e 4,0 Kg são significativamente mais propensos ao “bumblefoot” do que animais pesando entre 2,5 kg e 3,0 kg. Também ocorreu significativo aumento das lesões na mudança de estação de primavera para verão. Este achado também foi relacionado ao peso, uma vez que os animais engordam no período de muda de penas que ocorre nesta época. Animais que permaneciam em pé também eram mais afetados do que os que mantinham o hábito de nadar.

“Bumblefoot” é uma das mais frequentes e importantes complicações clínicas em aves cativas e em centros de reabilitação, porém existe pouca informação sobre sua ocorrência em animais de vida livre. (ERLACHER-REID et al., 2011). É uma condição de evolução crônica, invasiva e incapacitante, em geral clinicamente resistente à terapia cirúrgica e medicamentosa e frequentemente recorrente (OAKS, 1993).

O estadiamento clínico para pododermatite em pinguins não é padronizado; mas a maioria dos clínicos adota uma classificação em três ou cinco estágios (REIDARSON et al., 1999). Para finalidade desta pesquisa será utilizada a classificação em cinco estágios sugerida por Oaks (1993), por ser mais detalhada e abrangente, conforme Tabela 1:

Tabela 01 – Estadiamento clínico para pododermatite em aves segundo Oaks, 1993.

Estadiamento	Características
Classe I	<p>Desvitalização inicial de uma área plantar sem interrupção da barreira epitelial, subdividida em:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hiperemia ou isquemia precoce (área clara com comprometimento da perfusão capilar). • Hiperqueratose (calos) e insensibilidade.
Classe II	<p>Inflamação localizada/ infecção dos tecidos subjacentes em contato direto com a área desvitalizada, sem inchaço, subdividida em:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ferida puntiforme • Necrose isquêmica do epitélio (crosta insensível ou penetrante)
Classe III	<p>Infecção com edema inflamatório em tecidos subjacentes e inchaço local. Subdividida em:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Serosa (aguda) - edema e hiperemia dos tecidos. • Fibrose (crônica) - tentativa de encapsulamento e confinamento. • Exudato fibrino necrótico - acúmulo de restos necróticos.
Classe IV	<p>Infecção estabelecida com inchaço grave e envolvimento de estruturas vitais.</p> <p>Radiologia e exploração cirúrgica, muitas vezes, são necessárias para diferenciar os tipos III e IV.</p> <p>É uma condição crônica que provoca tenossinovite e ocasionalmente artrite e osteomielite.</p>
Classe V	<p>É uma extensão da Classe IV e é caracterizada por deformidades incapacitantes</p>

Quando ocorre a osteomielite, o prognóstico para recuperação diminui dramaticamente (SCHMIDT e LIGHTFOOT, 2006). Em diversos estudos descreve-se a tendência do “bumblefoot” em gerar lesões bilaterais a partir de lesão unilateral, uma vez que a ave passa a depositar o peso corporal sobre o membro sadio (COOPER, 2002). Esta síndrome pode evoluir para septicemia e morte, uma vez que sua característica progressiva torna o tratamento difícil e dependente do estágio de evolução (OSÓRIO et al., 2013).

A fonte de infecção, em geral, são microrganismos que vivem na superfície da pele e são frequentes os indicativos de contaminação fecal. *Escherichia coli* e *Proteus sp.* são achados comuns, bem como outros bacilos Gram negativos entéricos (COOPER, 2002). Goyache et al. (2003) isolaram *Corynebacterium spheniscorum* e *Staphylococcus sciuri* da microbiota natural da cloaca de *Spheniscus magellanicus*. Da mesma forma o estudo de Osório et al. (2013) isolaram grande porcentagem do gênero *Staphylococcus*, seguido de *Corynebacterium* em culturas feitas a partir de amostras de coxins plantares de *S. magellanicus*, tanto sadios quanto apresentando lesões, o que sugerem serem ambos pertencentes a microbiota normal destes animais. Já *Proteus spp.* e *Streptococcus sp.* foram isolados somente a partir de animais com feridas infectadas nesse mesmo estudo.

O isolamento desses gêneros a partir de feridas infectadas parece ser devido à ação oportunista do agente, causando infecção no local onde houve quebra das barreiras naturais de defesa do organismo. Isto é esperado principalmente em relação ao gênero *Staphylococcus*, uma vez que já foi relatado em outros casos de pododermatites e é considerado um agente comum em infecções cutâneas (OSÓRIO et al., 2013). O exame histológico de material removido cirurgicamente confirmou que as bactérias (especialmente *Staphylococcus*) estão presentes em grande número na crosta, bem como nos tecidos moles subjacentes (COOPER, 2002; MARQUES et al., 2009). Outras bactérias podem se estabelecer como resultado de procedimentos cirúrgicos contaminados ou na sequência de antibioticoterapia de longo curso, como por exemplo, *Pseudomonas spp.*, que é notadamente difícil de eliminar (COOPER, 2002).

O exame bacteriológico e testes de sensibilidade a antibióticos são uma parte importante no diagnóstico e tratamento do “bumblefoot”. Em geral, a

cultura irá revelar bactérias e a citologia mostrará bactérias e células inflamatórias, em sua maioria heterofilos e macrófagos (COOPER, 2002).

O antibiograma é um teste *in vitro* com o propósito de determinar a sensibilidade de microrganismos aos antimicrobianos, porém o resultado nem sempre pode ser fielmente extrapolado para o tratamento de feridas contaminadas, uma vez que é necessário o conhecimento da farmacodinâmica da droga no organismo (SORIANO-GARCÍA, 2013).

No estudo de Osório (2013), cepas isoladas de Pinguins de Magalhães, sem tratamento prévio com antibióticos, apresentaram graus variados de susceptibilidade frente a testes antimicrobianos. Penicilina e estreptomicina apresentaram mais de 20% de resistência, não sendo recomendados para um tratamento empírico. A cefalosporina foi a droga com melhor atividade contra os gêneros *Staphylococcus spp* e *Corynebacterium spp.*, mas sua ação contra *Escherichia coli* foi nula. Enrofloxacin foi o segundo antibiótico com melhor resposta *in vitro*, com alta susceptibilidade pela *E. coli* e baixa resistência para *Staphylococcus spp.* e *Corynebacterium spp.*

Importantes avanços foram feitos no conhecimento da patogênese do bumblefoot, mas por um longo período de tempo os métodos de tratamento permanecem os mesmos (COOPER, 2002).

Doenças crônicas como “bumblefoot” respondem melhor à antibioticoterapia de longo curso e debridamento cirúrgico. A antibioticoterapia sozinha geralmente falha devido à natureza isquêmica da lesão (REMPLE, 2006).

Utiliza-se inicialmente um antibiótico apropriado após antibiograma feito a partir de secreções da lesão. Quanto mais precoce o tratamento melhor para evitar a progressão da doença. Alguns clínicos costumam utilizar vitamina A, via oral ou injetável, baseando-se na teoria que “bumblefoot” pode estar associado a deficiências nutricionais como acontece em criação de frangos, ainda que não seja correlacionado ao aparecimento em outras espécies (COOPER, 2002). Uma avaliação radiográfica deve ser feita para verificar a presença ou não de artrites ou osteíte, o que reduz drasticamente as chances de sucesso. A avaliação hematológica também é uma ferramenta bastante útil (COOPER, 2002).

Hawkey et al. (1985) estudaram alterações hematológicas em pinguins Gentoo (*Pygoscelis papua*) em cativeiro, com e sem “bumblefoot”, e encontraram heterofilia e hiperfibrinogenemia nos animais doentes. Também observaram monocitose e basofilia nos animais em estágios mais avançados da doença, provavelmente associado à presença de tecido necrótico. Uma pequena redução dos níveis de hemoglobina foi encontrada em um dos animais com lesão.

Procedimentos cirúrgicos, desde debridamento simples para limpeza e revitalização dos tecidos, ou até mesmo uma radical excisão dos tecidos danificados, são parte do tratamento do “bumblefoot”. Pode haver necessidade de novos procedimentos cirúrgicos em cerca de 40% dos casos (COOPER, 2002; REMPLE, 2006). O protocolo anestésico em geral envolve o uso de isoflurano administrado via máscara (ERLACHER-REID et al., 2011).

Erlacher-Reid et al. (2011) descreveram que, em seguida ao debridamento, utiliza-se solução de antibióticos tópicos, que pode ou não estar associado à DMSO (dimetilsulfóxido) e dexametazona. O ferimento é então protegido por gaze de algodão e envolvido em bandagem, que são trocadas a cada três dias. No momento da troca, o sítio de lesão é lavado com solução de clorexidina e todo curativo refeito. Como as lesões de “bumblefoot” cicatrizam lentamente, a proteção dos pés é mantida por longo tempo. Espera-se melhora significativa entre 10 a 14 dias.

Qualquer terapia deve ser acompanhada de medidas de manejo adequadas, pois como mencionado anteriormente, o piso desempenha um papel importante no desenvolvimento do “bumblefoot”. Deve-se dar oportunidade à ave afetada de descansar os pés mantendo-se deitada e garantir boa alimentação (COOPER, 2002). Higiene é muito importante na prevenção de novas infecções bacterianas, em particular, o piso onde as aves permanecem devem ser limpos e desinfetados tantas vezes quantas forem necessárias (COOPER, 2002).

Analgésicos e outros meios de reduzir a dor são recomendados (COOPER, 2002). Carprofeno é utilizado em avicultura devido à ação analgésica e também anti-inflamatória, sendo tais atividades dependentes da dose administrada. A propriedade terapêutica deste anti-inflamatório está na sua inibição, não só sobre as COXs, mas também sobre a fosfolipase A2. O

medicamento tem sido muito empregado no tratamento pós-operatório e também em afecções articulares dolorosas de pássaros, sendo a dose com atividade anti-inflamatória de 2,0 a 4,0 mg/ kg, via oral, a cada 8 a 24 horas (HUEZA, 2008).

Após os primeiros dias do pós-operatório, permitir a natação é parte importante do tratamento, pois alivia a pressão sobre o ferimento e melhora a circulação dos membros pélvicos, o que auxilia a cura (REIDARSON et al., 1999).

TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

O rápido aumento da resistência a antimicrobianos entre diversas espécies de bactérias patogênicas, pode levar ao fim de um período que inclui os últimos 50 anos conhecido como a 'era dos antibióticos' na clínica médica. Bactérias multiplicam-se muito rapidamente e as mutações que garantem sua sobrevivência frente a antibióticos tornam-se predominantes nas novas populações, além de outras habilidades como transferência de plasmídeos e elementos genéticos entre espécies. A prescrição inadequada de antibióticos, especialmente para doenças virais, falhas de pacientes em completar o tratamento e o uso indiscriminado em animais de produção destinados à alimentação concorrem para exacerbar o problema pela repetida seleção de cepas resistentes. O inexorável aumento de bactérias resistentes a múltiplas drogas leva a um esforço de pesquisa por formas alternativas de tratamento que, hipoteticamente, bactérias não consigam desenvolver resistência com facilidade (DAI et al., 2009).

A Terapia Fotodinâmica é baseada na foto oxidação de material biológico através do uso de um fotossensibilizador, em geral um corante não tóxico, introduzido na primeira etapa do tratamento, seguido à exposição à luz de comprimento de onda apropriada para ser absorvida pelo fotossensibilizador. Esta associação, conjuntamente com moléculas de oxigênio, resulta através de várias reações fotofísicas, na produção de espécies reativas de oxigênio que causam dano às funções celulares levando-a a morte (HENDERSON e DOUGHERTY, 1992). Quando as células a serem eliminadas são

microrganismos patogênicos este procedimento é denominado inativação fotodinâmica (DAI et al., 2009).

Todos os estudos que pesquisaram a inativação fotodinâmica de bactérias multirresistentes demonstraram que estas são tão susceptíveis quanto suas semelhantes menos patogênicas (HAMBLIN e HASAN, 2004). Além disso, não foi possível até o momento induzir artificialmente resistência à inativação fotodinâmica em nenhum microrganismo testado (DAI et al., 2009). Biel et al. (2011) comprovaram a efetividade *in vitro* da terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno contra diversos microrganismos encontrados em sinusite crônica em humanos após prolongado uso de antibióticos, dentre eles *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Devido ao fato de a entrega de luz visível ser por definição um processo localizado, a Terapia Fotodinâmica é mais adequada para infecções localizadas do que para sistêmicas (como as bacteremias), aplicando-se o fotossensibilizador na área infectada através de aplicação tópica, instilação, injeção intersticial ou aerossol. O objetivo da técnica é, através de uma efetiva seletividade do fotossensibilizador pelo microrganismo patogênico, destruir um número suficiente destes para que se evite uma recolonização do tecido pelos sobreviventes, além de evitar uma destruição inaceitável do tecido hospedeiro (HAMBLIN e HASAN, 2004).

As primeiras tentativas de aplicar a TFD para o tratamento de doenças tumorais foram feitas pelo grupo de Herrman von Tappeiner entre os anos de 1903 a 1905. A história de como este grupo alemão obteve a ideia de usar corantes como sensibilizadores para a luz é fascinante: um dos estudantes de von Tappeiner, Oscar Raab, estava investigando os efeitos tóxicos da acridina em uma cultura de paramécios. Em um dos experimentos os paramécios sobreviveram à incubação a uma dada concentração de acridina por aproximadamente 1 hora e meia, enquanto em outro eles sobreviveram por 15 horas sob idênticas condições exceto, conforme registrado pelo cuidadoso estudante, que durante o experimento houve uma intensa tempestade de raios e as culturas estavam próximas a uma janela. Então ele passou a se perguntar se a luz exerceu um papel nesse resultado. O grupo desenvolveu uma grande quantidade de trabalhos sobre fotossensibilização e descobriu que o oxigênio

também era imprescindível para o efeito esperado. Nesta mesma época, um neurologista francês administrou eosina via oral para um paciente epilético e notou que este desenvolveu dermatite nas áreas do corpo expostas ao sol (MOAN e PENG, 2003).

Tappeiner, aparentemente para distinguir este fenômeno daqueles relacionados à sensibilização de chapas fotográficas por corantes, cunhou o termo “photodynamische Wirkung” (ação fotodinâmica) para as reações dependentes de oxigênio em sistemas biológicos. Tappeiner rapidamente extrapolou as aplicações da ação fotodinâmica para medicina e sugeriu profeticamente: ‘...o consumo de certos materiais fluorescentes (fotossensibilizadores) e da ação resultante da luz podem também ter uma aplicação terapêutica... em áreas como dermatologia...’. Somente algumas tentativas esporádicas do uso da ação fotodinâmica para o tratamento de tumores e outras doenças foram feitas nos 50 anos seguintes (SPIKES, 1997).

Outro fator que levou ao desinteresse por terapias antimicrobianas alternativas como a terapia fotodinâmica foi a descoberta na década de 40 da penicilina e, principalmente, o uso em larga escala dos antibióticos durante a II Guerra Mundial. Estes medicamentos deram aos pesquisadores das áreas da Saúde a falsa impressão de que a batalha contra os microrganismos estava vencida. Entretanto, dois anos após o lançamento comercial da penicilina, foi relatado o aparecimento de cepas de microrganismos resistentes a esta droga (YOSHIKAWA, 2002; BISHT et al., 2009).

A terapia fotodinâmica (TFD) envolve a utilização de corantes conhecidos como fotossensibilizadores (Fs), não tóxicos em combinação com a luz visível de comprimento de onda ressonante a este. Sob iluminação, o fotossensibilizador absorve fótons deixando seu estado fundamental (S₀) e passa ao estado excitado singleto (S₁), seguido pela conversão ao estado tripleto (T₁). O maior tempo de vida do estado tripleto permite a interação do fotossensibilizador excitado com as moléculas vizinhas gerando espécies citotóxicas (SHARMAN et al., 1999).

O estado tripleto pode agir de duas maneiras distintas, definidas como mecanismo Tipo 1 e Tipo 2. O mecanismo Tipo 1 envolve uma reação de abstração ou transferência de elétrons de átomos de hidrogênio entre o fotossensibilizador excitado e o substrato, gerando radicais livres e íons. Estas

espécies de radicais livres altamente reativos podem rapidamente interagir com oxigênio molecular tanto para gerar espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido ou radical hidroxila, e causar dano biológico irreparável. Em contraste, o mecanismo de Tipo 2 resulta da transferência de energia entre o fotossensibilizador em estado tripleto e moléculas de oxigênio em estado fundamental, que passam a um estado excitado chamado oxigênio singleto. Esta espécie extremamente reativa pode interagir com um grande número de substratos biológicos, induzir dano oxidativo e finalmente a morte celular. O mecanismo de Tipo 2 é tido como o processo predominante durante a TFD e o oxigênio singleto como a causa primária de citotoxicidade, porém ambos mecanismos levam à danos oxidativos similares (SHARMAN et al., 1999).

Estas espécies reativas de oxigênio podem oxidar diversas moléculas biológicas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. A TFD tem a vantagem sobre outras terapias de ter dupla seletividade: o Fs é voltado para o tecido afetado ou para determinado tipo de célula e a luz pode ser administrada com precisão na área adequada (DEMIDOVA e HAMBLIN, 2005).

É fato conhecido desde os primórdios da TFD no início do século passado, que certos microrganismos podem ser inativados pela combinação de corantes e luz, diversas combinações destes foram reportadas ao longo dos anos. Na década de 90 do século passado observou-se uma diferença fundamental de susceptibilidade à TFD entre bactérias Gram positivas e Gram negativas: em geral fotossensibilizadores neutros, aniônicos ou catiônicos inativam eficientemente bactérias Gram positivas. No entanto, apenas os fotossensibilizadores catiônicos (ou estratégias para tornar permeável a barreira bacteriana aos não catiônicos) eram hábeis em matar espécies Gram negativas. Esta diferença de susceptibilidade entre as duas classificações de espécies de bactérias é explicada pelas suas fisiologias, já que as espécies Gram positivas possuem uma membrana citoplasmática relativamente porosa, composta por ácidos lipoproteicos e peptidoglicanos que permitem a penetração do fotossensibilizador. O envelope celular de bactérias Gram negativas consiste, além da membrana citoplasmática, de outra membrana que é separada por peptidoglicanos contendo periplasma, o que forma uma barreira efetiva entre a célula e o ambiente e tende a restringir a ligação e

penetração de muitas estruturas do fotossensibilizador (HAMBLIN e HASAN, 2004).

Diversas estratégias foram testadas para permitir a inativação fotodinâmica de bactérias Gram negativas. Corantes fenotiazínicos como azul de toluidina e azul de metileno foram largamente empregados tanto para Bactérias Gram positivas quanto Gram negativas. Neste mecanismo de ação, as moléculas catiônicas primeiro deslocam cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) a partir de sua posição na membrana exterior onde atuam como uma âncora para as moléculas de lipopolissacarídeos carregadas negativamente. Esta membrana enfraquecida se torna mais permeável ao fotossensibilizador catiônico, o que aumenta progressivamente a desorganização da barreira e a absorção do Fs a cada ligação adicional (DAI et al., 2009).

Outra observação importante diz respeito à seletividade desses Fs catiônicos por células microbianas quando comparadas às do hospedeiro. Isso se dá porque o processo de absorção pelas células do hospedeiro é mais lento e se dá por endocitose, enquanto no microrganismo é relativamente rápido. Se o local da infecção for iluminado após um curto intervalo da aplicação do Fs (minutos), a lesão ao tecido hospedeiro será minimizada (DAI et al., 2009).

A sequência de eventos até a completa cicatrização de ferimentos pode ser dividida em três fases que se sobrepõem: inflamação, proliferação, formação e remodelação de matriz. A literatura reporta que a fototerapia acelera a cicatrização pelo estímulo à reepitalização, proliferação e diferenciação de fibroblastos, aumento de síntese de proteínas, redução do processo inflamatório, aumento da produção de matriz extracelular e maior organização dos feixes de colágeno (NÚÑEZ et al., 2013).

A fototerapia com laser de baixa potência (FLBP) tem sido usada para prevenir e tratar lesões por conta de seus efeitos analgésicos e cicatrizantes. Estes efeitos são o resultado da modulação de vários processos metabólicos que convertem a luz laser em energia útil para a célula. O papel da FLBP na cicatrização de ferimentos também foi demonstrado em estudos *in vitro*, além de ser uma técnica simples, não traumática e bem tolerada por pacientes (SPERANDIO et al., 2010).

O efeito da associação de laser de baixa intensidade e corantes (TFD) na cicatrização ainda não está completamente compreendido e os poucos estudos

existentes são contraditórios. No estudo de Silva et al. (2004) a TFD não causou inibição na cicatrização em ratos e seus efeitos antimicrobianos preveniram a infecção durante o processo de cicatrização. Sperandio et al afirmaram que a TFD em ratos, implicou em um processo de cicatrização diferente daquele observado no grupo controle, onde foi utilizado apenas a FLBP com melhores resultados, mas não provocou atraso no processo de cicatrização.

OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

Para testar a hipótese da eficiência da terapia fotodinâmica para o tratamento de pododermatite classe III em pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) mantidos em cativeiro, o presente estudo tem por objetivos testar um protocolo de tratamento utilizando terapia fotodinâmica (TFD) em um grupo de animais afetados e comparar os resultados com outro grupo afetado (controle), ambos pertencentes ao Aquário de Santos, no qual se utilizará a terapia convencional por meio de antibióticos citados em literatura. A avaliação dos resultados obtidos será feita quanto aos parâmetros: hematológicos, bioquímicos, efetividade na eliminação do foco infeccioso, efetividade na eliminação de bactérias resistentes, demonstradas em antibiograma, pela terapia fotodinâmica *in vitro* e tempo para reparação tecidual.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

A metodologia utilizada foi submetida à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/ UNESP Botucatu, protocolado sob n.º 171/ 2012, obtendo parecer favorável. Foi também autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio) através da Autorização para atividades com finalidade científica n.º 44274-1 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

O plantel de Pinguins de Magalhães do Aquário de Santos constituía-se à época desse estudo de 27 animais sendo que todos possuíam anilhas numeradas e microchips; para finalidade deste estudo usamos o número das anilhas para identificação dos animais. Do total de pinguins, 13 (48%) apresentavam lesões de “bumblefoot”, destes dez apresentavam quadros compatíveis com a classificação III, segundo Oaks (1993), sendo incluídos dessa forma como objetos desse estudo. Os dez animais selecionados apresentavam uma, duas, três ou quatro lesões em membros pélvicos. Tais aves foram pré-avaliadas por meio de radiografias dos membros afetados, além de exames hematológicos e bioquímicos; estes exames complementares serviram como critério de exclusão, visando descartar do experimento as aves que apresentaram comprometimento outro que não o da infecção localizada.

Os animais selecionados foram aleatoriamente divididos em dois grupos denominados de grupo terapia fotodinâmica (TFD) e antibiótico (ATB). Cada grupo constou com um mínimo de 11 lesões, sendo que cada animal, independente do número de lesões, podendo ser uni ou bilateral, constou exclusivamente em um único grupo. Cada lesão foi considerada individualmente mesmo que um mesmo animal apresentasse múltiplos ferimentos, podendo estar localizado em qualquer parte do membro pélvico, usualmente em dígitos, coxim plantar e tarsometatarso. Optou-se que o experimento transcorresse durante o horário de expediente normal do Aquário de Santos para evitar alterações na rotina do parque, dessa forma as amostras foram coletadas a intervalos de duas semanas (14 dias), evitando-se fins de

semana quando a equipe de trabalho é reduzida. Foram tomadas até sete amostras por lesão com intervalos de 14 dias, perfazendo um período máximo de 84 dias, podendo ser tomadas menos amostras caso a ferida cicatrizasse em período menor que o previsto para observação. Após esse período caso a ferida não estivesse completamente cicatrizada, deu-se prosseguimento ao tratamento, no entanto novos dados não foram coletados. As aves foram alimentadas com a mesma dieta a que estão habituados, cerca de 400g de sardinha ou manjuba duas vezes ao dia. Todos os animais utilizados neste experimento foram mantidos em recinto de 45 m² provido de área seca revestida de pavimentação cenográfica, sendo 70% de sua área ocupada por tanque de água salgada para livre natação. A água salgada é captada de estuário próximo ao Aquário de Santos e sofre processo de decantação antes de preencher o tanque, além de filtragem constante por meio de coleta de água de superfície do tanque e passagem por bombas de filtragem.

No dia anterior ao início do experimento, todos os animais selecionados foram temporariamente alocados em recinto de quarentena, com o objetivo de mantê-los em jejum de 12 horas previamente ao procedimento cirúrgico. As aves foram sedadas com midazolam¹ na dose de 2 mg/kg associado à cetamina S² na dose de 5 mg/kg e induzidas à anestesia via máscara inalatória com isoflurano³ em concentração que variou entre 1% a 2,5%.

Foram realizados registro fotográfico da lesão inicial em mesa fotográfica estativa, coleta de amostra de sangue, radiografia dos membros afetados e debridamento das lesões. Em seguida, tomou-se outro registro fotográfico da ferida pós-cirúrgica para avaliação da área da lesão remanescente.

Nos pinguins do grupo TFD:

- Coleta de amostra de secreção da ferida remanescente através de swab armazenada em meio de Stuart destinada a cultura bacteriológica com estimativa semi quantitativa de UFC e teste de sensibilidade a antibióticos, esta amostra foi rotulada como *pré-tratamento*.

¹ Dormonid injetável, Laboratório Roche

² Clortamina, laboratório Biochimico

³ Isoforine, Laboratório Cristalia

- Aplicação de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre a lesão.
- Após, outra amostra de secreção da ferida foi coletada através de swab e armazenadas em meio de Stuart destinada à cultura bacteriológica com estimativa semi quantitativa de UFC e teste de sensibilidade a antibióticos, esta amostra foi rotulada como *pós-tratamento*.
- O membro afetado foi então protegido com gaze, almofada de silicone gel¹, atadura autocolante ou atadura crepe fixada com esparadrapo. Este curativo tem por objetivo diminuir o impacto da ferida sobre o solo e diminuir a contaminação, no entanto não evita a contaminação uma vez que não é impermeável e o animal defeca constantemente.
- Durante todo período de observação manteve-se três vezes por semana os seguintes procedimentos: lavagem dos pés com água corrente e solução degermante de clorexidina a 4%, aplicação da TFD sobre a lesão, novo curativo com gaze, almofada de silicone gel, atadura autocolante ou crepe fixada com esparadrapo.

Nos pinguins do grupo ATB:

- Coleta de amostra de secreção da ferida remanescente através de swab e armazenadas em meio de Stuart destinadas a cultura bacteriológica com estimativa semi quantitativa de UFC e teste de sensibilidade a antibióticos.
- Aplicação de pomada de neomicina/ bacitracina² sobre a lesão e enrofloxacin 15 mg/kg IM³. O membro afetado foi então protegido com gaze, almofada de silicone gel³, atadura autocolante ou crepe fixada com esparadrapo. Este curativo tem por objetivo diminuir o impacto da ferida sobre o solo e diminuir a contaminação, no entanto não evita a contaminação uma vez que não é impermeável e o animal defeca constantemente.

¹ Placa Skingel sem tecido, Ortho Pauher

² Nebacetin pomada, laboratório Nycomed Pharma

³ Baytril injetável, laboratório Bayer

- Diariamente foi feito carprofeno¹ 4 mg/kg VO durante alimentação e aplicação de enrofloxacin² 15 mg/kg IM ou outro antibiótico mais adequado conforme resultado do antibiograma.
- Durante todo período de observação manteve-se três vezes por semana os seguintes procedimentos: lavagem dos pés com água corrente e solução degermante de clorexidina a 4%, aplicação de pomada de neomicina/bacitracina³ sobre a lesão, novo curativo com gaze, almofada de silicone gel⁴, atadura autocolante ou crepe fixada com esparadrapo.

A cada 14 dias (momentos 14, 28, 42, 56, 70 e 84), todas as aves foram sedadas com midazolam⁵ na dose de 2 mg/kg associado à cetamina S⁶ na dose de 5 mg/kg e induzidas à anestesia via máscara inalatória com isoflurano⁷ em concentração que variou entre 1% a 2,5%, para registro fotográfico da lesão em mesa fotográfica estativa, coleta de amostra de sangue, coleta de amostra de secreção da ferida destinada a cultura bacteriológica com estimativa semi quantitativa de UFC e teste de sensibilidade a antibióticos conforme descrito anteriormente para cada grupo.

Os exames hematológicos e bioquímicos foram realizados no laboratório de patologia clínica do Aquário de Santos e os exames microbiológicos (cultura e antibiograma) foram realizados em laboratório comercial localizado nas proximidades (Instituto de Análises Clínicas de Santos).

¹ Carprofan comprimidos, laboratório Agener União

² Baytril injetável, laboratório Bayer

³ Nebacetin pomada, laboratório Nycomed Pharma

⁴ Placa Skingel sem tecido, Ortho Pauher

⁵ Dormonid injetável, Laboratório Roche

⁶ Clortamina, laboratório Biochimico


⁷ Isoforine, Laboratório Cristalia

PROCEDIMENTOS ADOTADOS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA

A ferida foi instilada com solução de azul de metileno, solução aquosa em concentração de 300 μM (AUDAZ Brasil - <http://www.audazbrasil.com.br/>) por um período pré-irradiação de 5 minutos. Para irradiação utilizou-se o equipamento Laser RECOVER MM Optics (<http://pt-br.mmo.com.br/>) em pontos equidistantes a um centímetro, tantos quantos foram necessários para cobrir todo o ferimento, sendo no mínimo um e no máximo sete pontos por lesão.

Os seguintes parâmetros foram utilizados:

Tabela 2 – Parâmetros de irradiação utilizados nas lesões de pododermatite em pinguim de Magalhães tratados com TFD:

Comprimento de onda	Energia por ponto	Densidade de energia	Potência	Densidade de potência	Tempo de exposição por ponto	Esquema de irradiação
660 nm	4 Joules	140 J/cm ²	100 mW	3,92 W/ cm ²	40 segundos	

AVALIAÇÃO DA ÁREA DE LESÃO:

Para o registro fotográfico da área da lesão citados anteriormente, os animais anestesiados foram posicionados em mesa estativa (Tokina CS 1070 com lâmpadas fluorescentes), dotada de suporte graduado. Uma câmera fotográfica (Canon EOS T3i com 18/55 mm IS) equipada com lente macro (Objetiva Canon 100mm IS L USM 2.8) foi acoplada ao suporte graduado da mesa a uma distância constante de 30 cm. Todas as fotografias foram feitas acompanhadas de uma etiqueta em papel milimetrado que foi usada como escala de referência, nesta etiqueta constava a área demarcada de 1 (um) centímetro quadrado, o número da anilha do animal e a letra 'D' quando se tratava do membro pélvico direito e 'E' para o membro pélvico esquerdo.

Posteriormente as imagens foram analisadas utilizando-se o Image J (software em Java para processamento e análise de imagens - **Wayne Rasband**, National Institute of Mental Health, USA) visando avaliar a área da lesão em centímetros quadrados.

MICROBIOTA ASSOCIADA E ANTIBIOGRAMAS

A amostra foi colhida em “swab” e transportada em meio de Stuart, identificado com o número do animal, data e área da colheita. No caso dos animais tratados com terapia fotodinâmica, também foi identificado se a colheita foi pré ou pós-tratamento.

O Instituto de Análises Clínicas de Santos – IACS, que analisou as amostras, adota o seguinte procedimento padrão:

As amostras são semeadas em placas de ágar sangue e ágar chocolate de modo à obter colônias isoladas. Um tubo com meio de thioglicolato é incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em ambiente aeróbico; as placas de ágar são incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 10% de CO_2 (método da vela) e umidade (algodão umedecido com água), durante 48 horas. Após a incubação, são feitas a leitura das placas para verificar os diferentes tipos de colônias isoladas e identificadas as espécies que apresentaram um crescimento significativo.

Os reagentes utilizados são testados com organismos conhecidos para avaliar as reações negativas e positivas. As bactérias Gram negativas são identificadas pelo sistema Bac-Tray, que se compõe de três diferentes conjuntos de provas bioquímicas (Bac-Tray I, II e III). O Bac-Tray I e II se destina à identificação de bactérias Gram negativas oxidase negativa (Enterobactérias ou não) e o Bac-Tray III é utilizado para bactérias Gram negativas oxidase positiva. Para diferenciar estreptococos de estafilococos ou para diferenciar bacilos Gram positivos de micobactérias é utilizado teste de catalase.

Teste de coagulase em lâmina é usado para identificar *Staphylococcus aureus*. Teste de sensibilidade a novobiocina é usado para identificar *Staphylococcus* spp e *S. saprophyticus*. Reportam-se os microrganismos isolados quantitativamente: + (raros), ++ (alguns), +++ (vários) e ++++ (numerosos).

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos é o de difusão com disco. Foram testados os seguintes antibióticos: amicacina, ceftazidima, ciprofloxacina, clindamicina, nitrofurantoína, norfloxacina, bacitracina, neomicina, enrofloxacina, penicilina e streptomina, conforme a técnica proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2013).

TESTE DE RESISTÊNCIA BACTERIANA IN VITRO À TERAPIA FOTODINÂMICA:

Foram selecionados quatro microrganismos isolados a partir das lesões de pododermatite encontradas durante o experimento conforme Tabela 3:

Tabela 3 Microrganismos isolados a partir de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) que apresentaram resistência a maior número de antibióticos:

Microrganismo	Amicacina	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Clindamicina	Gentamicina	Nitrofurantoína	Norfloxacina	Penicilina	Bacitracina	Neomicina	Enrofloxacin	Streptomycin
<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	-	R	R	R	-	R	R	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	-	S	-	S	R	I	-	R	R	R	-
<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	S	-	R	S	R	-	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	-	R	R	R	S	R	R	R	R	R	-

As quatro cepas bacterianas utilizadas para o teste *in vitro* de sensibilidade bacteriana à terapia fotodinâmica foram selecionadas pelo critério de resistência ao maior número de antibióticos testados em antibiograma. Utilizamos esse critério porque após longo período de tratamentos com antibióticos, como é o caso do 'bumblefoot', não é incomum que o clínico não encontre entre as drogas disponíveis para uso em pinguins, um antibiótico adequado para continuidade do tratamento. Dessa forma, o objetivo foi testar quantitativamente a eficiência da TFD como alternativa nesses casos.

Como fonte de luz foi utilizado um aparelho de propriedade do Laboratório de Terapia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP). Trata-se de LED vermelho, comprimento de onda 660nm (± 15), potência 320 mW, diâmetro de irradiação de 2 cm, irradiância de 100mw/ cm², voltagem de 2.5/2.6 volts e corrente de 600 mA. Os tempos de irradiação foram 5 segundos (0,5 J/cm²), 10 segundos (1,0 J/cm²), 30 segundos (3,0 J/cm²), 1 minuto (6,1 J/cm²) e 2 minutos (12,2 J/cm²) de irradiação. Utilizou-se o azul de metileno

(AM) como fotossensibilizador, na concentração de 1mM (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA).

Os microrganismos foram cultivados em meio BHI em estufa à 37°C por 12 horas. Estes microrganismos foram retiradas das placas de crescimento com alça de plástico estéril, suspensos em solução tamponada fosfatada estéril (PBS com concentração final de NaCl 137mM, Fosfato 10mM, KCl 2.7mM, e pH de 7,4) e homogeneizadas em agitador tipo vortex para preparo do inóculo. Para estimar a concentração do inóculo, utilizou-se um espectrofotômetro emitindo luz de comprimento de onda de 540 nm para aferição da turbidez, sendo a amostra padrão, ou 'branco' calibrada em 100% de transmitância e a suspensão do inóculo ajustada em 10% (± 1) que corresponde à concentração de 107 UFC/ mL, como foi descrito por PFALLER et al. (1988).

Dentro de câmara de fluxo oito tubos do tipo *ependorf* marcados como **C** (controle), **L** (LED vermelho), **AM** (azul de metileno), **5''** (5 segundos de PDT), **10''** (10 segundos de PDT), **30''** (30 segundos de PDT), **1'** (1 minuto de PDT) e **2'** (2 minutos de PDT) foram dispostos para as quatro bactérias, todos preenchidos com 720 μ L de PBS estéril + 40 μ L do inóculo previamente homogeneizado. Nos tubos marcados como **C** e **L** foram adicionados 40 μ L de PBS, no tubo marcado como **AM** e todos os demais grupos teste (**5''**, **10''**, **30''**, **1'** e **2'**) foram adicionados 40 μ L de azul de metileno a 1 mM, dessa forma todos os tubos continham um volume final de 800 μ L. O azul de metileno foi adicionado paulatinamente de acordo com o desenrolar do experimento, respeitando o tempo de 5 minutos pré irradiação. No caso do grupo controle **AM**, o tempo de 5 minutos foi respeitado, a despeito de não haver irradiação, antes de passar para próxima etapa de diluições.

As colunas de uma placa de 96 poços foram marcadas na sequência **C**, **L**, **AM**, **5''**, **10''**, **30''**, **1'**, **2'** a partir da coluna 1 e as linhas foram marcadas com as diluições de **0** a **7** a partir da linha A (Figura 3). Com uma pipeta de oito canais foram colocados 180 μ L de PBS estéril em todos os grupos a partir da diluição **1**. Na diluição **0**, foram pipetados 180 μ L de PBS estéril somente para os grupos **C**, **L** e **AM**.

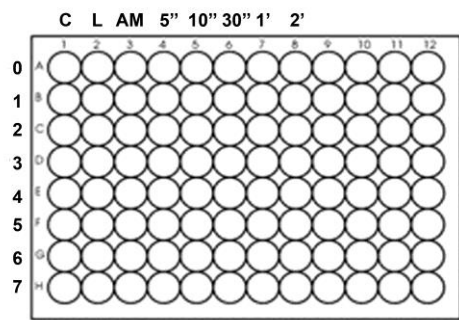


Figura 3 - Diagrama de uma placa de 96 poços marcadas para o experimento, sendo grupos dispostos em colunas e diluições em linhas:

Grupos C, L e AM: após homogeneização em vórtex dos respectivos *ependorfs* pipetou-se uma alíquota de 20 μ L que foi depositada na diluição **0** do grupo **C, L e AM** da placa. Desta forma, o volume final em cada poço somou 200 μ L.

Grupos 5'', 10'', 30'', 1' e 2': Foram pipetados 400 μ L dos *ependorfs* de cada grupo e depositados separadamente em poços da placa de cultura celular de 24 poços, a seguir foram irradiados com seus respectivos tempos. Após, uma amostra de 200 μ L de cada grupo foi adicionada aos seus respectivo poço na placa na linha correspondente a diluição **0**.

Em seguida, a diluição das amostras se deu da seguinte forma: com uma pipeta multicanal foram retirados 20 μ L do volume inicialmente disposto na diluição **0** de todos os grupo da placa de 96 poços. Estes volumes foram então homogeneizados nos poços das diluições (linha horizontal) imediatamente abaixo e assim sucessivamente até a última linha de diluição. Com esse procedimento cada fração de suspensão resultante era 10 vezes menor do que a anterior e a última diluição (**7**), correspondeu a uma suspensão com um volume 10^{-7} menor que a primeira (**0**).

A contagem de colônias para os grupos **C, L e AM** se deu da seguinte forma: com uma pipeta multicanal foram retiradas alíquotas de 10 μ L, previamente homogeneizadas, de cada diluição dos grupos **C, L e AM**, sendo retirado este volume individualmente, da diluição **2** até a diluição **7** da placa de 96 poços para os referidos grupos. Posteriormente estas amostras foram semeadas em forma de estria, de acordo com a metodologia de Jett et al.(1997), em triplicata, em placas de Petri com meio BHI. A semeadura se deu

por escorrimento até esgotamento das gotas, possibilitando assim a contagem das colônias após 12 horas de incubação a 37°C. Para os demais grupos o protocolo foi o mesmo, no entanto as amostras colhidas foram das diluições **0** até **6**.

EXAMES HEMATOLÓGICOS:

Foram coletadas amostras de sangue nos dias 0, 14, 28, 42, 56, 70 e 84. Estas amostras foram divididas em alíquotas de 0,5 mL armazenadas em tubo com EDTA (BD Microtainer 0,5 ml com ácido etilenodiamino tetra-acético) destinada à confecção de hemograma e alíquotas de 4,0 mL armazenadas em tubo sem anticoagulante (BD Vacutainer tampa vermelha) destinada à separação de soro para análise bioquímica.

A amostra destinada ao hemograma foi processada no laboratório de patologia clínica do Aquário de Santos imediatamente após a coleta. A contagem de hemácias e leucócitos foi feita por meio de câmara de Neubauer (10 microlitros da solução de diluição de 10 microlitros de sangue em 2 mL de corante Natt Herrick). A contagem diferencial de leucócitos foi feita por meio de microscópio óptico (aumento de 400 X) em esfregaço sanguíneo corado com corante Rosenfeld. O hematócrito foi avaliado em amostra inserida em microtubos sem heparina (microhematócrito) centrifugados a 5000 RPM por 5 minutos e após, avaliado em tabela para leitura de microhematócrito.

O soro sobrenadante do microtubo foi utilizado para leitura de proteínas plasmáticas em refratômetro. Um segundo tubo foi colocado em banho-maria a 57°C por 3 minutos e submetido à nova centrifugação a 5000 RPM por 5 minutos para nova leitura de proteínas plasmáticas, a diferença entre a primeira e a segunda leituras foi utilizada para determinação do fibrinogênio. A hemoglobina sanguínea foi avaliada por meio de teste colorimétrico utilizando-se Kit para Hemoglobina (Labtest) e analisador bioquímico semi-automático (Bioplus- BIO-200.)

A amostra destinada à bioquímica sanguínea foi centrifugada a 3000 RPM por 20 minutos imediatamente após a coleta. Foram realizados teste de função hepática (AST), teste de função renal (Ácido Úrico), avaliação de lesão

muscular (CK–MB), proteínas totais e frações (albumina e globulina) glicose, perfil lipídico (colesterol e triglicerídeos) e avaliação de lesão óssea (Fosfatase Alcalina) pelo método colorimétrico através de kits para bioquímica sanguínea (Labtest) e analisador bioquímico semi automático (Bioplus Bio-200), com exceção da globulina, que foi determinada pela diferença entre a proteína total e a albumina.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Avaliação da área de lesão: Inicialmente a distribuição das variáveis-resposta foi analisada com um dos critérios para escolha do método analítico. Devido à presença de desvios de um padrão Gaussiano de distribuição, o teste de Wilcoxon (SAS, 2011) foi usado para comparar a circunferência das lesões entre os grupos experimentais. A comparação entre os grupos foi realizada dentro de cada momento analisado. Curvas de sobrevivência (SAS, 2011) foram produzidas para exibir a taxa de cura das lesões entre os grupos experimentais. As taxas de cura foram comparadas com o teste Kaplan-Meier.

Microbiota associada e antibiogramas: Distribuições de frequência foram produzidas para estimar a prevalência de micro-organismos de interesse isolados das lesões e a percentagem de isolados resistentes a uma série de antimicrobianos. Significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

Teste de resistência bacteriana *in vitro* à Terapia Fotodinâmica: As concentrações bacterianas foram transformadas para escala log10 para análise. Análise de variância foi utilizada para comparar a concentração média de cada patógeno entre os tratamentos. O método de Tukey foi utilizado para ajustar os valores P resultantes de comparações múltiplas.

Exames hematológicos e bioquímicos: Foram descritas em gráficos a mediana de cada parâmetro hematológico e bioquímico dos grupos ATB e PDT.

RESULTADOS

5 – RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS COLETADAS:

Ambos os grupos constaram 11 lesões, sendo que no grupo TFD havia quatro animais e no ATB seis animais. A frequência de amostras coletadas por animal variou conforme o número de lesões e tempo de cicatrização, sendo a frequência mínima seis e a frequência máxima 21 (4,69% a 16,41%). A identificação individual, número de lesões por animal, frequência e porcentagem estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 Número de identificação dos pinguins utilizados no experimento, número de lesões por animal, frequência e porcentagem das amostras coletadas de cada indivíduo:

	Número de			
	Pinguim	lesões	Frequência	Porcentagem
ATB	23	1	7	5,47
	37	2	14	10,94
	67	1	6	4,69
	68	3	21	16,41
	80	2	14	10,94
	235	2	10	7,81
PDT	49	2	10	7,81
	94	4	20	15,63
	257	3	12	9,38
	264	2	14	10,94

O local da lesão variou entre coxim plantar (83,59%) e tarsometatarso (16,41%) (Tabela 5), sendo o lado mais afetado o direito (58,59%) (Tabela 6).

Tabela 5 – Frequência e porcentagem do local afetado por pododermatite encontradas em pinguins de Magalhães do plantel deste estudo:

Local	Frequência	Porcentagem	Frequência acumulada	Porcentagem acumulada
Coxim	107	83,59	107	83,59
Tarso	21	16,41	128	100

Tabela 6 – Frequência e porcentagem do lado afetado por pododermatite encontrados em pinguins de Magalhães do plantel deste estudo:

Lado	Frequência	Porcentagem	Frequência acumulada	Porcentagem acumulada
Direito	75	58,59	75	58,59
Esquerdo	53	41,41	128	100,00

Das 22 lesões tratadas em ambos os grupos, apenas oito (36,36%) alcançaram a cura no período de observação de 84 dias.

Das 128 amostras coletadas a maior porcentagem foi do grupo antibiótico com 56,25% ($f=72$), ficando o grupo tratado com Terapia Fotodinâmica com 43,75% do total ($f=56$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Frequência e porcentagem de amostras coletadas nos grupos terapia fotodinâmica e antibiótico:

Grupo	Frequência	Porcentagem	Frequência acumulada	Porcentagem acumulada
Antibiótico	72	56,25	72	56,25
TFD	56	43,75	128	100

ÁREA DE LESÃO:

Foi calculada a mediana da área das lesões por grupo em cada momento do tratamento, o que resultou no gráfico abaixo. Na comparação estatística entre os grupos dentro de cada momento, não houve diferença significativa ($P>0,05$) quanto à área da lesão no momento inicial '0' ($P=0,43$), nem nos momentos '14' ($P=1,0$), '42' ($P=0,38$), '56' ($P=1,0$), '70' ($P=0,55$) e '84' ($P=0,44$). Sendo digno de nota que o momento '28' ($P=0,06$) apresenta tendência estatística a favor do grupo tratado com Terapia Fotodinâmica (Figura 4).

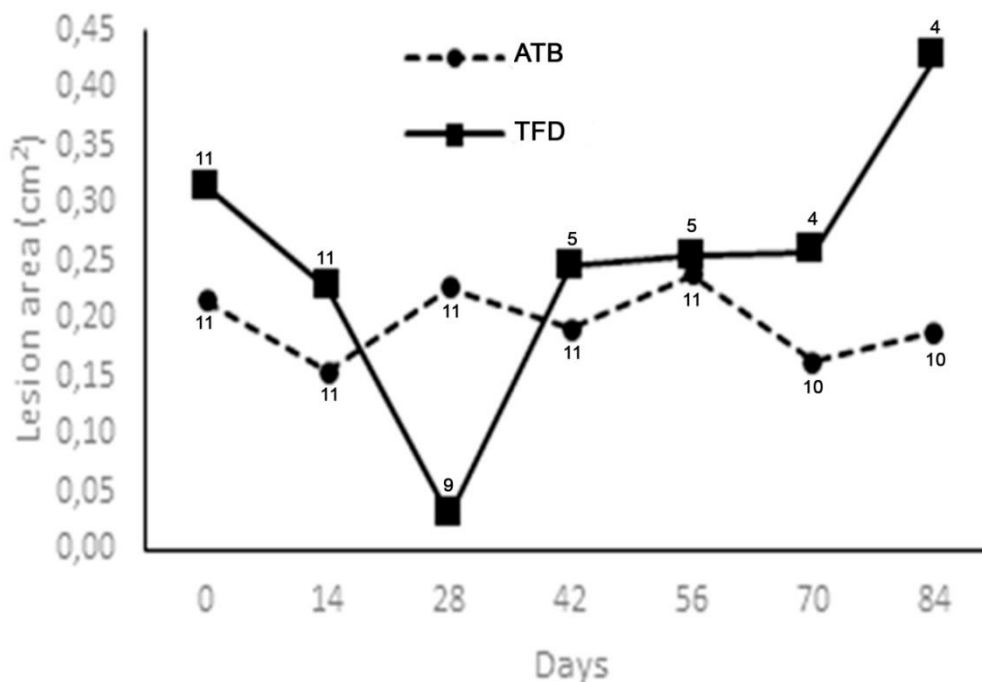


Figura 4 - Relação entre momento do tratamento em dias e a mediana das áreas de lesão em cm^2 nos grupos terapia fotodinâmica (TFD) e antibiótico (ATB). Em destaque o número de lesões não cicatrizadas restantes por grupo em cada momento:

É possível observar que o grupo ATB demonstra pouca variação tanto no tamanho da área de lesão quanto no número de lesões não cicatrizadas ao longo do tempo. O grupo TFD apresenta diminuição pronunciada da área de lesão nos primeiros 28 dias e cicatrização de mais da metade das lesões até 56 dias de tratamento, nota-se também uma tendência a aumento do tamanho das lesões influenciada pelas feridas não cicatrizadas remanescentes.

Na comparação entre as taxas de cura entre os grupos nota-se significativa diferença ($P=0,02$) a favor da Terapia Fotodinâmica que apresentou 63,64% ($f=7$) de lesões curadas contra apenas 9,09% ($f=1$) das lesões tratadas com antibióticos (Tabela 8).

Tabela 8 – Comparação entre o número de lesões curadas e respectivas frequência e porcentagem acumulada nos grupos antibiótico e terapia fotodinâmica:

Grupo	N° lesões	N° lesões		Porcentagem acumulada
		curadas	Frequência	
Antibiótico	11	1	1	9,09
TFD	11	7	7	63,64

Com relação ao tempo de tratamento até a completa cicatrização, houve significativa diferença entre os grupos ($P=0,01$). O grupo tratado com TFD apresentou uma variação entre 28 e 70 dias, sendo a média 42 dias, já no grupo tratado com antibióticos a única lesão cicatrizada levou 70 dias até seu completo fechamento (Figura 5).

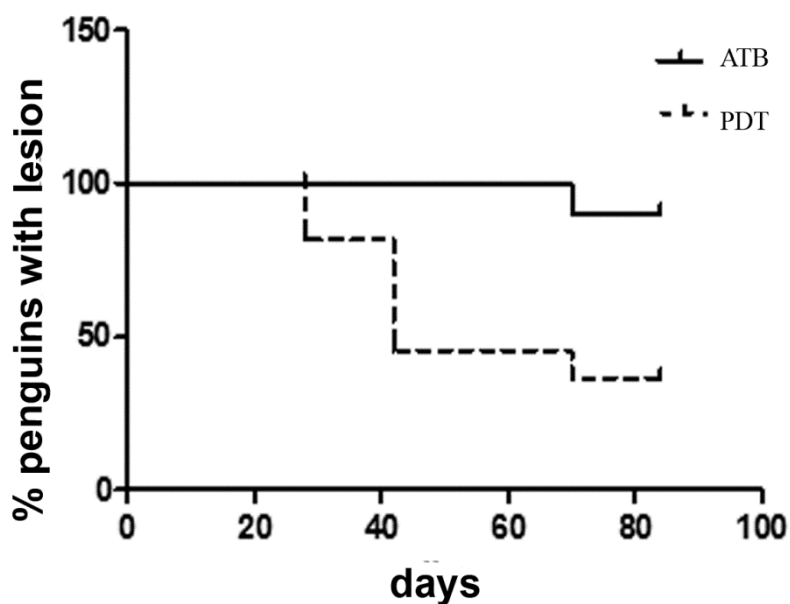


Figura 5 – Porcentagem de animais com lesão nos diversos momentos de observação nos grupos terapia fotodinâmica (PDT) e antibiótico (ATB) demonstrando o tempo até completa cicatrização:

As fotos a seguir mostram a evolução da área e aspecto de cada lesão nos diversos momentos de observação. As sequências estão agrupadas em Grupo Terapia Fotodinâmica (TFD) e Grupo Antibiótico (ANT). Cada sequência corresponde à evolução de uma única lesão identificada pelo número do animal, local da lesão que pode variar entre tarsometatarso direito (TD) ou esquerdo (TE) e coxim plantar direito (CD) ou esquerdo (CE):

Sequências de fotos mostrando evolução das lesões tratadas com Terapia Fotodinâmica (TFD):

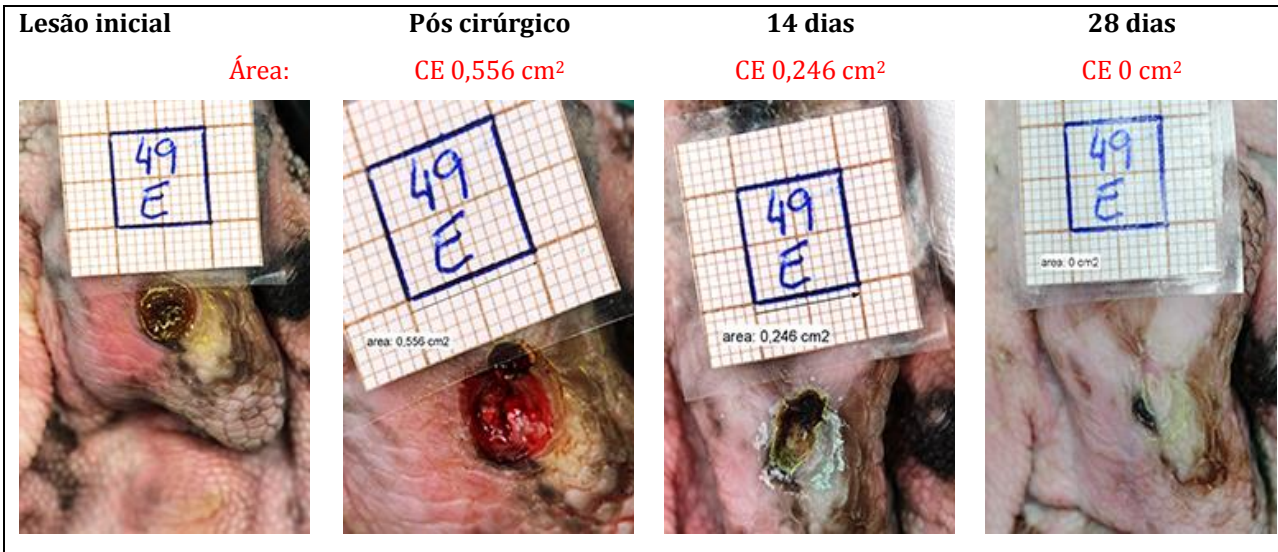


Figura 6 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 49.

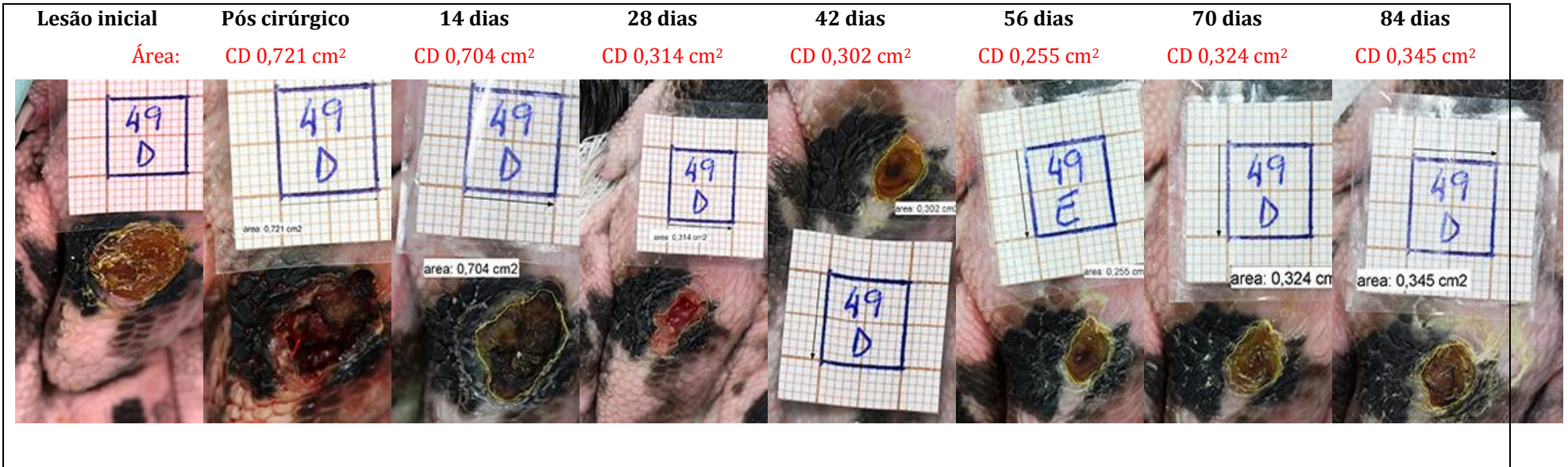
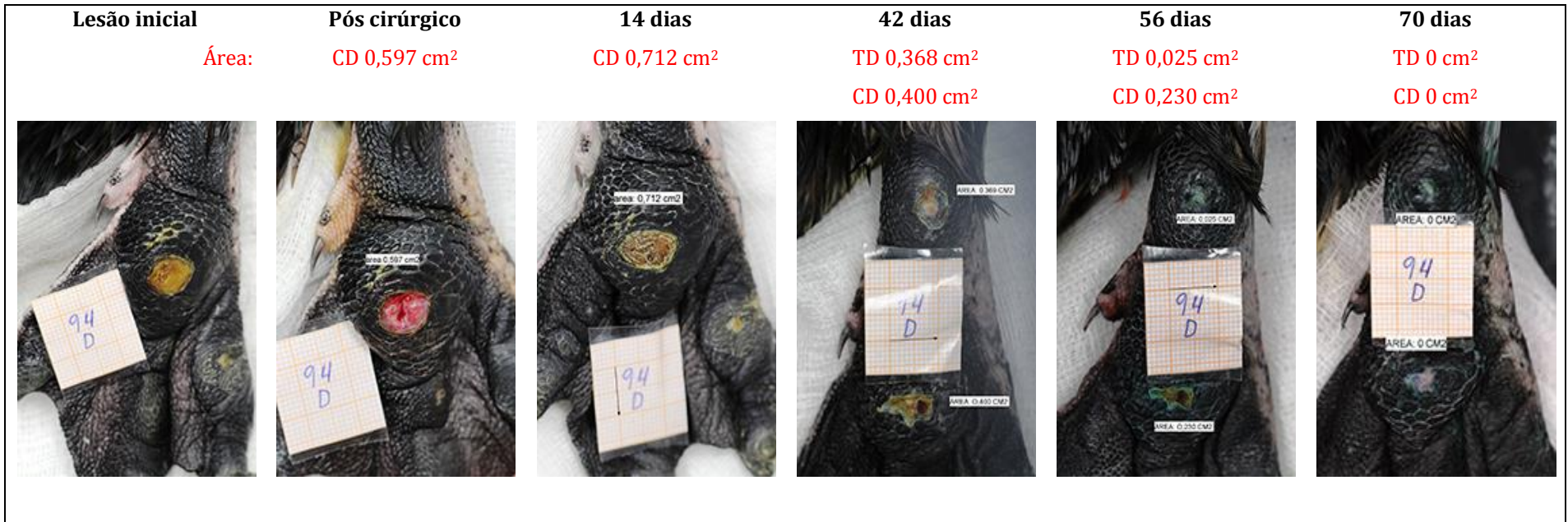


Figura 7 - Evolução da lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães n. 49.

Fig.8 Evolução lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar e tarsometatarso esquerdo do P. de Magalhães n. 94.



Fig.9 Evolução lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar e tarsometatarso direito do P. de Magalhães n. 94.



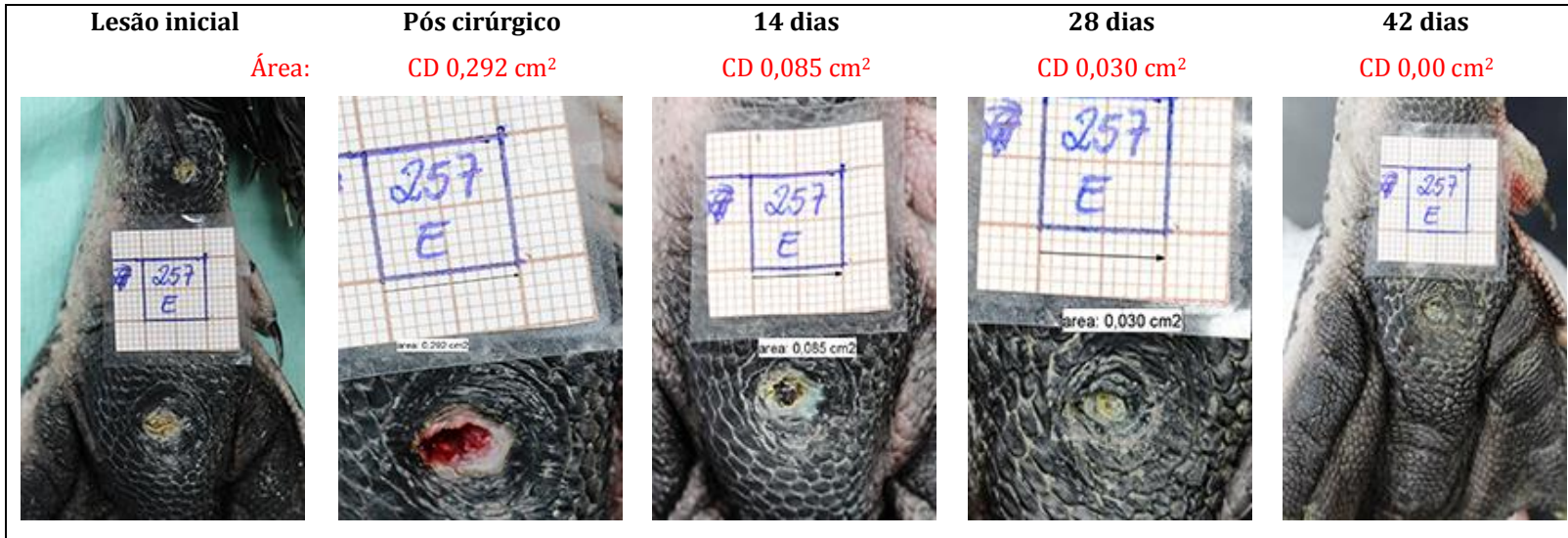


Figura 10 Evolução lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 257.

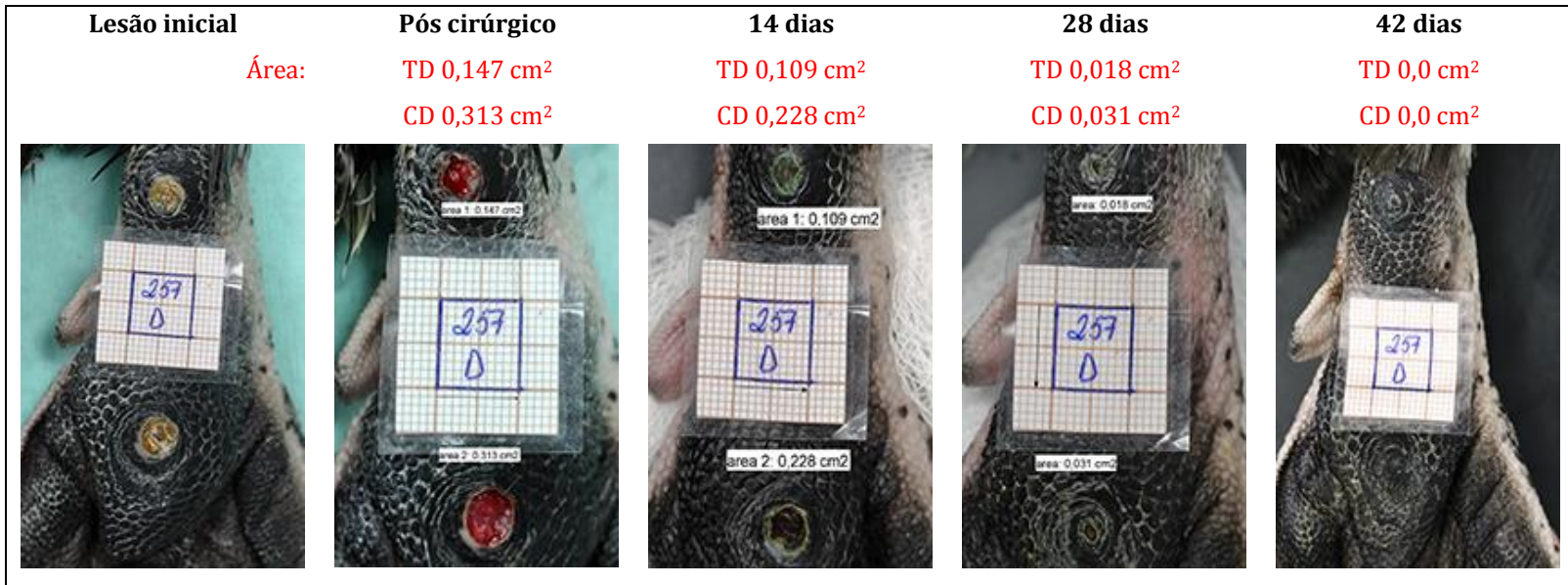


Figura 11 Evolução lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar e tarsometatarso direitos do P. de Magalhães n. 257.

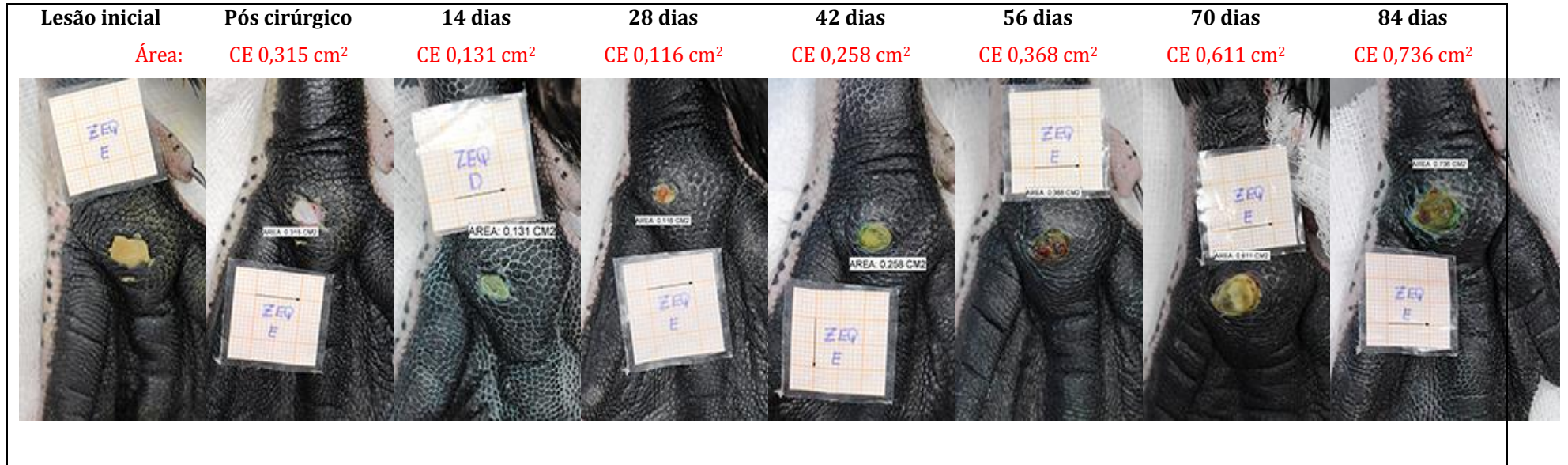


Figura 12 Evolução da lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 264.



Figura 13 Evolução da lesão de pododermatite tratada com TFD em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães n. 264.

Sequências de fotos mostrando evolução das lesões tratadas com antibióticos (ANT):

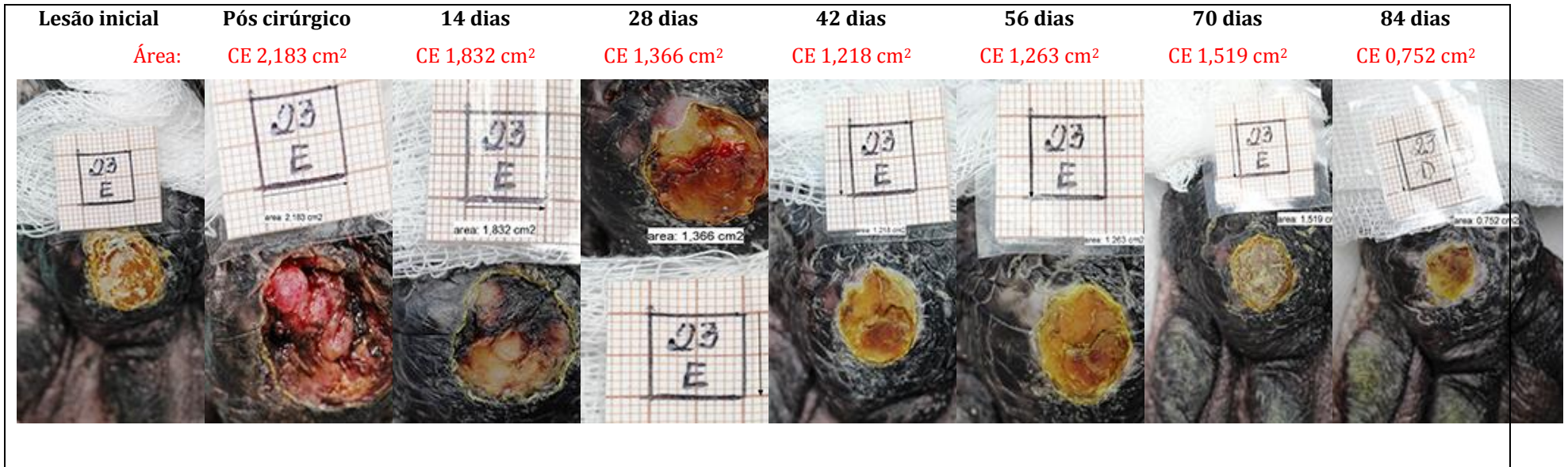


Figura 14 Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 23.

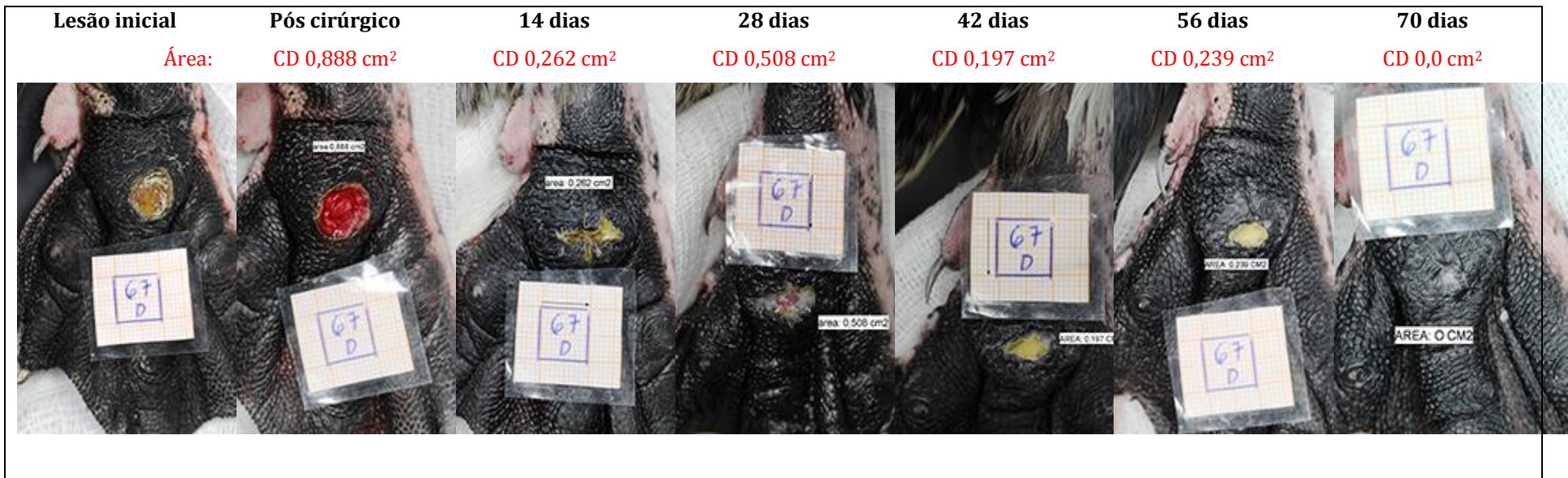


Figura 15 Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães n. 67.



Figura 16 Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 37.

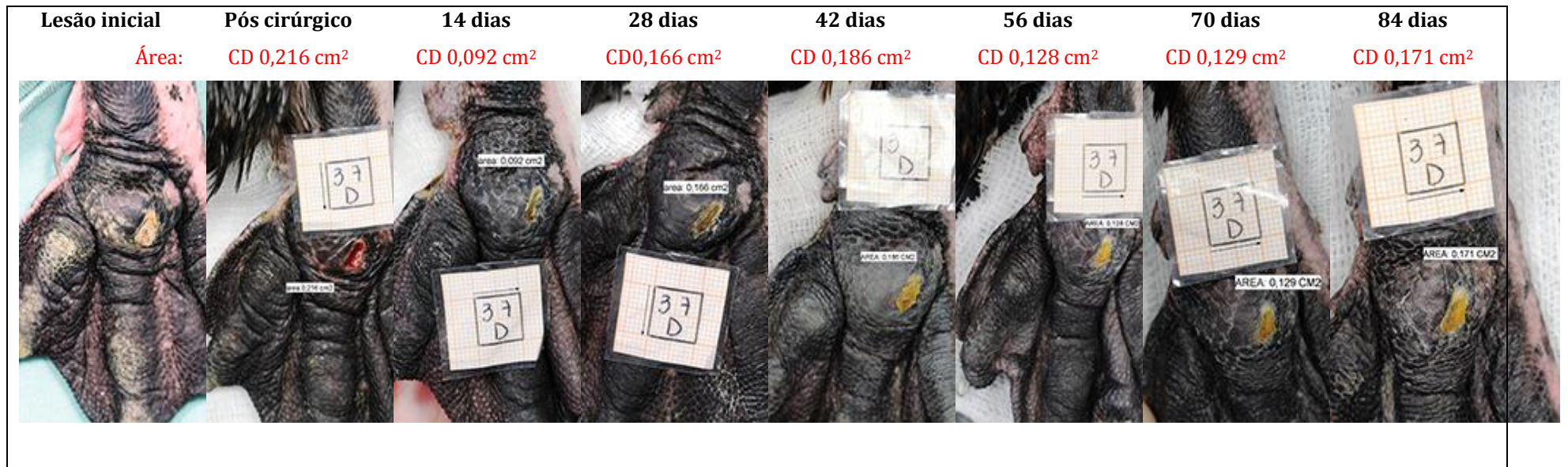


Figura 17 Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães n. 37.

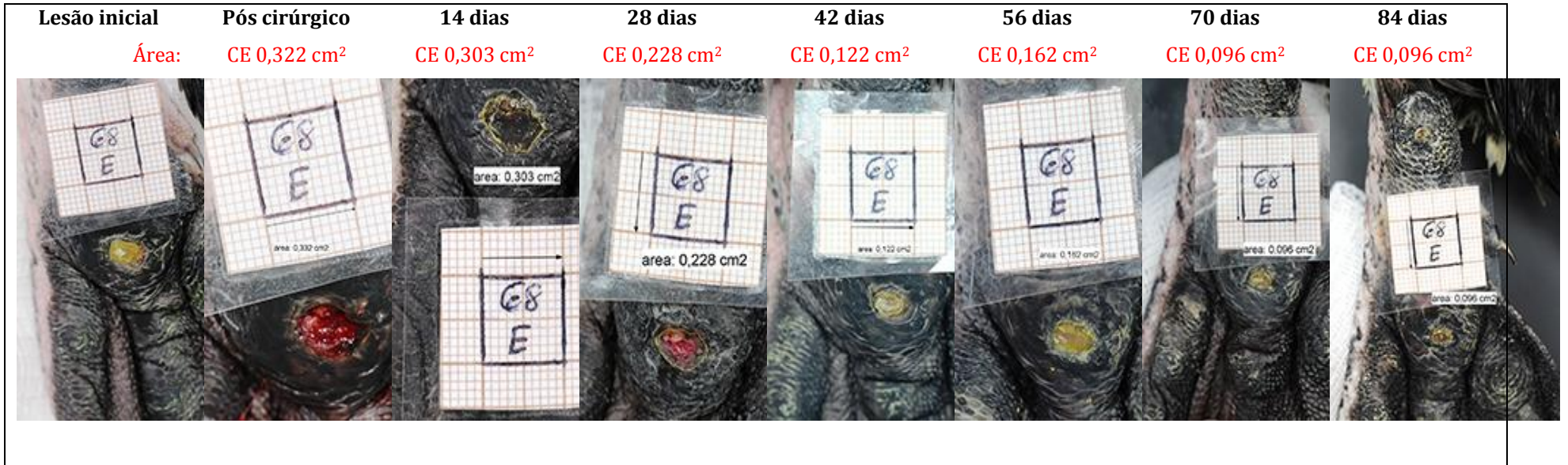


Figura 18 Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 68.

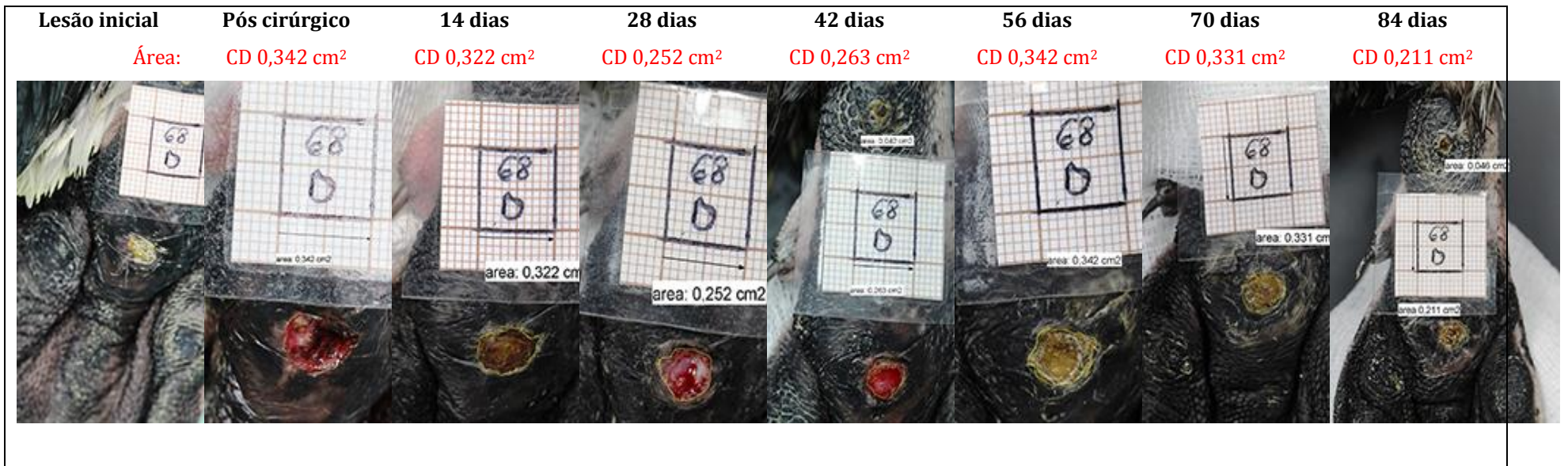


Figura 19 Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães n. 68.

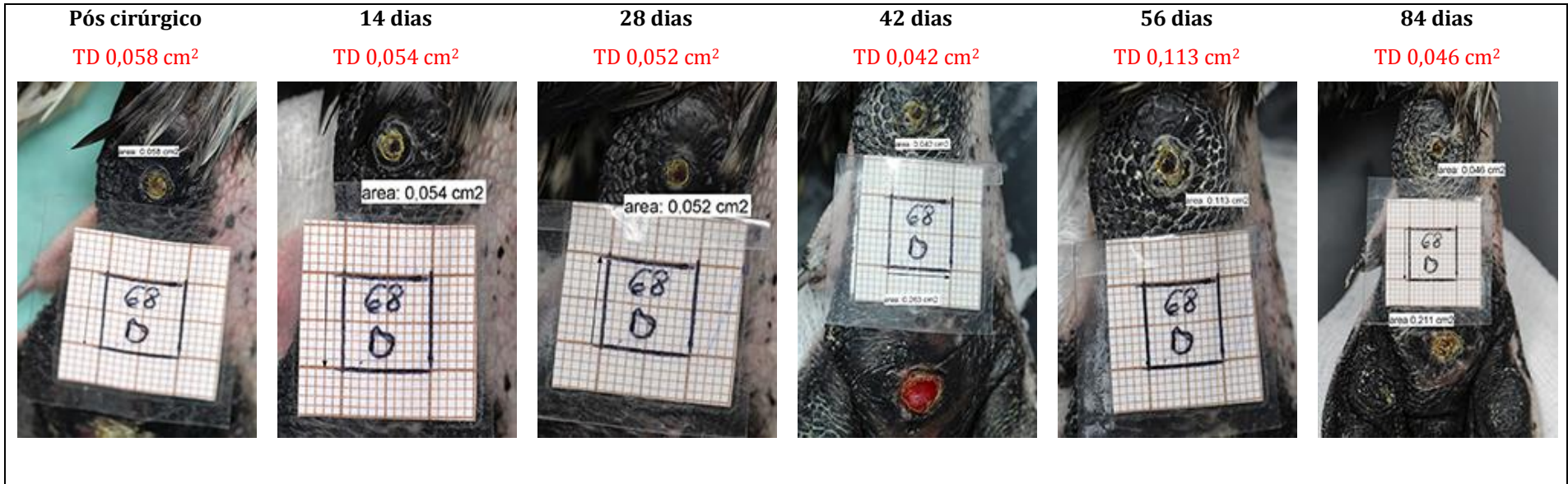


Figura 20 Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em tarsometatarso direito do Pinguim de Magalhães n. 68.



Figura 21 Evolução lesão pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar e tarsometatarso direitos do P. Magalhães n. 235.

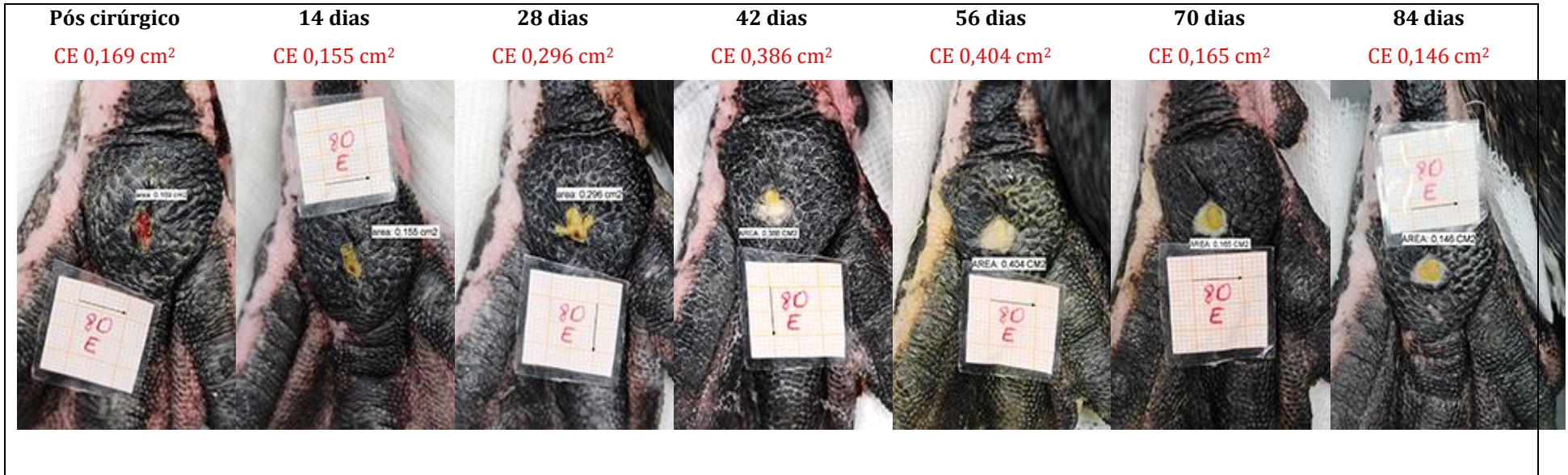


Figura 22 Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar esquerdo do Pinguim de Magalhães n. 80.

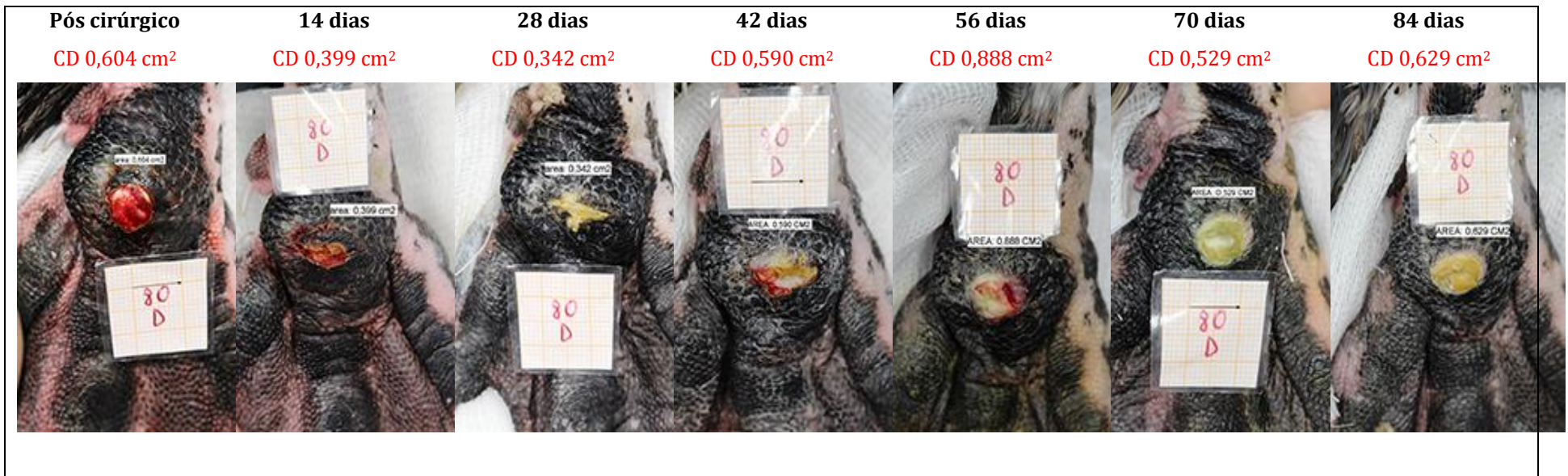


Figura 23 Evolução da lesão de pododermatite tratada com antibióticos em coxim plantar direito do Pinguim de Magalhães n. 80.

MICROBIOTA ASSOCIADA:

Com 16,55%, *Escherichia coli* foi o microrganismo mais encontrado ($f=23$), seguido de *Staphylococcus spp.* com 13,67% ($f=19$), 10,79% de *Proteus mirabilis* ($f=15$), 9,35% de *Enterococcus spp.* ($f=13$), 6,47% de *Pseudomonas spp.* ($f=9$), *Morganella morganii* 4,32% ($f=6$), *Staphylococcus aureus* 3,6% ($f=5$), *Pseudomonas aeruginosa* 2,88% ($f=4$), *Klebsiella spp.* 2,16% ($f=3$), *Streptococcus spp.* 1,44% ($f=2$), *Providencia retgerii* 0,72% ($f=1$) (Figura 24).

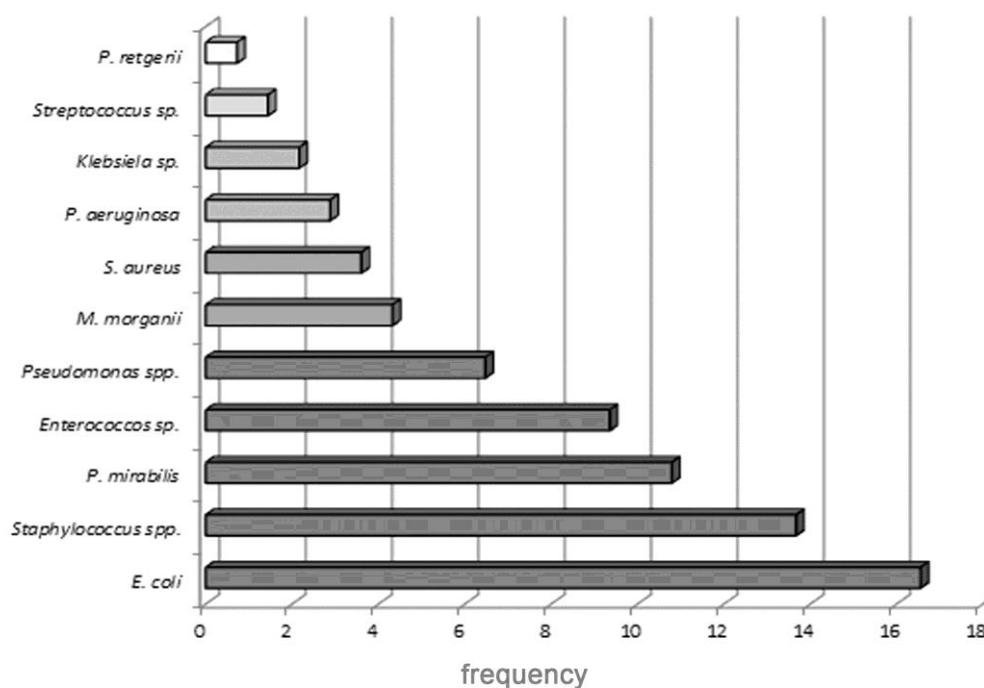


Figura 24 – Prevalência de microrganismos encontrados no total de amostras coletadas das lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) ao longo de todo período de observação em ambos os grupos:

Dentre as bactérias sobreviventes à TFD, 16,67% foram *Escherichia coli* ($f=8$), 10,42% *Enterococcus sp.* ($f=5$), 4,17% de *Pseudomonas aeruginosa* ($f=2$), 2,08% de *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Streptococcus sp.* e *Morganella morganii* ($f=1$) (Figura 25).

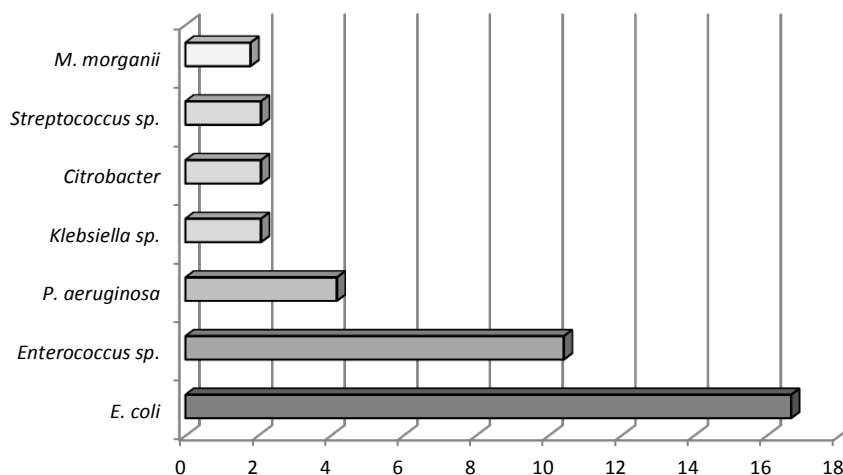


Figura 25 – Prevalência de microrganismos encontrados nas amostras coletadas das lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) ao longo de todo período observado no grupo TFD que sobreviveram ao tratamento:

Na comparação da prevalência de microrganismos entre os grupos, não se observou diferenças significativas (Figura 26).

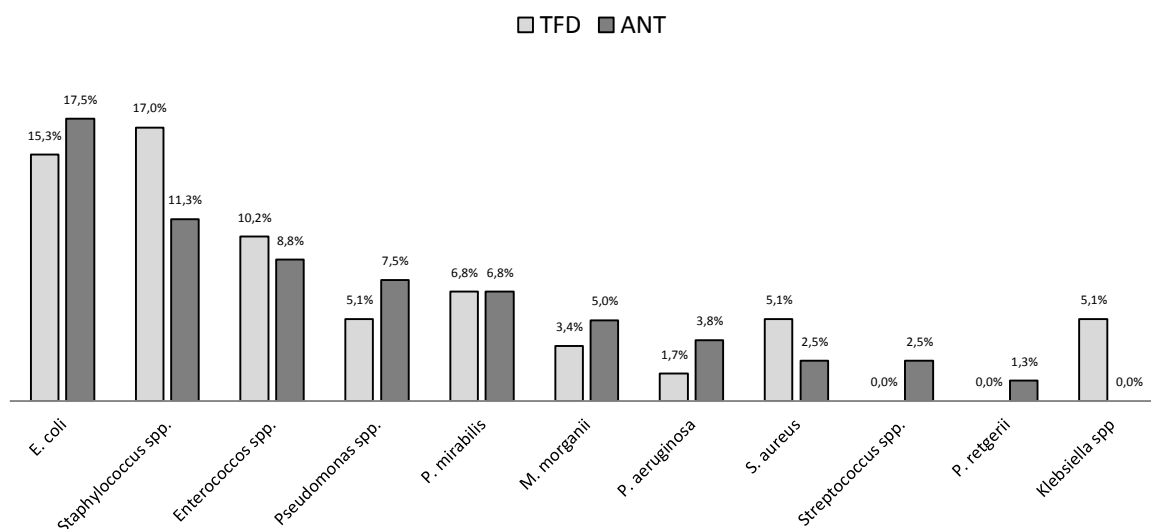


Figura 26 – Comparação entre prevalência de micro-organismos isolados de amostras de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) ao longo de todo período de observação nos grupos antibiótico (ANT) e terapia fotodinâmica (TFD):

A tabela abaixo mostra o total de lesões do grupo TFD em que cada microrganismo foi isolado e o número do mesmo microrganismo isolados logo após o tratamento, sendo as mais prevalentes *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*, (Tabela 09).

Tabela 9 – Prevalência de cada espécie bacteriana isolada do total de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) no grupo tratado com TFD e prevalência após o tratamento:

	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>M. morganii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Total isolado	10	8	4	4	3	3	3	2	1
Pós TFD	3	6	3	2	3	1	1	1	1

Dentre as quatro bactérias mais encontradas, observou-se a prevalência de cada patógeno por momento de amostragem dentro de cada grupo. Nenhum dos microrganismos foi prevalente durante todos os diferentes momentos de amostragem, tanto no grupo TFD quanto no antibiótico (Figura 27).

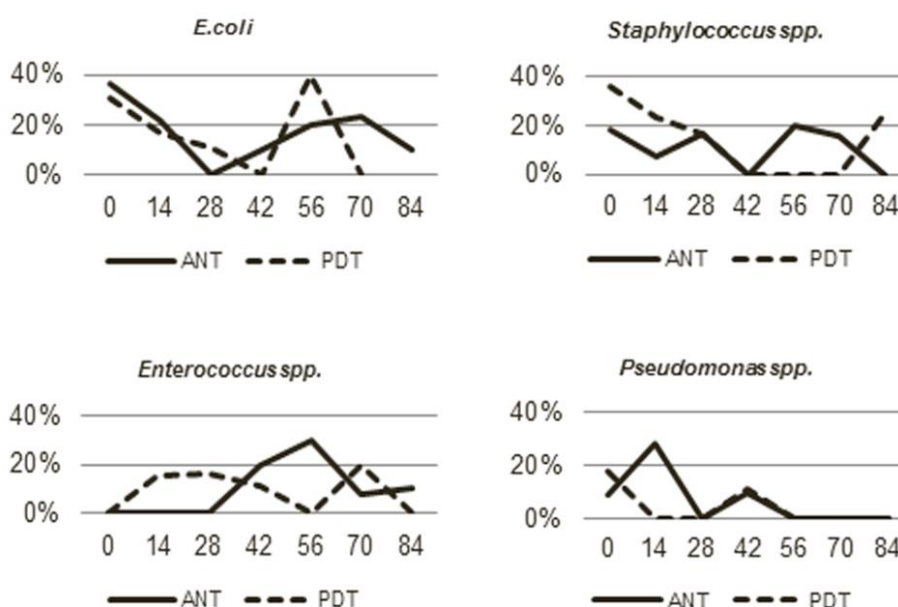


Figura 27 – Prevalência em porcentagem dos quatro microorganismos mais encontrados nas lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos antibiótico (ANT) e terapia fotodinâmica (PDT):

ANTIBIOGRAMAS:

Dos antibióticos testados nos dois grupos, drogas como bacitracina e neomicina, comumente encontradas em formulações para uso tópico, apresentaram mais de 90% de resistência. Das drogas de amplo espectro desafiadas, apenas Gentamicina, Amicacina, Nitrofurantoína e Ceftazidima apresentaram menos de 30% de resistência frente aos microrganismos encontrados (Tabela 10).

Tabela 10 – Prevalência da resistência a antimicrobianos do total de amostras bacterianas isoladas de lesões de pododermite em pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) em ambos os grupos:

	Neomicina	Bacitracina	Enrofloxacina	Clindamicina	Norfloxacina	Penicilina	Ciprofloxacina	Gentamicina	Amicacina	Nitrofurantoína	Ceftazidima
Frequência acumulada	95	98	98	24	95	36	96	80	81	88	46
Frequência resistentes	91	93	71	15	36	13	31	22	19	19	5
% resistentes	95,8	94,9	72,5	62,5	37,9	36,1	32,3	27,5	23,5	21,6	10,9

Não houve diferença quanto à confiabilidade dos antibióticos desafiados nas amostras do grupo testado logo após a TFD (Tabela 11).

Tabela 11 – Prevalência da resistência a antimicrobianos em amostras bacterianas isoladas de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) colhidas após a TFD:

	Bacitracina	Enrofloxacina	Neomicina	Clindamicina	Gentamicina	Norfloxacina	Ciprofloxacina	Amicacina	Penicilina	a	Ceftazidima
Frequência acumulada	28	28	27	6	21	27	27	22	9	25	14
Frequência resistentes	28	26	24	5	7	8	8	6	2	2	1
% resistentes	100	92,9	88,9	83,3	33,3	29,6	29,6	27,3	22,2	8	7,1

Na comparação da prevalência de resistência à antimicrobianos entre os grupos não se observa diferenças significativas (Figura 28).

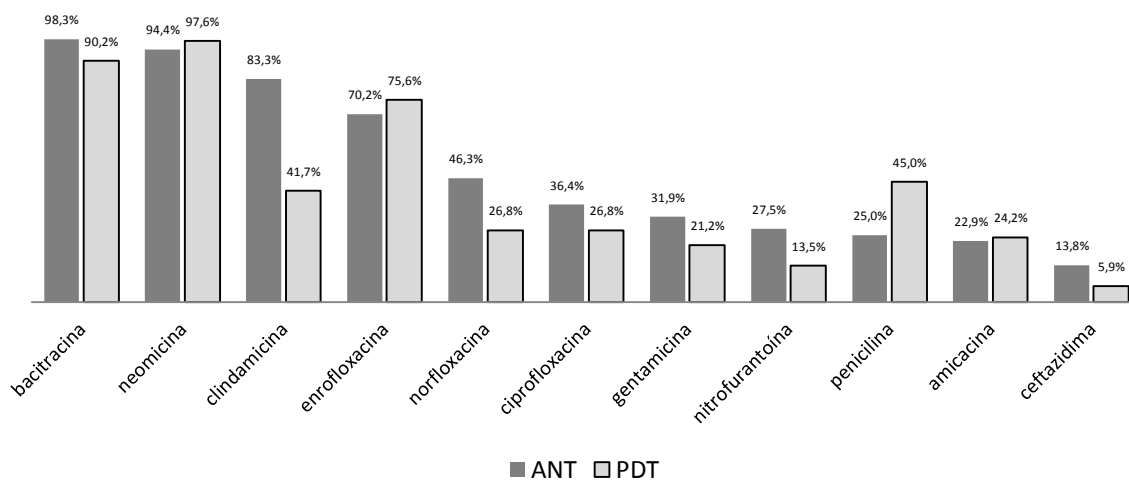


Figura 28 – Comparação da prevalência da resistência a antimicrobianos em amostras bacterianas isoladas de lesões de pododermatite em pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) entre os grupos antibiótico (ANT) e terapia fotodinâmica (PDT):

TESTE DE RESISTÊNCIA IN VITRO À TERAPIA FOTODINÂMICA:

Escherichia coli: Não houve diferenças significativas no número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ mL) entre os grupos controle total (C), somente luz (L), somente azul de metileno (AM) e cinco segundos de TFD (5''). Entre o grupo cinco segundos (5'') e dez segundos (10'') de TFD houve redução significativa do número de colônias (diminuição de aproximadamente 50% , $P=0,0017$). O mesmo ocorreu entre os grupos dez (10'') e trinta (30'') segundos de TFD (diminuição de aproximadamente 50%, $P=0,0001$). Não houve significativa redução entre os grupos trinta segundos (30'') e um minuto (1') ($P=0,9999$), voltando a reduzir aproximadamente 50% do número de UFC/ mL entre um minuto (1') e dois minutos (2') de TFD ($P=0,0516$). Houve redução de aproximadamente 90% do número de UFC/ mL entre os grupos CTR, L, MB e 5'' de TFD e o grupo 2' de TFD ($P=0,0001$).

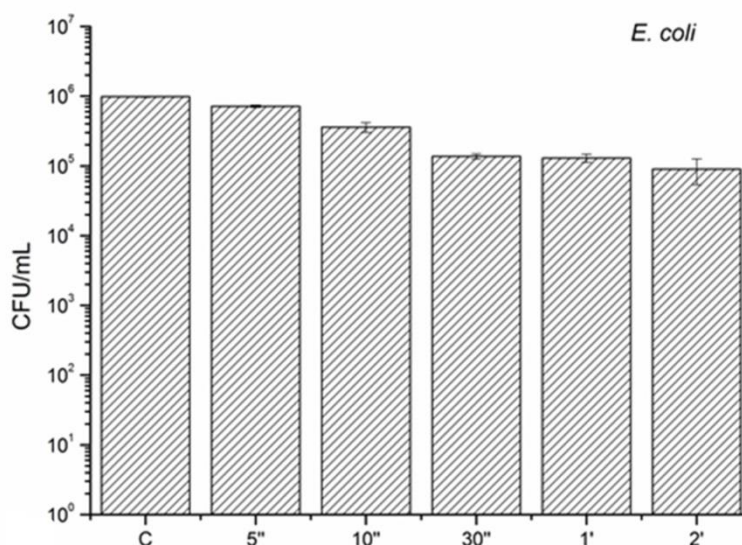


Figura 29 – Média do Número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/ mL) nos diversos grupos de teste de sensibilidade à TFD *in vitro*, sendo os grupos: C (controle) 5'' (cinco segundos de TFD), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *E. coli* proveniente de lesões podais de *S. magellanicus*:

Tabela 12 – Valores P resultantes de comparações múltiplas através de método de Tukey entre os grupos C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5'' (cinco segundos), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *E. coli* proveniente de lesões podais em *S. magellanicus*, em teste de sensibilidade à Terapia Fotodinâmica *in vitro*:

	1'	10''	2'	30''	5''	CTR	L	MB
1'		<.0001	0.0516	0.9999	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
10''	<.0001		<.0001	<.0001	0.0017	<.0001	<.0001	<.0001
2'	0.0516	<.0001		0.0250	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
30''	0.9999	<.0001	0.0250		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
5''	<.0001	0.0017	<.0001	<.0001		0.3220	0.4865	0.5823
CTR	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.3220		10.000	0.9996
L	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.4865	10.000		10.000
MB	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.5823	0.9996	10.000	

Pseudomonas aeruginosa: Não houve diferenças significativas no número de unidades formadoras de colônia por mililitro entre os grupos controle total (C), somente luz (L), somente azul de metileno (AM) e cinco segundos de terapia fotodinâmica (5''). Entre o grupo cinco segundos (5'') e dez segundos (10'') de TFD houve redução significativa do número de colônias (diminuição de aproximadamente 30%, $P=0,0006$). Entre os grupos dez (10'') e trinta (30'') segundos de TFD houve diminuição de aproximadamente 66% ($P=0,0001$). Entre os grupos trinta segundos (30'') e um minuto (1') houve 100% de redução de UFC/ mL ($P=0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos um (1') e dois (2') minutos ($P=10,000$). Houve redução de 100% do número de UFC/ mL entre os grupos C, L, AM e 5'' de TFD e os grupos 1' e 2' de TFD ($P=0,0001$).

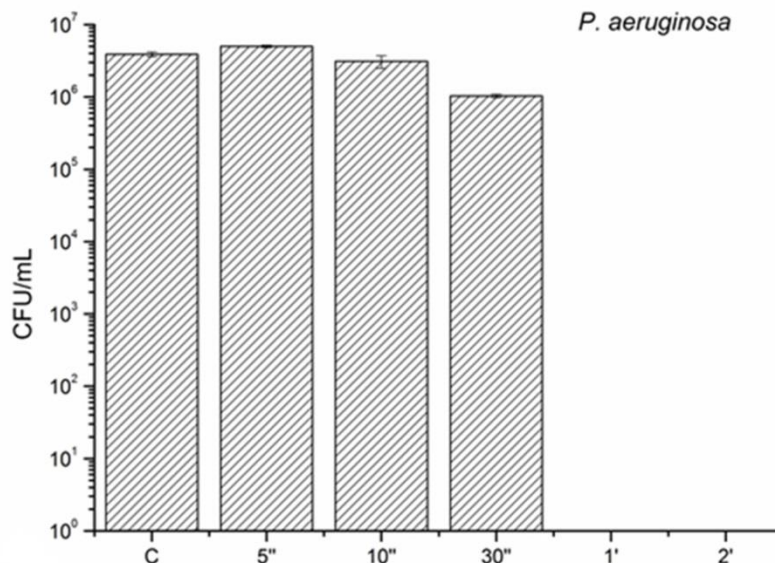


Figura 30 – Média do Número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/ mL) nos diversos grupos de teste de sensibilidade à TFD *in vitro*, sendo os grupos: C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5'' (cinco segundos), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *P. aeruginosa* proveniente de lesões podais de *S. magellanicus*:

Tabela13 – Valores P resultantes de comparações múltiplas através de método de Tukey entre os grupos C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5'' (cinco segundos), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *P.aeruginosa* proveniente de lesões podais em *S. magellanicus*, em teste de sensibilidade à Terapia Fotodinâmica *in vitro*:

	1'	10''	2'	30''	5''	CTR	L	MB
1'		<.0001	10.000	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
10''	<.0001		<.0001	<.0001	0.0006	0.1753	0.0027	0.0045
2'	10.000	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
30''	<.0001	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
5''	<.0001	0.0006	<.0001	<.0001		0.1104	0.9895	0.9528
CTR	<.0001	0.1753	<.0001	<.0001	0.1104		0.3951	0.5404
L	<.0001	0.0027	<.0001	<.0001	0.9895	0.3951		10.000
MB	<.0001	0.0045	<.0001	<.0001	0.9528	0.5404	10.000	

***Proteus mirabilis*:** Não houve diferenças significativas no número de unidades formadoras de colônia por mililitro entre os grupos controle total (C), somente luz (L), somente azul de metileno (AM) e cinco segundos de terapia fotodinâmica (5''). Entre o grupo cinco segundos (5'') e dez segundos (10'') de TFD houve redução significativa do número de colônias (diminuição de aproximadamente 63% , P=0,0001). Entre os grupos dez (10'') e trinta (30'')

segundos de TFD houve diminuição de aproximadamente 60% ($P=0,0040$). Entre os grupos trinta segundos (30'') e um minuto (1') não houve redução significativa ($P=0,8005$). Entre os grupos um (1') e dois (2') minutos houve 100% de redução do número de UFC/ mL ($P=0,0087$). Houve redução de 100% do número de UFC/ mL entre os grupos C, L, AM e 5'' de TFD e o grupo 2' de TFD ($P=0,0001$).

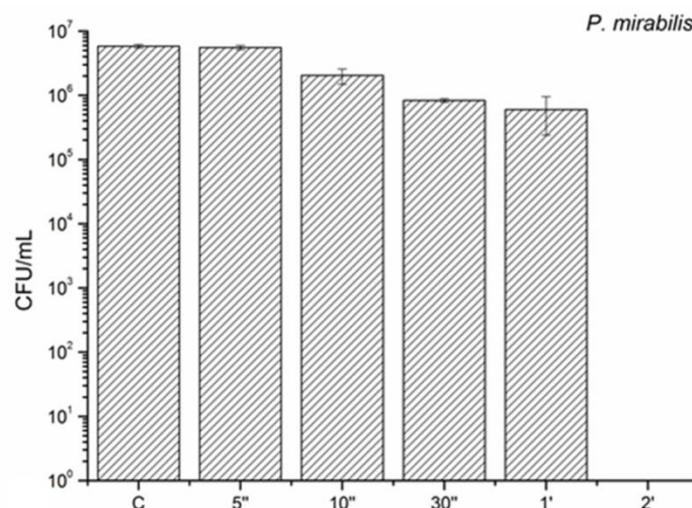


Figura 31 – Média do Número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/ mL) nos diversos grupos de teste de sensibilidade à TFD *in vitro*, sendo os grupos: C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5'' (cinco segundos), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *P. mirabilis* proveniente de lesões podais de *S. magellanicus*:

Tabela 14 – Valores P resultantes de comparações múltiplas através de método de Tukey entre os grupos C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5'' (cinco segundos), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *P. mirabilis* proveniente de lesões podais em *S. magellanicus*, em teste de sensibilidade à Terapia Fotodinâmica *in vitro*:

	1'	10''	2'	30''	5''	CTR	L	MB
1'		0.0002	0.0087	0.8005	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
10''	0.0002		<.0001	0.0040	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
2'	0.0087	<.0001		0.0005	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
30''	0.8005	0.0040	0.0005		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
5''	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		0.9999	0.9744	10.000
CTR	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9999		0.9988	10.000
L	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9744	0.9988		0.9972
MB	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	10.000	10.000	0.9972	

Staphylococcus aureus: Não houve diferenças significativas no número de unidades formadoras de colônia por mililitro entre os grupos controle total (C), somente luz (L), somente azul de metileno (AM). Entre esses últimos e o grupos cinco segundos (5'') de TFD houve redução de aproximadamente 56% ($P=0,0001$). Entre o grupo cinco (5'') e dez (10'') segundos de TFD houve redução aproximada de 54% ($P=0,0002$). Entre os grupos dez (10'') e trinta (30'') segundos de TFD houve redução de aproximadamente 60% ($P=0,0001$). Não houve diferença significativa entre trinta segundos (30'') e um minuto (1') de TFD ($P=0,1529$). Houve 100% de redução no número de UFC/ mL entre os grupos um (1') e dois (2') minutos de TFD ($P=0,001$). Houve 100% de redução entre os três grupos controle (C, L e AM) e o grupo dois minutos (2') de TFD ($P=0,0001$).

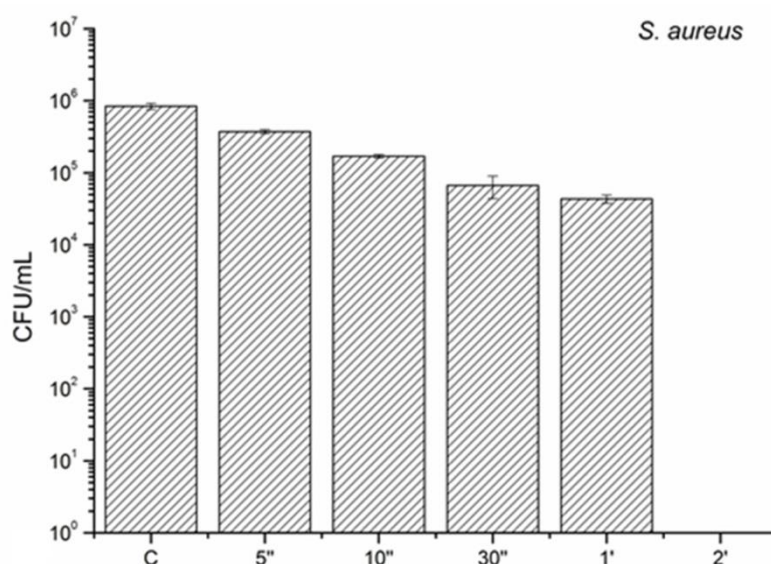


Figura 32 – Média do Número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/ mL) nos diversos grupos de teste de sensibilidade à TFD *in vitro*, sendo os grupos: C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5'' (cinco segundos), 10'' (dez segundos de TFD), 30'' (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *S. aureus* proveniente de lesões podais de *S. magellanicus*:

Tabela 15 – Valores P resultantes de comparações múltiplas através de método de Tukey entre os grupos C (controle total), L (somente luz), AM (somente azul de metileno), 5" (cinco segundos), 10" (dez segundos de TFD), 30" (trinta segundos de TFD), 1' (um minuto de TFD) e 2' (dois minutos de TFD) da bactéria *S. aureus* proveniente de lesões podais em *S. magellanicus*, em teste de sensibilidade à Terapia Fotodinâmica *in vitro*:

	1'	10"	2'	30"	5"	CTR	L	MB
1'		<.0001	<.0001	0.1529	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
10"	<.0001		<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001
2'	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
30"	0.1529	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
5"	<.0001	0.0002	<.0001	<.0001		<.0001	<.0001	<.0001
CTR	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		0.9999	10.000
L	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.9999		10.000
MB	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	10.000	10.000	

EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS:

Hemograma: Todos os parâmetros de hemograma analisados mantiveram-se dentro dos valores de referência conhecidos para a espécie (TEARE, 2002), pequenas alterações de diminuição de hemoglobina e aumento de heterófilos foram observadas no grupo TFD sem alteração no quadro clínico dos animais:

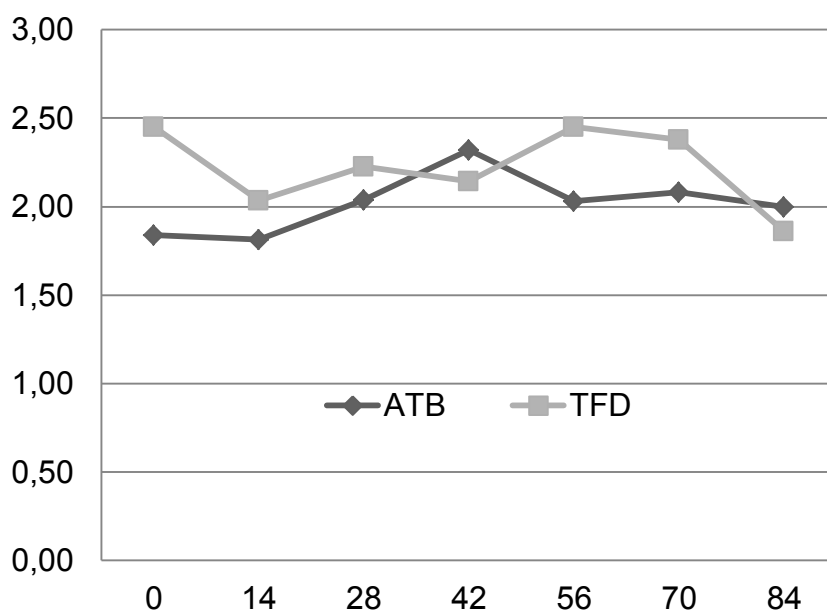


Figura 33 - Mediana do número total de **eritrócitos** em milhões por microlitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **1,01 a 2,41 milhões/ μL**:

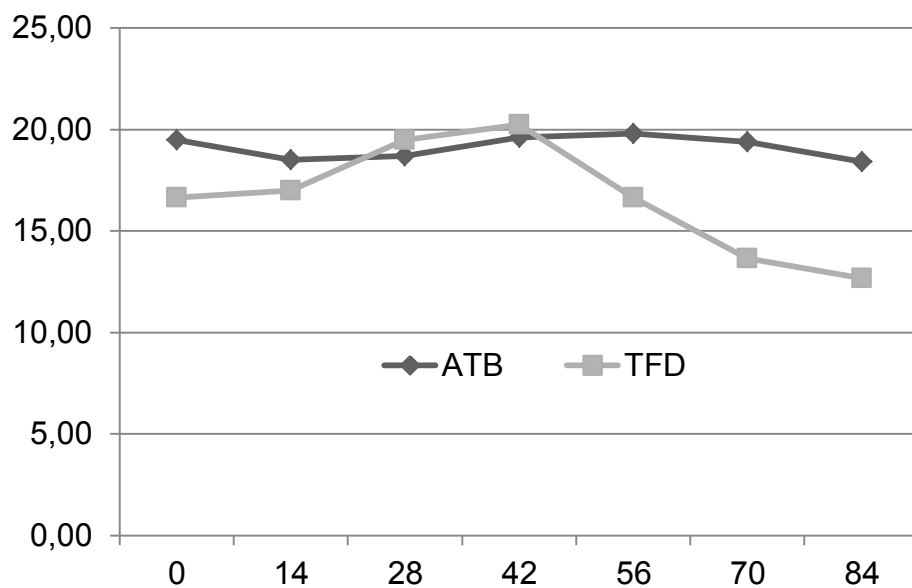


Figura 34 - Mediana do valor de hemoglobina em miligramas por decilitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 13,1 a 17,9 mg/ dL:

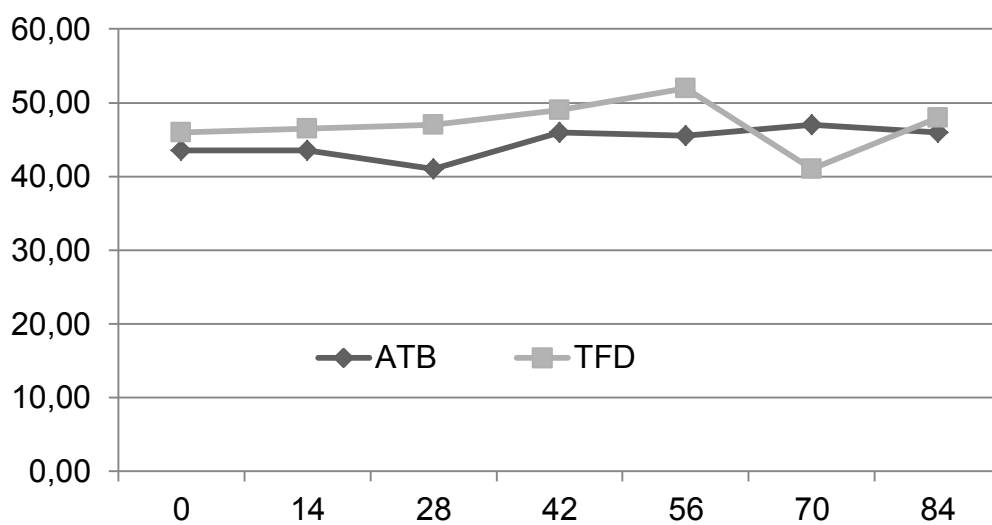


Figura 35 - Mediana do valor de hematócrito em porcentagem de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 41% a 54,8%:

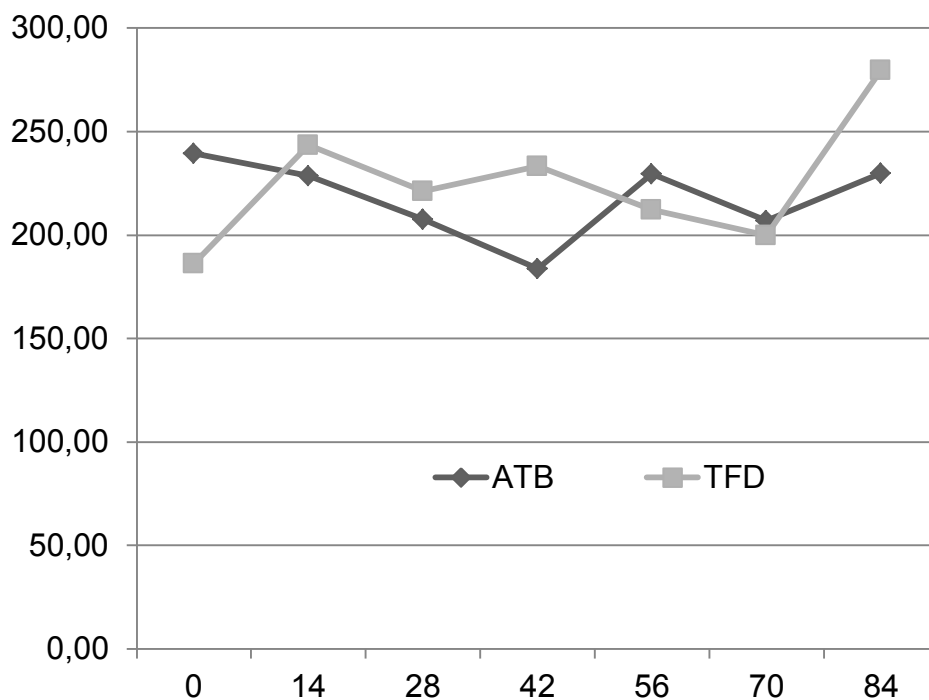


Figura 36 - Mediana do valor de volume corpuscular médio (VCM) em femtolitros de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 158,3 a 543,1 femtolitros:

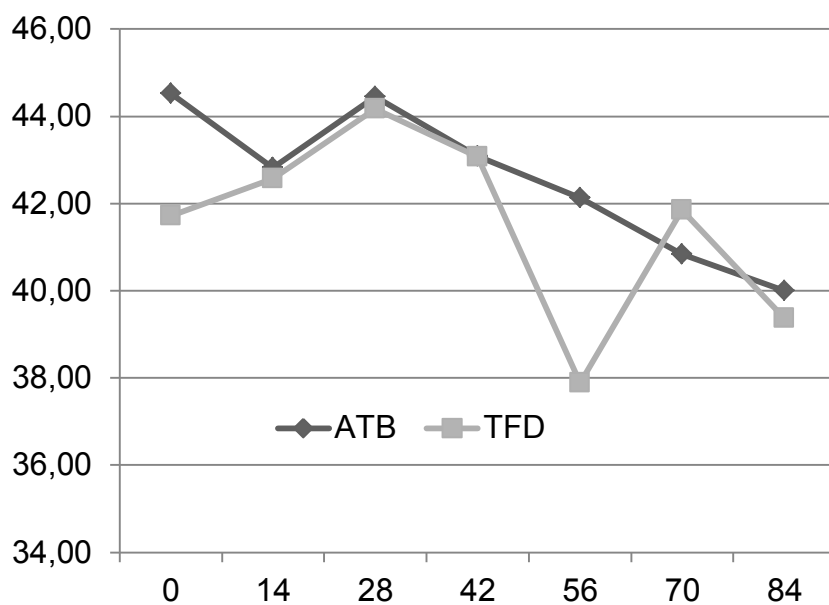


Figura 37 - Mediana do valor de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em gramas por decilitros de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência 28,1 a 39,3 g/ dL:

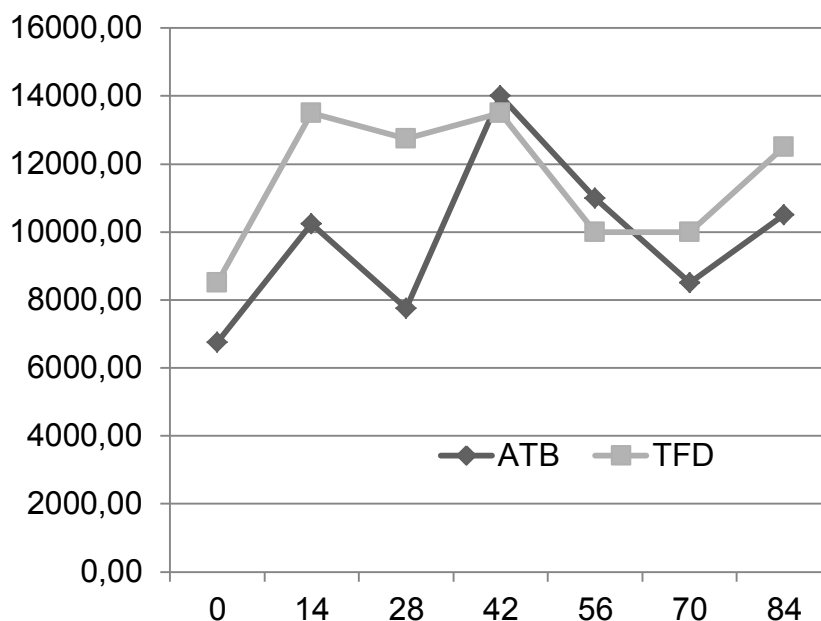


Figura 38 - Mediana do valor de **leucócitos** totais por microlitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **6810 a 17950 / μL** :

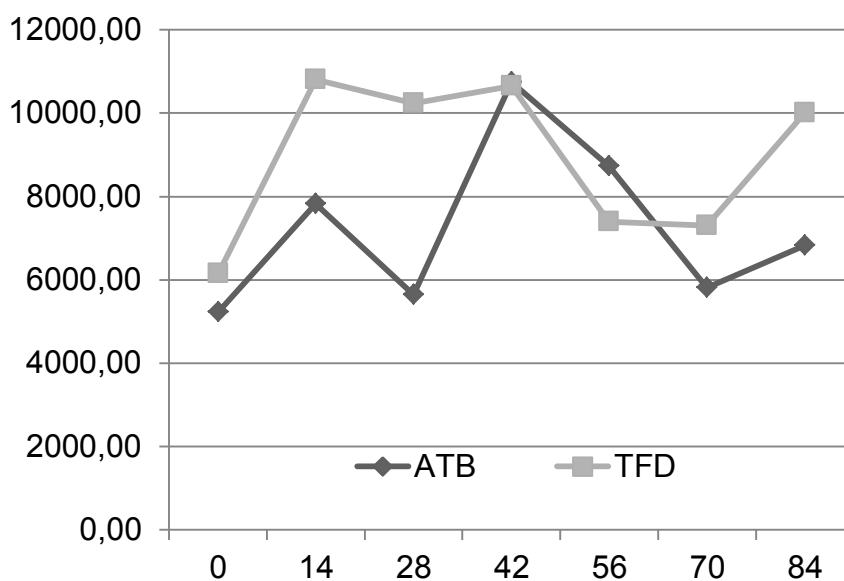


Figura 39 - Mediana do número de **heterofilos** por microlitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **2542 a 9472/ μL**

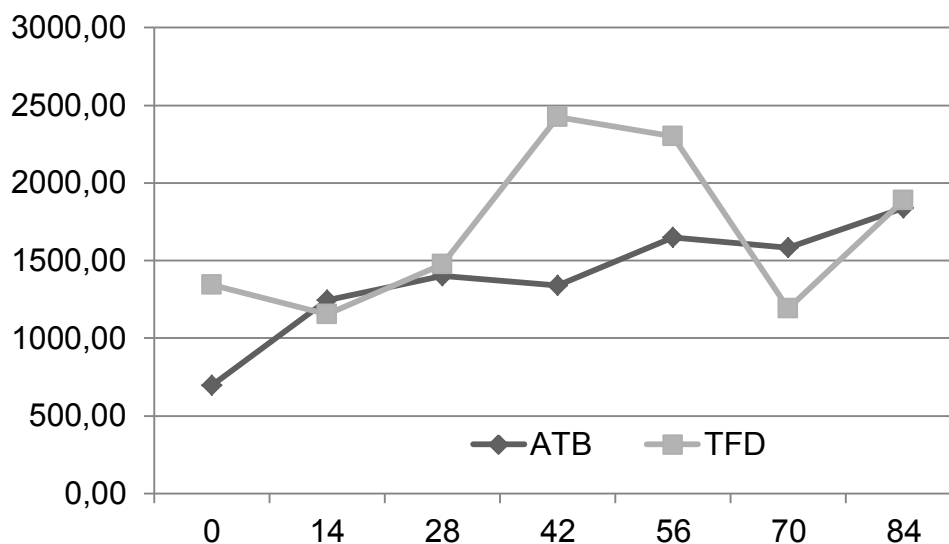


Figura 40 - Mediana do número de **linfócitos** por microlitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **2267 a 9383/ μ L**:

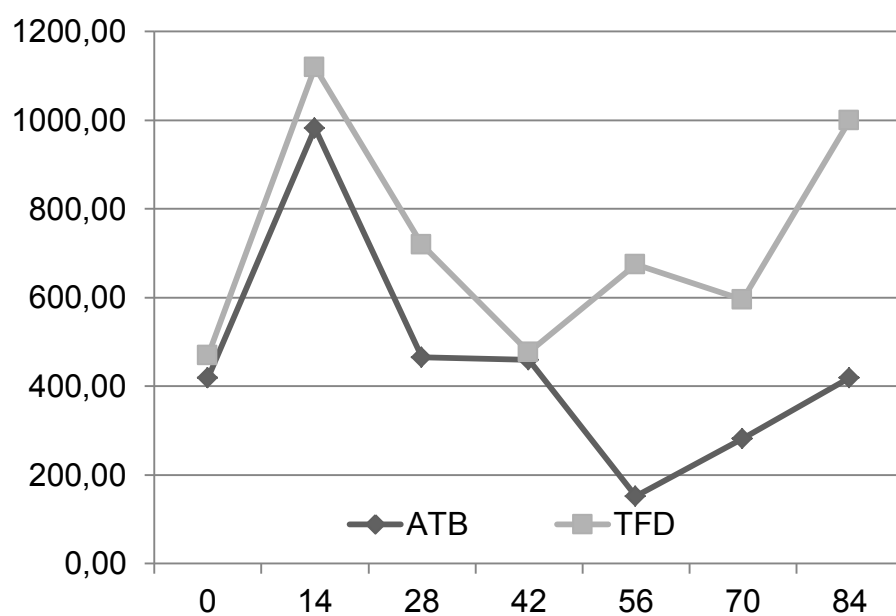


Figura 41 - Mediana do número de **monócitos** por microlitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **0 a 1369/ μ L**:

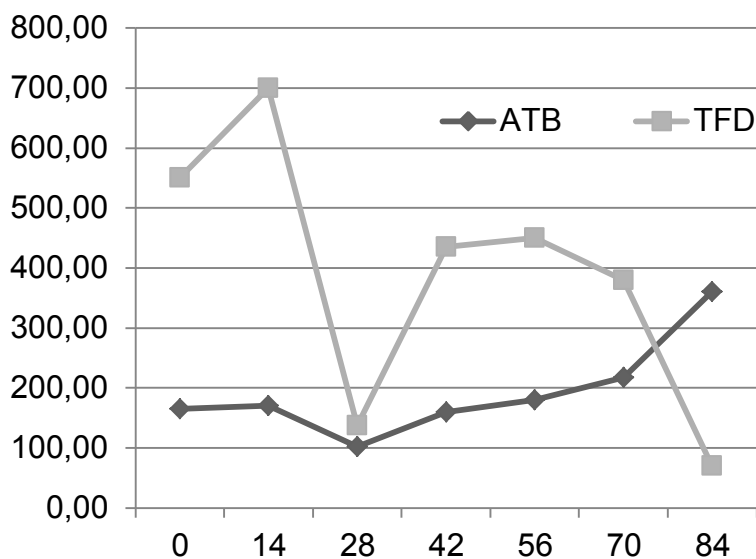


Figura 42 - Mediana do número de **basófilos** por microlitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **98 a 1369/ μ L**:

Bioquímica:

Todos os parâmetros de bioquímica analisados mantiveram-se dentro dos valores de referência conhecidos para a espécie (TEARE, 2002):

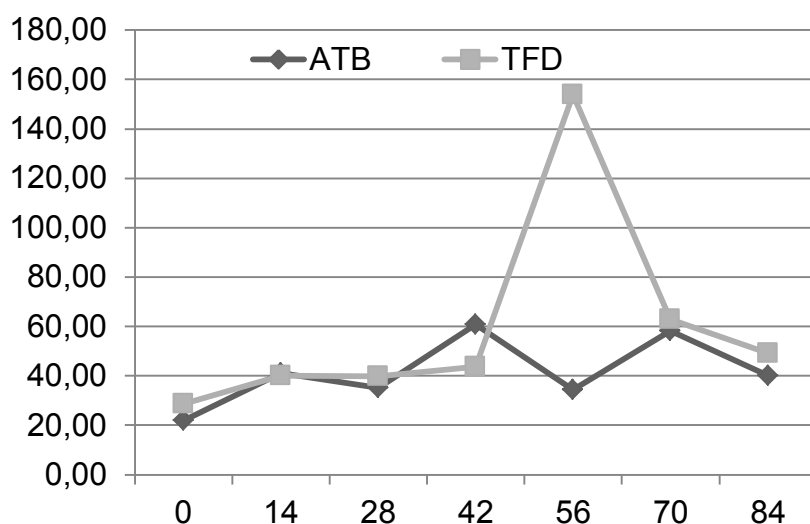


Figura 43 - Mediana do valor de **aspartato aminotransferase (AST)** em unidades internacionais por litro (AST) de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **27 a 375 UI/ L**:

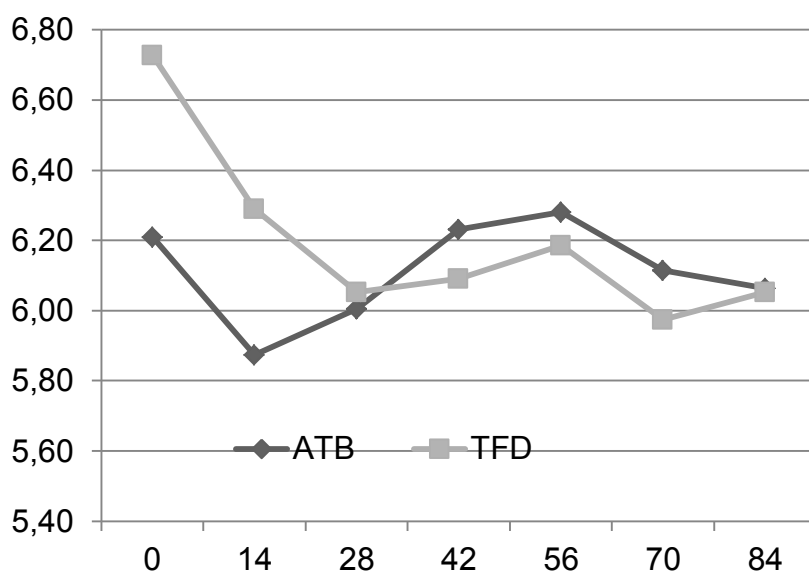


Figura 44 - Mediana do valor de **ácido úrico** em miligramas por decilitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **0,80 a 13,21 mg/ dL**:

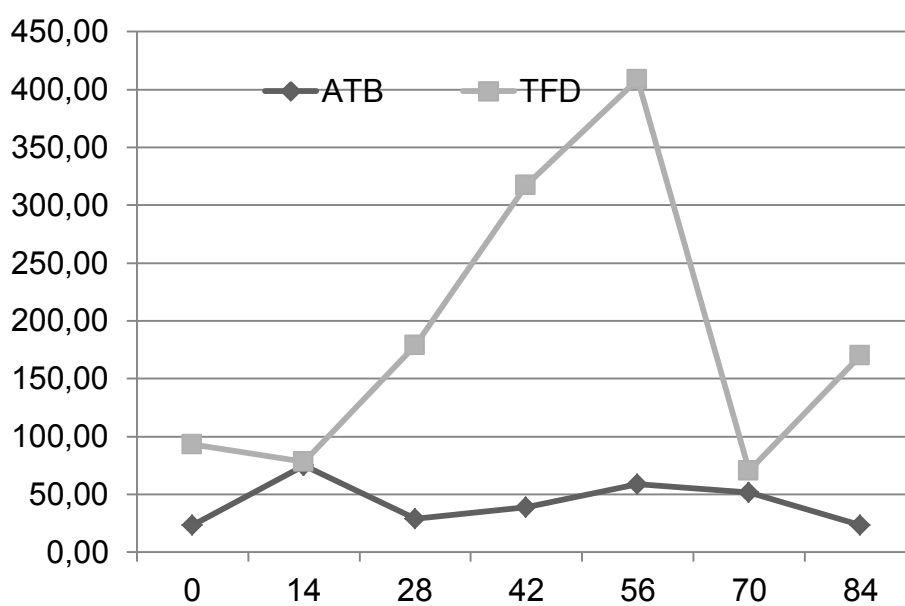


Figura 45 - Mediana do valor de **creatinquinase (CK)** em unidades internacionais por litro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **47 a 447 UI/ L**:

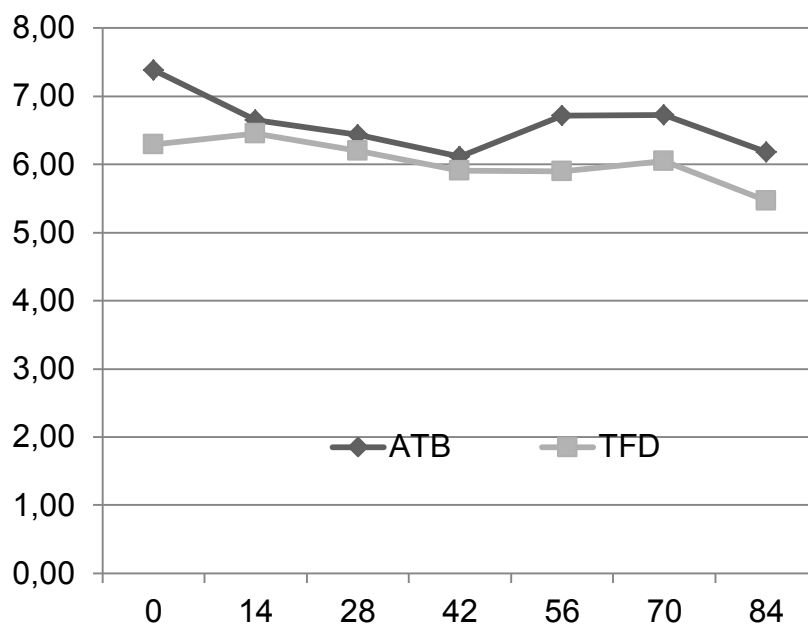


Figura 46 - Mediana do valor de **proteínas totais** em gramas por decilitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **5,0 a 6,6 g/ dL**:

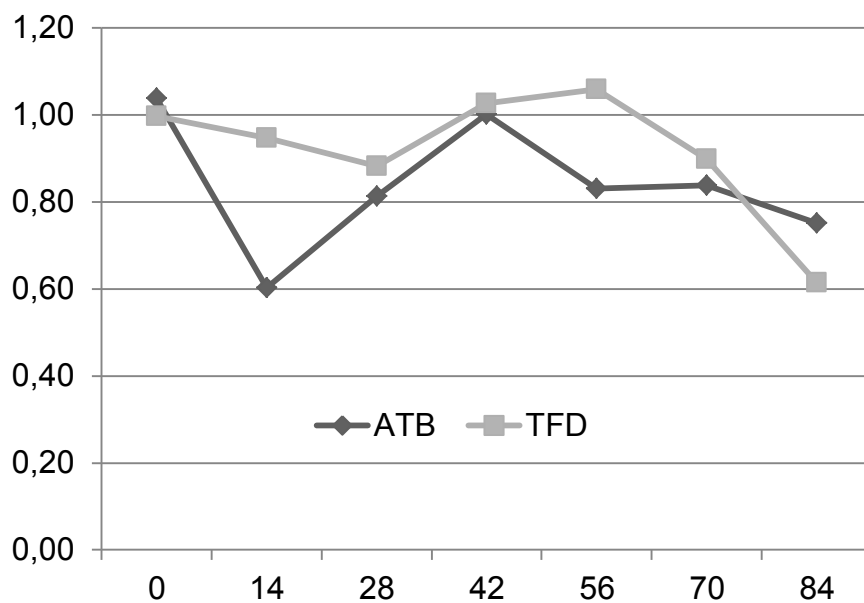


Figura 47 - Mediana do valor de **albumina** em gramas por decilitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **1,5 a 2,1 g/ dL**:

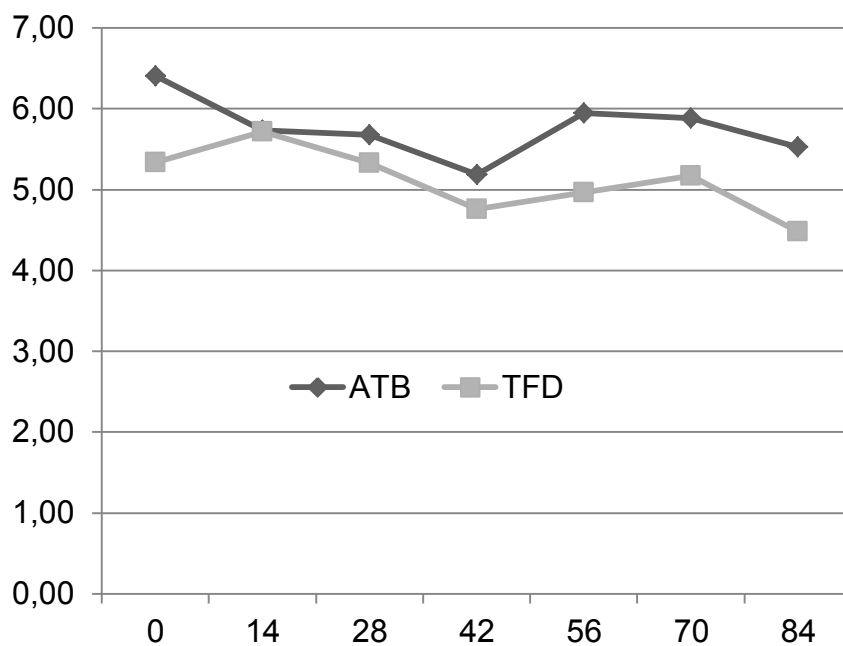


Figura 48 - Mediana do valor de **globulina** em gramas por decilitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **3,5 a 4,9 g/ dL**:

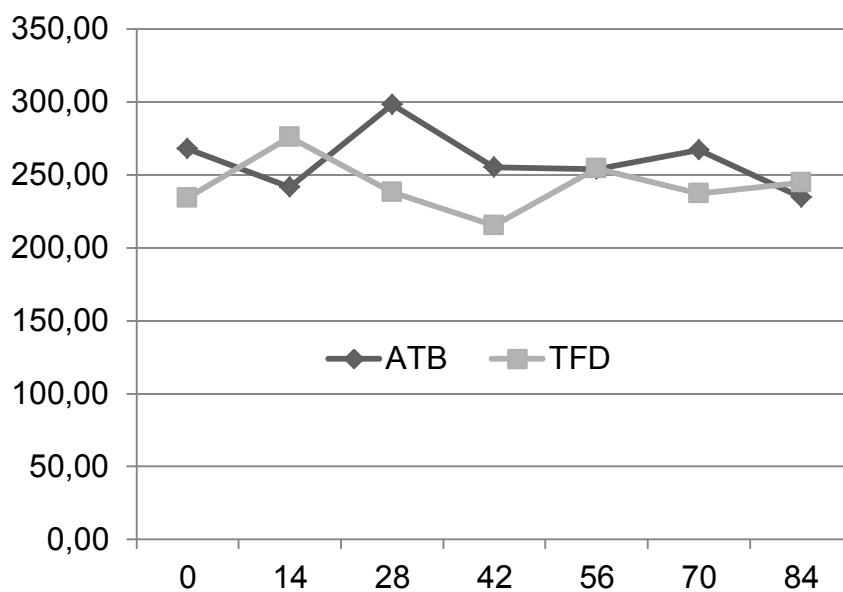


Figura 49 - Mediana do valor de **glicose** em miligramas por decilitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **189 a 243 mg/ dL**

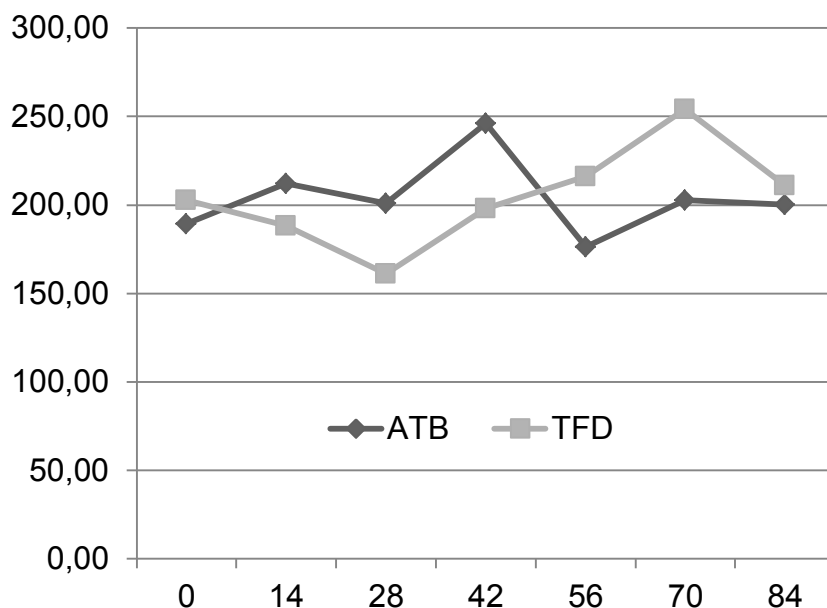


Figura 50 - Mediana do valor de **colesterol** em miligramas por decilitro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **232,01 a 309,35 mg/ dL**

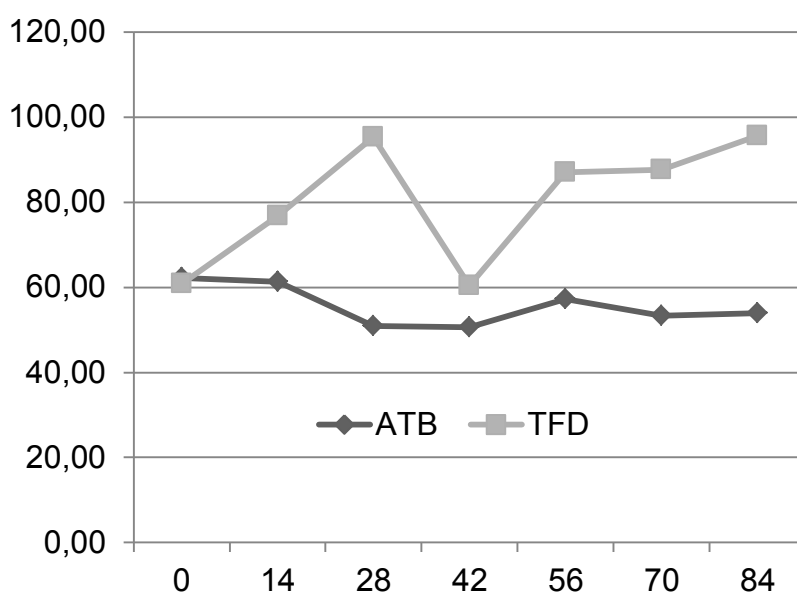


Figura 51 - Mediana do valor de **fosfatase alcalina** em unidades internacionais por litro de pinguins de Magalhães (*S. magellanicus*) nos diversos momentos de observação nos grupos: antibiótico (ATB) e terapia fotodinâmica (TFD). Valor de referência **0 a 387 UI/ L:**

DISCUSSÃO

6 - DISCUSSÃO

No presente estudo, o grande número de animais afetados por “bumblefoot” no plantel observado (48%) confirma que esta é uma das mais frequentes e importantes enfermidades a afetar aves mantidas em cativeiro (ERLACHER-REID et al., 2011). Os locais afetados, que variaram entre coxim plantar e tarsometatarso também corroboram com a afirmação que as lesões se desenvolvem a partir do ponto de apoio em determinadas porções do membro (REIDARSON et al., 1999).

O fato de dentre todas as lesões tratadas apenas 36,36% terem alcançado a cura no período de observação, ratifica a afirmação de ser o “bumblefoot” uma doença crônica e que necessita de intervenção terapêutica de longo curso (REMPLE, 2006). No presente trabalho, observou-se que o tamanho das lesões tende a diminuir e voltar a aumentar ao longo do tempo. A recorrente contaminação e a permanência dos animais em pé, apoiados sobre o ferimento podem explicar a ocorrência das recidivas e a dificuldade de atingir sucesso com o tratamento. A literatura afirma que o manejo dos animais exerce papel importante no desenvolvimento do bumblefoot, sendo necessário diminuir o tempo de apoio em pé e aumentar o tempo de natação (COOPER, 2002); o que não foi adotado no presente estudo, visando não interferir na rotina dos animais o que poderia alterar as variáveis envolvidas nos tratamentos estudados.

Nesta observação, o grupo tratado com TFD apresentou um desempenho melhor que o tratado com antibióticos durante o primeiro mês de tratamento. Remple (2006) afirmou que “bumblefoot” responde melhor à antibioticoterapia de longo curso devido à natureza isquêmica da lesão. O fato de a TFD ser aplicada diretamente na área infectada destruindo seletivamente uma grande quantidade de microrganismos, sem causar destruição tecidual (HAMBLIN e HASAN, 2004), pode explicar seu melhor desempenho nesta primeira fase do tratamento.

Uma vez que evitar a contaminação dos ferimentos é difícil, o regime de repetição da TFD a intervalos curtos (neste caso três vezes por semana) é importante para prevenir que as bactérias contaminantes passem a causar infecção. O amplo espectro e a ação localizada da TFD são vantagens em

relação ao uso de antibióticos que dependem da biodisponibilidade no tecido afetado bem como da efetividade contra as bactérias contaminantes do momento.

Corroborando as afirmações acima, os dados do presente estudo relacionados com o tempo de tratamento até a cura e a comparação da taxa de cura entre os grupos, demonstram o desempenho superior da TFD, tanto na quantidade de lesões curadas (63,62%, contra 9,09% no grupo antibiótico), quanto no tempo até a cicatrização, no qual também observou-se melhor desempenho da TFD nos momentos mais precoces de tratamento.

Como Cooper (2002) afirmou, foram frequentes os indicativos de contaminação fecal, sendo *Escherichia coli* o microrganismo mais encontrado, além de outros bacilos Gram negativos, como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, entre outros. Microrganismos Gram positivos como *Staphylococcus spp.*, *S. aureus* e *Enterococcus spp.* também foram frequentemente encontrados, o que corrobora o estudo de Osório(2013)

Com relação aos dados de prevalência das bactérias ao longo do tempo, estes não foram uniformes, podendo o microrganismo desaparecer, ser substituído ou voltar a aparecer ao longo do tratamento. Este achado corrobora a afirmação de Reidarson et al (1999) de que a microbiota presente na pele viola a derme secundariamente à lesão inicial causada por uma necrose isquêmica. Desta forma, a avaliação de resistência bacteriana por meio de um antibiograma para escolha de um antibiótico apropriado, como recomendado por Cooper (2002), precisa ser repetido em diferentes momentos para garantir a eficácia da antibioticoterapia.

Assim como no estudo de Osório (2013), as cepas isoladas apresentaram graus variados de susceptibilidade frente a testes antimicrobianos. Chama a atenção que drogas como bacitracina e neomicina que são comumente encontrados em formulação para uso tópico apresentaram mais de 90% de resistência. Das 11 drogas testadas, apenas 4 apresentaram vulnerabilidade menor que 30% frente aos microrganismos testados, o que torna temerária a prescrição de qualquer tratamento empírico, ratificando a afirmação de Dai et al. (2009) de que a prescrição inadequada de antibióticos concorre para exacerbar o problema pela repetida seleção de cepas multirresistentes.

Resultado semelhante quanto à confiabilidade dos antibióticos testados foi observado nas amostras do grupo testado logo após a TFD.

No teste de sensibilidade *in vitro* à TFD, não houve diferenças significativas no número de unidade formadora de colônia por mililitro entre os grupos controle C, L e AM (KASHEF et al., 2011). O teste *in vitro* mostrou efetiva redução bacteriana para *P. aeruginosa* (fig. 30), *P. mirabilis* (fig. 31) and *S. aureus* (fig. 32) dependendo do tempo de irradiação. De fato, para 5", 10" e 30" a TFD não foi efetiva em todos os casos. No entanto, para *P. aeruginosa* podemos observar morte bacteriana total após 1 minuto de irradiação, enquanto para *P. mirabilis* e *S. aureus* a completa redução bacteriana foi obtida após 2 minutos de irradiação. É interessante observar que, dentro dos parâmetros desse estudo, a TFD não foi capaz de inativar completamente *E. coli* (fig. 29). Mesmo após 2 minutos de irradiação ainda houve crescimento de 1 log.

Estes achados corroboram outros estudos da literatura que demonstram que a TFD é capaz de destruir microorganismos resistentes mesmo após uso prolongado de antibióticos (BIEL et al., 2011; MIYABE et al., 2011). No entanto, é bem estabelecido que a susceptibilidade de microorganismos à TFD é dependente de diversos fatores, como concentração do fotossensibilizador, tempo de pré irradiação, tipo de microorganismo, tempo de irradiação, etc. Provavelmente é necessário um tempo maior de irradiação para completa erradicação de *E. coli*.

As análises hematológicas e bioquímicas, que foram feitas ao longo de todo período de observação foram utilizadas primordialmente como acompanhamento da saúde individual dos pinguins utilizados no experimento. Caso houvesse alterações bioquímicas ou hematológicas que inferissem doenças sistêmicas, o animal seria excluído do grupo experimental, uma vez que deixaria de ser considerado como infecção localizada e entraria no critério de exclusão deste estudo. Os resultados hematológicos e bioquímicos dos animais observados mantiveram-se dentro dos parâmetros de normalidade para espécie (TEARE, 2002) durante todo o experimento.

As dificuldades no tratamento do "bumblefoot" relatadas em literatura são explicadas por muitos fatores. O manejo desses animais em cativeiro visando diminuir o tempo em pé e manter um padrão de natação similar ao observado

em vida livre é difícil, uma vez que o espaço restrito não é estimulante para as aves, medidas de enriquecimento ambiental e condicionamento são recomendados. Pinguins não empoleiram, por isso estão constantemente em contato com fezes e urina, mesmo que se mantenha higiene constante é muito difícil evitar contaminação recorrente dos ferimentos. A biodisponibilidade das drogas utilizadas pode não ser confiável devido a natureza isquêmica da lesão e por fim, a recorrente contaminação por novos agentes infecciosos impõe a necessidade de monitoramento constante da eficácia do tratamento através de antibiogramas.

Dessa forma, a Terapia Fotodinâmica atende as necessidades do tratamento desta enfermidade, pois, como apontado na literatura consultada, possui amplo espectro de ação e não desenvolve resistência, além da despreocupação quanto à biodisponibilidade já que é aplicada localmente. Os resultados precoces da TFD também satisfazem a necessidade de centros de reabilitação, que visam à rápida recuperação para retorno à natureza, sendo recomendado que se adote medidas de manejo para estimular a natação e evitar recidivas. O fato de não induzir efeitos colaterais sistêmicos perniciosos resulta em uma técnica segura, além de ser indolor e bem tolerada pelos pinguins, sendo que eventual estresse devido à contenção física pode ser minimizado através do condicionamento dos animais no caso de cativeiro permanente em zoológicos e aquários.

CONCLUSÃO

7 - CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo atestam a eficácia da Terapia Fotodinâmica para o tratamento de pododermatite (*bumblefoot*) estadiada em classe III para Pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Os resultados de diminuição da área de lesão em momentos precoces do tratamento ensejam novos estudos da associação desta técnica com medidas de manejo que diminuam o tempo em pé e possam otimizar a cura. O estudo de um curativo que possa ser eficaz em evitar novas contaminações também é importante na prevenção de recidivas o que possibilitaria maior espaçamento entre as aplicações da TFD. O fato de a TFD ter amplo espectro de ação contra microrganismos, não induzir resistência e ser um procedimento de fácil aplicação o habilita com vantagens como terapia alternativa ao tradicional tratamento com antimicrobianos para “bumblefoot”.

BIBLIOGRAFIA

8 - BIBLIOGRAFIA

AZA AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION. **PENGUIN HUSBANDRY MANUAL Third Edition**. Disponível em:

<http://marineanimalwelfare.com/images/Penguin_HB.pdf>.

BAGNATO, V. S. **Pesquisa FAPESP Online**. . São Paulo: FAPESP Pesquisa Online. Disponível em:

<<http://www.revistapesquisa2.fapesp.br/?art=4221&bd=2&pg=1&lg=>>, 2007.

BIEL, M. a et al. Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms. **International forum of allergy & rhinology**, v. 1, n. 5, p. 329–34, do.

BISHT, R. et al. ANTIBIOTIC RESISTANCE – A GLOBAL ISSUE OF CONCERN. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 2, n. 2, p. 34–39, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M100-S23 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. . Wayne, PA, USA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

COOPER, J. E. Surgery of the foot in falcons: a historic operation. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 62, n. 6, p. 445–8, 1980.

COOPER, J. E. **Birds of Prey**. 3th. ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 2002. p. 121–131

DAI, T.; HUANG, Y.-Y. e HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 6, n. 3-4, p. 170–88, 2009.

DEMIDOVA, T. N. e HAMBLIN, M. R. Photodynamic inactivation of Bacillus spores, mediated by phenothiazinium dyes. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6918–25, 2005.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. Review. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.

ERLACHER-REID, C. et al. Evaluation of potential variables contributing to the development and duration of plantar lesions in a population of aquarium-maintained African penguins (*Spheniscus demersus*). **Zoo biology**, v. 31, n. 3, p. 291–305, 2011.

FOWLER, G. S. e FOWLER, M. E. Order Sphenisciformes (Penguins). In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. (Eds.). **Biology, medicine and surgery of South American wild animals**. 1. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2001, 2001. p. 53–64.

GANDINI, P. et al. Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) affected by chronic petroleum pollution along coast of chubut, Argentina. **The Auk**, v. 11, n. 1, p. 20–27, 1994.

GARCÍA-BORBOROGLU, P. et al. Chronic oil pollution harms Magellanic penguins in the Southwest Atlantic. **Marine pollution bulletin**, v. 52, n. 2, p. 193–8, doi:10.1016/j.marpolbul.2005.11.004, 2006.

GOYACHE, J. *Corynebacterium spheniscorum* sp. nov., isolated from the cloacae of wild penguins. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 43–46, 2003.

HAMBLIN, M. R. e HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 3, n. 5, p. 436–50, 2004.

HAWKEY, C. et al. Haematological findings in captive Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) with bumblefoot. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 14, n. 2, p. 251–6, 1985.

HENDERSON, B. W. e DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? **Photochemistry and photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145–57, 1992.

HOCKING, P. M. et al. Standard European footpad dermatitis scoring system for use in turkey processing plants. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, n. 03, p. 339, 2008.

HUEZA, I. M. Avian Pharmacology : Employing Anti-Inflammatory Drugs in Wild Birds. **ARS Veterinaria**, v. 24, n. 1, p. 15–24, 2008.

IUCN. **Spheniscus magellanicus (Magellanic Penguin)**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/106003863/0>>. Acesso em: 11 ago. 2012.

JETT, B. D. . et al. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Biotechniques**, v. 23, n. 4, p. 648–650, 1997.

KASHEF, N. et al. Photodynamic inactivation of drug-resistant bacteria isolated from diabetic foot ulcers. **Iranian journal of microbiology**, v. 3, n. 1, p. 36–41, 2011.

KESSEL, D. Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 3–7, 2004.

KONOPKA, K. e GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of dental research**, v. 86, n. 8, p. 694–707, 2007.

MARMUR, E. S.; SCHMULTS, C. D. e GOLDBERG, D. J. A review of laser and photodynamic therapy for the treatment on nonmelanoma skin cancer. **Dermatologic Surgery**, v. 30, n. 2, p. 264–271, 2004.

MARQUES, M. V. R. et al. A bumblefoot outbreak and fatal septicemia in captive aquatic birds in Brazil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1905–1907, 2009.

MIYABE, M. et al. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus* spp. **Brazilian oral research**, v. 25, n. 3, p. 230–4, 2011.

MOAN, J. e PENG, Q. An outline of the history of PDT. In: PATRICE, T. (Ed.). **Photodynamic therapy**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003. p. 1–18.

NÚÑEZ, S. C. et al. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers in medical science**, v. 28, n. 2, p. 633–41, 2013.

OAKS, J. L. Immune and Inflammatory Responses in Falcon Staphylococcal Pododermatitis. In: REDIG, P. T. et al. (Eds.). **Raptor Biomedicine**. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1993. p. 251.

OSÓRIO, L. G. et al. Study of bacteria isolated from the foot pad of *Spheniscus magellanicus* with and without bumblefoot. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 1, p. 47–54, 2013.

PFALLER, M. A. et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of clinical microbiology**, v. 26, n. 8, p. 1437–41, 1988.

REIDARSON, T. H.; MCBAIN, J. e BURCH, L. A Novel Approach to the Treatment of Bumblefoot in Penguins. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 13, n. 2, p. 124–127, 1999.

REISFELD, L. e BARBIRATO, M. Reducing bumblefoot lesions in a group of captive Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) with the use of environmental enrichment. **Pesquisa Veterinária ...**, v. 33, n. 6, p. 791–795, 2013.

REMPLE, J. D. A Multifaceted Approach to the Treatment of Bumblefoot in Raptors. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 15, n. 1, p. 49–55, 2006.

RODRIGUES, S. C. et al. Surviving Probability Indicators of Landing Juvenile Magellanic Penguins Arriving Along the Southern Brazilian Coast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 419–424, 2010.

ROOTS, C. **Flightless Birds**. 1st. ed. London: Greenwood, 2006. p. 235

RUOPPOLO, V. et al. Survival and movements of Magellanic penguins rehabilitated from oil fouling along the coast of South America, 2000-2010. **Marine pollution bulletin**, v. 64, n. 7, p. 1309–17, 2012.

SAS. **SAS/STAT 9.3 User's Guide. User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC**. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SCHMIDT, R. E. e LIGHTFOOT, T. Integument. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. (Eds.). **Clinical Avian Medicine**. 1st. ed. Palm Beach: Spix Publishing, 2006. p. 441–456.

SELLERA, F. P. et al. Photodynamic therapy for pododermatitis in penguins. **Zoo Biology**, v. 4, n. October 2013, p. n/a–n/a, 2014.

SHARMAN, W.; ALLEN, C. e LIER JE, VAN. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug discovery today**, v. 4, n. 11, p. 507–517, 1999.

SILVA FILLHO, R. P. e RUOPPOLO, V. Sphenisciformes (Pinguim). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds.). **Tratado de Animais Selvagens**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 309–23.

SILVA, J. C. E. et al. Evaluation of the use of low level laser and photosensitizer drugs in healing. **Lasers in surgery and medicine**, v. 34, n. 5, p. 451–7, 2004.

SORIANO-GARCÍA, F. [Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of interpretive reading of the antibiogram]. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 28, n. 7, p. 461–6, 2013.

SPERANDIO, F. F. et al. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing. **Photomedicine and laser surgery**, v. 28, n. 5, p. 581–7, 2010.

SPIKES, J. D. Photodynamic Action: From Paramecium to Photochemotherapy*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, n. s1, p. 142S–147S, 1997.

TEARE, J. A. Physiological data reference values. In: TEARE, J. A. (Ed.). **ISIS - International Species Information System (CD-ROM)**. 2002. ed. Apple Valle: [s.n.], 2002. .

VINCK, E. et al. Is Photodynamic Therapy an Appropriate Treatment of Feline Superficial Squamous Cell Carcinomas? Two Case Studies in Small Animal Practice. (L. L. et al., Eds.)In: PROCEEDINGS OF SPIE. **Anais...** Bellingham: [s.n.], 2003.

XAVIER, M. O. et al. Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 480–484, 2007.

YOSHIKAWA, T. T. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 50, n. 7 Suppl, p. S226–9, 2002.

ZEITOUNI, N. C.; OSEROFF, A. R. e SHIEH, S. Photodynamic therapy for melanoma skin cancers. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 7-18, p. 1133–1136, 2003.

TRABALHO CIENTÍFICO