

Evidências do efeito da terapia fotodinâmica sobre infecções podais em vacas leiteiras no município de Fernandópolis, São Paulo, Brasil*

José Paulo Franco dos Santos Gomes¹⁺, Rogério Rodrigo Ramos², Danila Fernanda Rodrigues Frias³, Vanessa Belentani Marques⁴, Dora Inês Kozusny-Andreani⁵ e Adjaci Uchôa Fernandes⁶

ABSTRACT. Gomes J.P.F. dos S., Ramos R.R., Frias D.F.R., Marques V.B., Kozusny-Andreani D.I. & Fernandes A.U. [Evidences of photodynamic therapy effect on foot rot disorders in dairy cows in the Municipality of Fernandópolis, São Paulo, Brazil.] Evidências do efeito da terapia fotodinâmica sobre infecções podais em vacas leiteiras no município de Fernandópolis, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(3):257-264, 2016. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Camilo Castelo Branco, Campus São José dos Campos, Estrada Doutor Altino Bondesan, 500, Distrito de Eugênio de Melo, São José dos Campos, SP 12247-016, Brasil. E-mail: zepaulofranco@hotmail.com

Digital diseases represent a problem of great importance and high prevalence in dairy herds, causing numerous losses, mainly attributed to the premature disposal, decrease in milk production, weight loss, reduction of fertility and high treatment costs. This study was aimed to determine the action of photodynamic therapy effect in the treatment of digital diseases in dairy cattle *in vivo* and *in vitro*, also, to evaluate the effect of photodynamic action on isolated microorganisms. The methodology consisted of two experiments, the first one carried out a study of treatment efficacy of photodynamic therapy (PDT) using methylene blue as a photosensitizer agent *in vivo* by evaluating the Greenough score before and after treatment, and also another experiment *in vitro* under the effects of PDT in microorganisms isolated from lesions present in feeble animals. The results showed significant improvement in lameness after treatment of PDT in digital lesions *in vivo* and in microorganisms isolated *in vitro*. The study showed that the *in vitro* response is consistent with the clinical improvement observed in animals. We conclude that treatment with PDT was effective in reducing the Greenough and effective score in control of the isolated microorganisms.

KEY WORDS. Hoof infection, methylene blue, photodynamic therapy.

* Recebido em 31 de outubro de 2015.

Aceito para publicação em 5 de fevereiro de 2016.

¹ Médico-veterinário, MSc., Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB) da Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), Campus São José dos Campos, Estrada Doutor Altino Bondesan, 500, Distrito de Eugênio de Melo, São José dos Campos, SP 12247-016. Autor para correspondência, E-mail: zepaulofranco@hotmail.com

² Enfermeiro, MSc. UNICASTELO, Campus Fernandópolis, Estrada Projetada F1 s/n, Fazenda Sta Rita, Fernandópolis, SP 15600-000. E-mail: rogerio_enfer@hotmail.com

³ Médica-veterinária, DSc. PPGEB, UNICASTELO, Campus Fernandópolis, Estrada Projetada F1 s/n, Fazenda Sta Rita, Fernandópolis, SP 15600-000. E-mail: danilafrias@yahoo.com.br

⁴ Médica-veterinária, DSc. UNICASTELO, Campus Fernandópolis, Estrada Projetada F1 s/n, Fazenda Sta Rita, Fernandópolis, SP 15600-000. E-mail: vamarkes@gmail.com

⁵ Licenciada em genética, DSc. PPGEB, UNICASTELO, Campus São José dos Campos, Estrada Doutor Altino Bondesan, 500, Distrito de Eugênio de Melo, São José dos Campos, SP 12247-016. E-mail: doraines@terra.com.br

⁶ Químico, DSc. PPGEB, UNICASTELO, Campus São José dos Campos, Estrada Doutor Altino Bondesan, 500, Distrito de Eugênio de Melo, São José dos Campos, SP 12247-016, Brasil, e Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Almeida Prado, 1280, Butantã, São Paulo, SP 05508-900. E-mail: adjaci@hotmail.com - Pós-Doutorado.

RESUMO. As doenças digitais representam um problema de grande importância e elevada prevalência em rebanhos leiteiros, acarretando inúmeros prejuízos, atribuídos principalmente ao descarte prematuro, diminuição da produção de leite, perda de peso, redução da fertilidade e aos altos custos dos tratamentos. Este estudo teve como objetivo determinar a ação do efeito da terapia fotodinâmica no tratamento das afecções digitais em bovinos de leite *in vivo* e também avaliar *in vitro* o efeito da ação fotodinâmica sobre micro-organismos isolados. A metodologia consistiu em dois experimentos, primeiro foi realizado um estudo da eficácia do tratamento da terapia fotodinâmica (PDT) com uso de azul de metileno como agente fotossensibilizador *in vivo*, por meio da avaliação do escore de Greenough antes e depois do tratamento, e também outro experimento *in vitro* sob os efeitos da PDT em micro-organismos isolados das lesões presentes nos animais claudicantes. O resultado mostrou melhora significativa da claudicação após o tratamento da PDT em lesões digitais *in vivo* e também em micro-organismos isolados *in vitro*. O estudo evidenciou que a resposta *in vitro* é compatível com a melhora clínica verificada nos animais. Assim concluímos que a terapia com PDT foi eficiente na redução do escore de Greenough e eficaz no controle dos micro-organismos isolados.

PALAVRAS-CHAVE. Pododermatite, azul de metileno, terapia fotodinâmica.

INTRODUÇÃO

Nos bovinos, em especial de aptidão leiteira, os membros locomotores e os dígitos são estruturas anatômicas indispensáveis para a locomoção, alimentação e reprodução, por isso é fundamental que estas estruturas estejam sempre saudáveis (Nicoletti 2004, Pardo et al. 2004, Andrews et al. 2008).

Estudos demonstram que mais de 90% das claudicações na espécie bovina originam-se nos pés, dígitos e articulações (Radostits et al. 2000, Rebhun et al. 2000). Geralmente tais estruturas são acometidas por inflamações e infecções denominadas genericamente de pododermatites, apresentando grandes variações de sintomatologia clínica e acarretando inúmeros prejuízos aos criadores (Silva et al. 2005). Entre as afecções pode-se citar a hiperplasia interdigital bovina, tiloma, pododermatite séptica, dermatite interdigital, doença da linha branca, flegmão interdigital, e a podridão do bulbo (Nocek 1993, Mendonça et al. 2003, Leão et al. 2009).

O desenvolvimento de afecções digitais em bovinos com contaminação de micro-organismos

compromete a sanidade da pele e tecidos adjacentes, determinando a claudicação do animal. Além disso, a estação do ano, clima, o tipo de alojamento, o tamanho do rebanho, características de manejo, lactação e gestação, nutrição, idade, conformação e genética tem certa parcela etiológica inter-relacionada com o processo de claudicação (Demirkan et al. 2000).

Como a claudicação é sintoma comum em pododermatite, Greenough et al. (1983) estabeleceram categorias para avaliação clínica baseada em uma avaliação semiológica com escore elaborado em coeficientes de 1 a 5, sendo: 1 (normal) postura normal com linha de dorso retilínea em posição quadrupedal e em locomoção, passos firmes com distribuição correta do peso e apoios; 2 (ligeiramente manco) postura normal em posição quadrupedal e ligeiramente arqueada em locomoção, apoios normais; 3 (moderadamente manco) postura arqueada em posição quadrupedal e locomoção, ligeira alteração dos passos; 4 (manco) arqueamento do corpo em posição quadrupedal e locomoção, assimetria evidente do apoio poupando membros, com menos tempo de apoio do membro lesado e 5 (severamente manco) incapacidade de apoio ou de sustentação do peso do membro lesado, relutância ou recusa para locomover-se.

Os agentes contaminantes mais encontrados em afecções digitais são as bactérias das seguintes espécies: *Fusobacterium necrophorum*, *Micrococcus* sp., *Dichelobacter nodosus*, *Bacteroides* sp., *Actinomyces pyogenes*, *Escherichia coli*, *Espiroquetas*, *Microbacterium* sp. e *Staphylococcus aureus* (Kasari et al. 1988, Marques 2006). Já *Candida albicans*, que é um fungo leveduriforme, também é normalmente encontrado nestas afecções, pois sobrevive de matérias orgânicas em saprofitismo ou parasitismo no organismo dos animais (Pelczar et al. 1996).

Na prática clínica atual o tratamento das afecções digitais envolve o uso tópico e sistêmico de antibióticos e a curetagem das lesões, mas deve ser ressaltado que não são encontrados na literatura relatos precisos com relação a duração do tratamento, dose empregada, intervalo entre aplicações, além de outros fatores, vinculando uma ineficiência presente em muitas terapêuticas. Além disso, o tratamento aplicado de forma incorreta pode contribuir para o aparecimento de micro-organismos cada vez mais resistentes mediante o uso indiscriminado e incorreto dos fármacos (Laven & Hunt 2000, Nicoletti 2004, Silva et al. 2005).

Visando a diminuição da utilização de fármacos antibióticos, a terapia fotodinâmica (PDT) tem

sido apontada como um tratamento antimicrobiano alternativo. Esta terapia consiste no uso de uma substância fotossensível marcador em um meio biológico, ativada pela irradiação de luz Laser, de comprimento de onda específica. Este processo fotoquímico produz uma substância citotóxica aos micro-organismos, levando-os à morte. Um de seus principais benefícios é o efeito local sem prejuízo sistêmico (Itoh et al. 1999, Hamblin & Hasan 2004, Cassidy, Donnelly & Tunney 2010).

Segundo Tubby et al. (2009), para uso do fotossensibilizador, o mesmo tem que ser atóxico isoladamente, e quando ativado pela luz Laser com densidade energética e comprimento de onda específico ter alto poder de letalidade aos micro-organismos marcados, com baixo custo e uma elevada ação antimicrobiana. Com tais prerrogativas encontra-se o azul de metileno (Cassidy et al. 2010, Gasparetto et al. 2010), que quando ativado por fonte de luz Laser em comprimento de onda 660nm aplicado diretamente nas lesões atua na flora local. O fármaco citado foi referido por Prates et al. (2007) como uma alternativa antimicrobiana viável ao tratamento de infecções localizadas e de pequena profundidade.

Diante do contexto apresentado o objetivo do presente trabalho foi observar o efeito da terapia fotodinâmica no tratamento das afecções digitais em bovinos leiteiros *in vivo*, bem como verificar o efeito desta ação fotodinâmica no cultivo de micro-organismo presentes nas afecções, em condições *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos realizados obedeceram aos Princípios Éticos na Experimentação Animal definidos pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), Universidade de Camilo Castelo Branco-SP (Protocolo nº 1-00036/12).

Este estudo foi desenvolvido por meio de dois experimentos. Primeiro, foi realizado um estudo da eficácia do tratamento PDT realizado *in vivo*, sendo avaliado segundo a metodologia do escore de Greenough et al. (1983), e também a avaliação *in vitro* do efeito da terapia de PDT sobre a cultura de micro-organismos coletados e isolados das lesões presentes nos animais claudicantes anterior ao tratamento do animal.

1º Experimento *in vivo*

O experimento *in vivo* foi realizado em 40 vacas que possuíam dígitos infectados e apresentavam claudicação. Estes animais tinham idade entre 36 e 122 meses, eram de seis propriedades leiteiras, com perímetro médio de 40 km no município de Fernandópolis, SP. O trabalho foi realizado entre os meses de julho a novembro 2014. As fêmeas foram inspecionadas e classificadas de

acordo com a presença de claudicação segundo a metodologia do escore de Greenough et al. (1983).

A análise foi feita durante a deambulação em solo retilíneo padrão cimentado e reavaliada pós-período de tratamento utilizando PDT com azul de metileno. Em seguida à classificação inicial, os dígitos foram lavados com água destilada e escova para realização de exame específico dos dígitos e coleta de amostras do conteúdo da afecção com ajuda de *swab* estéril, depositados em tubos de ensaio com 10 mL de solução estéril de NaCl (0,5%).

Nas lesões dos animais, foi utilizado o fotossensibilizador azul de metileno (AM), em concentração 20µM. O AM foi borrifado sobre a lesão, permanecendo em contato com a lesão por 15 minutos antes da irradiação do Laser. Em seguida, a lesão foi irradiada com Laser vermelho de comprimento de onda 660nm, com 192Joules/cm² por 20 minutos contínuos, seguindo o mesmo modo em todos os animais. A ponteira do Laser até a lesão tinha uma distância de 5 cm. Foram realizadas dez seções com intervalo de 24 horas. Após a cada irradiação do Laser, era colocada bandagem de isolamento, para que a lesão não ficasse exposta a qualquer tipo de luz, sendo que no décimo primeiro dia, era retirada da bandagem e inspecionados os animais, do mesmo modo que foram inspecionados antes do tratamento, utilizando o escore de Greenough.

Os dados observados para o escore de Greenough et al. (1983), antes e depois do período de tratamento, foram analisados estatisticamente pelo teste não-paramétrico para variável ordinal pareada de wilcoxon (signed rank test) com confiança de 95% (p<0,05).

2º Experimento *in vitro*

Os procedimentos metodológicos foram adaptados visando o eficaz isolamento bacteriano e de fungos. Para tal finalidade os *swabs* contidos em solução salina foram agitados por 2 minutos e em seguida alíquotas de 0,1mL foram retiradas e inoculadas em ágar sangue, ágar saubouraud, e meios seletivos para *Clostridium* e ágar McConkey e incubados a 37°C, por 48 horas em aerobiose e em anaerobiose. O ambiente de anaerobiose foi obtido por meio de sachês (Anaerocult A Microbiologie - Merck, Alemanha) e o grau de anaerobiose medido por meio de fitas (Anaerotest Microbiologie - Merck, Alemanha) afixadas com fita adesiva à parede da jarra.

Após o período de incubação procedeu-se à obtenção de culturas puras, e classificação segundo características morfocoloniais e morfotintórias. Cada grupo bacteriano e de fungos leviduriformes foram identificados pelas características bioquímico-fisiológicas convencionais (Winn et al. 2008).

As colônias de cada espécie foram removidas e inoculadas em 100mL de meio líquido Triptecaseína de soja (TSB, OXOID®) e incubadas a 35°C por 24 a 72 horas sob agitação 150 rpm. Após, procedeu-se a centrifugação de 2mL a 4000 rpm por cinco minutos, em seguida o sobrenadante foi desprezado e o material precipitado ressuspendido em 0,5mL de solução de NaCl (0,5%) e novamente submetido a centrifugação. Este procedimento

foi repetido cinco vezes para a completa remoção dos componentes do meio de cultura. O material precipitado obtido foi ressuspenso em 1mL solução de NaCl (0,5%) e agitado vigorosamente por 1 minuto, em seguida foram adicionados 9mL de solução de NaCl e a solução submetida a nova agitação por 1 minuto. Em seguida foram ajustadas ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland, que corresponde aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. A partir desta solução foram realizadas diluições seriadas resultando uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹.

O fotossensibilizador (azul de metileno) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1mg/mL⁻¹ e diluído em solução de NaCl 0,5% para a concentração de 20µM. Cada um deles foi semeado em placas com meios próprios acima citados em método de triplicata, e após o período de colonização foi procedido a contagem das UFCs.

O delineamento experimental *in vitro* foi controlado e randomizado, sendo distribuído em quatro grupos: grupo 1 (grupo controle L-, F-); grupo 2 (L+, F-); grupo 3 (L-, F+); grupo 4 (L+, F+). Aos grupos 3 e 4 foram adicionados 1,1mL da suspensão de micro-organismo (MO), associado 0,05mL de solução do fotossensibilizador na concentração de 20µM. Nos tubos dos grupos 1 e 2 foram adicionados 1,15mL da suspensão de MO. Os ensaios foram mantidos sob abrigo da luz e 28°C por 15 minutos, sendo que decorrido este período, os grupos 2 e 4 foram submetidos a irradiação de Laser vermelho a 660 nm com dose de 192 J/aulas/cm², por 20 minutos com uma distância de 5 cm do tubo. Após os tratamentos, de cada tubo foi removida uma alíquota de 0,05mL e transferida para uma placa Petri contendo (ASD, OXOID®) e (TSA, OXOID®).

A amostra foi uniformemente distribuída, com o auxílio de pérolas de vidro estéreis e as placas foram incubadas a 35°C por 24 a 72 horas. Decorrido este período foi efetuado a contagem de colônias para a avaliação da ação fotodinâmica sobre os micro-organismos isolados. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

No experimento *in vitro* as amostras seguiram o tratamento estatístico para comparação dos grupos amostrais, mediante ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, adotando intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas nas 40 vacas examinadas, 8 tipos de lesões podais (Tabela 1), das quais 10 vacas apresentaram mais de um agente infeccioso. Dentre as lesões, a mais frequentemente encontrada foi tiloma, que representou 37,5% do total, seguida por dermatite interdigital com 15%, e hiperplasia interdigital e doença da linha branca com 12,5% cada.

Na Tabela 2 estão apresentados os tipos de lesões seguidos dos agentes causadores de afecções podais. O tiloma foi a lesão onde isolou-se a maioria dos micro-organismos e a *Candida albicans* foi o micro-organismo de maior ocorrência.

O resultado da avaliação clínica de claudicação pelo escore de Greenough antes e depois do tratamento, demonstrou melhora significativa da claudicação após o tratamento das lesões com azul de metileno e Laser vermelho.

Na Figura 1 observa-se a variação dos dados obtidos de todos os animais usando como padrão o escore de Greenough antes e depois ao tratamento com PDT. Na Figura 2 evidencia-se os resultados

Tabela 1. Ocorrência de lesões podais em vacas leiteiras no município de Fernandópolis, SP.

Lesões podais	Nº de Casos	Porcentagem
Tiloma	15	37,5
Dermatite interdigital	6	15,0
Doença da linha branca	5	12,5
Hiperplasia interdigital	5	12,5
Podridão do bulbo	4	10,0
Flegmão interdigital	3	7,5
Erosão da talão	1	2,5
Pododermatite circunscrita	1	2,5
Total	40	

Tabela 2. Agentes etiológicos responsáveis por lesões podais em vacas leiteiras no município de Fernandópolis, SP.

Lesões	<i>Candida</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
Tiloma	11	4	4
Dermatite interdigital	3	2	2
Doença da linha branca	4	1	1
Hiperplasia interdigital	4	1	1
Podridão do bulbo	3	1	2
Flegmão interdigital	3	1	0
Erosão da talão	0	0	1
Pododermatite circunscrita	1	0	0

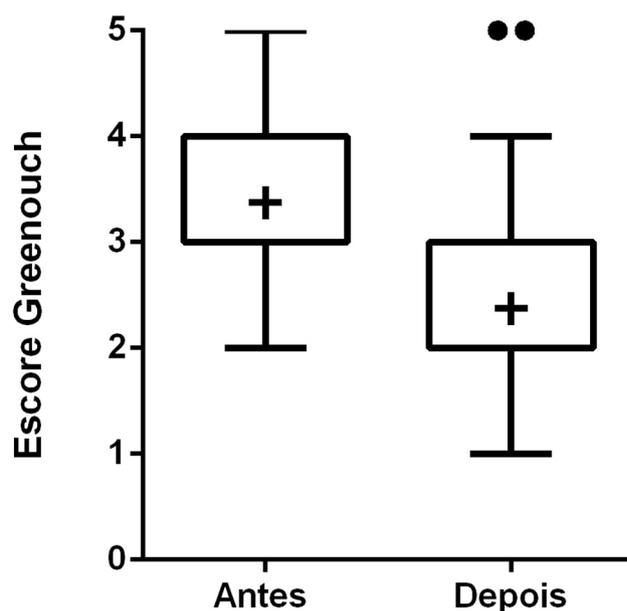


Figura 1. Representação gráfica em box-plot com correção de Tukey do escore de Greenough, obtido antes e depois do tratamento com PDT em todos os animais. Os pontos (••) indicam outliers e os sinais de (+) indicam a mediana.

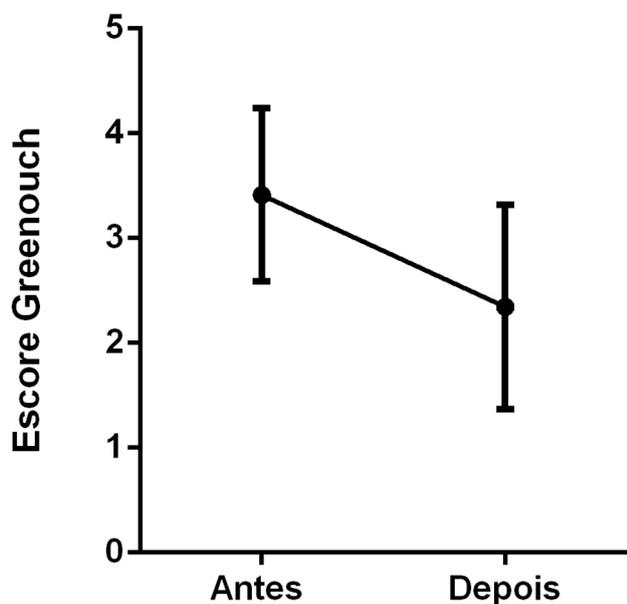


Figura 2. Representação gráfica do escore de Greenough obtido antes e depois do tratamento com PDT nos animais acometidos por *Candida albicans*. A linha representa diminuição significativa ($p=0,0016$).

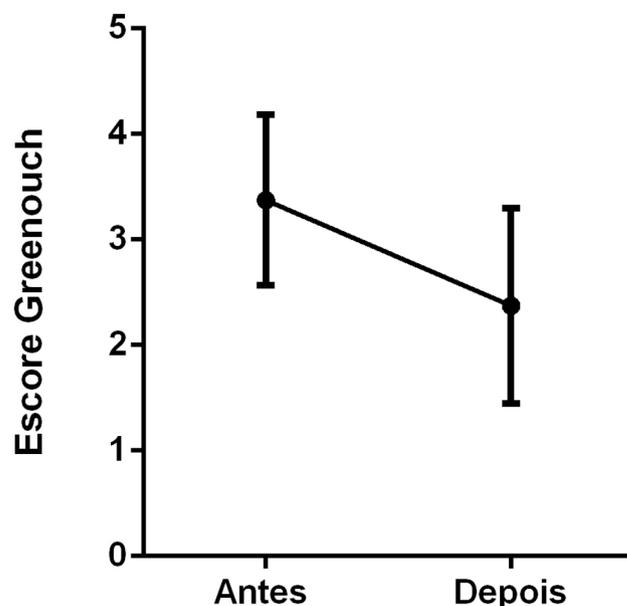


Figura 4. Representação gráfica do escore de Greenough obtido antes e depois do tratamento com PDT nos animais acometidos por *Micrococcus sp.*, a linha representa diminuição com significância ($p=0,0192$).

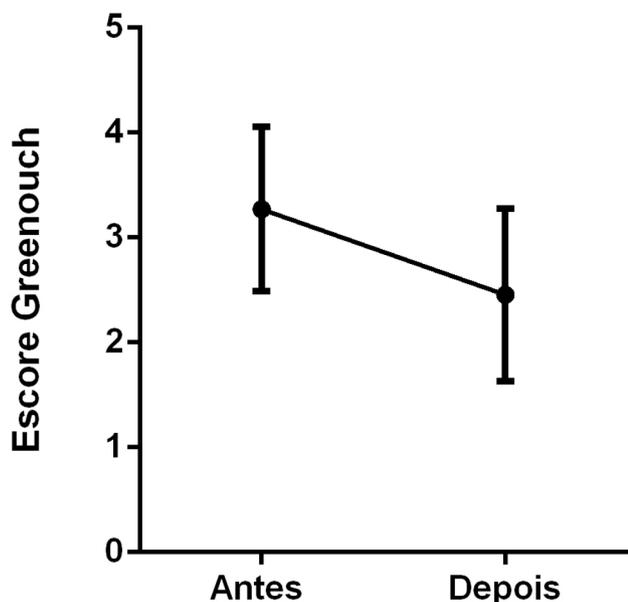


Figura 3. Representação gráfica do escore de Greenough obtido antes e depois do tratamento com PDT nos animais nos animais acometidos por *Staphylococcus aureus*. A linha representa diminuição significativa ($p=0,0437$).

do tratamento para os animais acometidos com *Candida albicans*; enquanto que, na Figura 3 representa os resultados obtidos no tratamento para os animais acometidos com *Staphylococcus aureus*. Já, na Figura 4 evidencia-se os resultados obtidos no tratamento para os animais acometidos com *Micrococcus sp.*

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos testes *in vitro*. Nota-se a ação significativa do

tratamento PDT sobre os agentes isolados nas lesões podais, mostrando que a ação PDT apresenta efeito de toxicidade sobre *Candida sp.* e *Micrococcus sp.*, levando a morte por apoptose. Mas, não foi possível alcançar um efeito semelhante ao *Staphylococcus aureus*.

A terapia fotodinâmica surge como alternativa para inativação de micro-organismos baseada na interação de luz Laser e de um agente fotossensibilizador, apresentando vantagem de ação local e instantânea, não repercutindo em resíduos metabólicos que poderiam contribuir para a contaminação dos produtos derivados dos animais, bem como reações colaterais (Kashef et al. 2011).

Neste estudo em questão ficou evidente que o tratamento clínico *in vivo* utilizando PDT contribuiu para a melhora da claudicação, pois ficou evidente a diminuição nos índices do escore de Greenough obtidos independente do micro-organismo ou lesão incidente antes e depois do tratamento. Também é importante salientar que em algumas lesões haviam infecções mistas apresentando mais de um micro-organismo, sendo relevante na análise dos efeitos nos tratamentos conforme pode-se averiguar na Tabela 3.

Se analisarmos separadamente o quadro clínico dos animais em relação à infecção específica pelos micro-organismos isolados, observar-se-á na Figura 2, o resultado referente ao tratamento de diversas afecções contaminadas por *Candida albicans*. Neste, pode-se observar que, houve melhora

Tabela 3. Eficácia da ação fotodinâmica sobre os micro-organismos isolados, valores expressos pela média aritmética das unidades formadoras de colônias, associados aos desvios padrão.

Micro-organismos	Irradiação (minutos)	Tratamentos (grupos)			
		Controle ^a (L-F-)	L+F- ^b	L-F+ ^c	L+F+ ^d
<i>Candida</i> sp.	20 minutos	173,1±44,34	75,38±22,04	157,1±41,82	0,0±0,0
<i>Staphylococcus aureus</i>		246,0±69,11	141,0±34,19	241,0±60,57	66,36±7,54
<i>Micrococcus</i> sp.		206,8±53,87	119,3±35,78	182,4±47,90	0,0±0,0

^a micro-organismos sem tratamento com fotossensibilizador e sem luz Laser; ^b micro-organismos apenas com aplicação de luz Laser; ^c micro-organismos com azul de metileno e sem aplicação de luz Laser; ^d micro-organismos com azul de metileno e com aplicação de luz Laser;

significativa dos animais após o tratamento, com a redução do escore analisado. Garcia et al. (1996) observaram, que este micro-organismo, normalmente vive como comensal na microbiota digestiva dos bovinos de leite, entretanto, em virtude de distúrbios na proteção física dos cascos, alteração química de sua formação e a imunologia do animal, o micro-organismo pode se tornar patogênico promovendo afecções nos cascos.

Observa-se na figura 3, o tratamento das diversas afecções contaminadas por *S. aureus*, apresentou uma evolução positiva no tratamento. Porém, a análise estatística obtida revela índice $p=0,0437$, muito próximo ao valor limite estabelecido de significância ($p<0,05$). Isso corrobora a observação clínica da associação entre este micro-organismo às lesões de mais difícil controle. Tais animais apresentaram claudicação sustentada até o final da observância no estudo, mesmo nesses casos, a terapia com fotossensibilizador se mostrou eficaz.

Na Figura 4, o resultado refere-se ao tratamento de afecções contaminadas por *Micrococcus* sp., revela que o tratamento aplicado sobre este micro-organismo foi eficaz na evolução clínica dos casos com a maior significância entre os micro-organismos.

Os dados estatísticos obtidos na ação fotodinâmica em diferentes tratamentos e micro-organismos, considerando o tempo de irradiação por 20 minutos, mostraram que houve significância entre os tratamentos ($p<0,001$).

O resultado *in vivo*, com análise do escore estudado, permitiu comparar os três micro-organismos causadores de afecções digitais, e o melhor resultado após o tratamento, foi nas afecções digitais contaminadas com *Micrococcus* sp., seguido da ação nas afecções contaminadas com *C. albicans*. A ação do tratamento nas lesões contaminadas com *S. aureus* foi menos eficaz. Os dados *in vitro* encontrados na Tabela 3 também confirmam os dados obtidos.

Houve melhora na classificação de Greenough, com diminuição do valor em 72,5% dos animais,

enquanto que o mesmo se manteve em 22,5% e 5% dos animais tratados apresentaram um aumento no valor, representados como *outliers* na Figura 1. Isso indica que o tempo de tratamento adotado no projeto possivelmente não foi suficiente para elucidar casos de maior gravidade. Assim, poder-se-ia propor nova análise frente à evolução da recuperação das lesões de diferentes gravidades.

De maneira geral, houve melhora no quadro clínico de claudicação após o tratamento por PDT. O resultado do tratamento *in vitro*, corrobora com os resultados do tratamento *in vivo*.

A análise dos dados da Tabela 2 mostra que a maior casuística se deve à contaminação com *C. albicans*, sendo 29 afecções digitais (58%). Em segunda quantificação das amostras, estabelece 11 afecções digitais contaminadas por *S. aureus*, sendo (22%), e 10 afecções por *Micrococcus* sp. (20%), comprovando a existência de um ou mais contaminantes em uma mesma lesão. Analisada de um modo geral, a ação da PDT, se mostrou eficaz para os micro-organismos isolados.

Na Tabela 3, no grupo controle (L-F-) não foram observadas variações das médias de UFC na população fúngica e bacteriana, pois permaneceram com valores muitos próximos no período experimental. Mesmo verificado após 20 minutos de tratamento não houve redução da viabilidade celular. Uma análise absoluta demonstra redução de 56,4% para *Candida* sp., 42,68% *S. aureus* e 42,3% para *Micrococcus* sp.

No tratamento com L+F+ (luz + fotossensibilizador) não foi observado a formação de UFC para os micro-organismos *Candida* sp. e *Micrococcus* sp., mostrando que a ação fotodinâmica foi efetiva contra esses micro-organismos. Já a ação da PDT para o micro-organismo *S. aureus* foi menor, apresentando média de 66,36 UFC, com inibição parcial do micro-organismo após a irradiação por 20 minutos.

A análise do tratamento sobre as colônias de *C. albicans* mostrou diferença entre o controle e os grupos onde houve incidência luminosa (L+) e

(AM+L+). Nesta análise, também não foi observada diferença entre o controle e o grupo que recebeu apenas azul de metileno (AM+L-). Já o grupo que recebeu o tratamento com azul de metileno associado à incidência luminosa (AM+L+) apresentou-se zero na contagem de colônias, mostrando a maior eficácia de tratamento sobre a levedura. Resultados semelhantes foram encontrados por Zeina et al. (2003), utilizando o mesmo tempo de exposição que também se mostrou favorável no controle de *C. albicans*.

No tratamento sobre colônias de *S. aureus* houve diferença entre o grupo controle e os grupos que receberam irradiação de luz (L+) e (AM+L+), mostrando que a incidência luminosa também é um fator determinante na diminuição do número de UFC da bactéria. Porém, não houve diferença entre o grupo que recebeu apenas a incidência luminosa (L+) e o grupo que recebeu tratamento apenas com azul de metileno (AM+L-). Neste trabalho pode-se inferir que o fotossensibilizador azul de metileno não apresentou eficácia no controle da bactéria *S. aureus* em relação aos outros micro-organismos testados. Isso é pertinente quanto à avaliação clínica, verificada na Figura 3. Como observado anteriormente, este grupo foi o que apresentou menor evolução relativa no escore após o tratamento.

A bactéria *Micrococcus* sp. apresentou resultados semelhantes a levedura *C. albicans*. Houve diferença entre o grupo controle e os demais grupos, exceto o grupo com azul de metileno sem incidência luminosa (AM+L-). Para esta bactéria, o fator luz também parece ser um fator determinante. Quando analisada a aplicação do azul de metileno, observou-se a nulidade de colônias, mostrando que o azul de metileno com incidência luminosa (AM+L+) foi eficaz no controle do micro-organismo. Este resultado poderia ser explicado pela capacidade de ligação seletiva do fotossensibilizador AM às estruturas dos fungos, preferencialmente à mitocôndria. A seletividade deste composto na mitocôndria pode ser determinada pela lipofilicidade e pela carga positiva em sua estrutura química, permitindo assim a internalização do fotossensibilizador, como proposto por Gabrielli et al. (2004). Para Zhang & Tang (2004), o AM aglomera-se em membranas celulares e, quando excitado o fotossensibilizador, apresenta absorção na região de luz vermelha, produzindo espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido e oxigênio singlete, elementos importantes para fotooxidação e morte celular, explicando a ação em procariontes como as bactérias.

Em relação à inativação das bactérias pela ação

fotodinâmica, a mesma é explicada devido a sensibilidade a PDT em que as bactérias Gram-positivas possuem apenas uma membrana o que facilita a incorporação do AM, já as espécies Gram-negativas são mais resistentes a esta terapia. A parede celular da bactéria Gram-negativa possui uma membrana externa a camada de peptídeoglicano, funcionando como uma barreira física e funcional da célula, podendo dificultar a penetração do composto na membrana (Wainwright 1998, Rovaldi et al. 2000, Phoenix et al. 2003, Hamblin & Hasan 2004, Komeirik & MacRobert 2006).

Ficou evidente no estudo que a resposta *in vitro* é compatível com a melhora clínica verificada nos animais. O escore de Greenough se mostrou eficiente na avaliação do tratamento com PDT. Certo que as arestas destes resultados devem ser aplainadas com mais estudos e avaliações.

CONCLUSÕES

O tratamento com PDT foi eficiente nos dois tipos de experimentos. Na avaliação clínica baseada na classificação com escore, houve melhora na categoria do escore Greenough *in vivo* e também inativação dos micro-organismos isolados no tratamento *in vitro*. Portanto, a terapia com PDT foi eficaz na melhora clínica na claudicação dos animais e no controle das populações de micro-organismos contaminantes.

Agradecimentos. Aos criadores de bovinos leiteiros do município de Fernandópolis no estado de São Paulo; à Universidade Camilo Castelo Branco pela estrutura laboratorial utilizada para a realização da pesquisa e também pela bolsa de estudos concedida.

REFERÊNCIAS

- Andrews A.H., Blowey R.W., Eddy R.G. & Boyd H. *Medicina Bovina: doenças e criação de bovinos*. 2ª ed. Roca, São Paulo, 2008. 1080p.
- Cassidy C.M., Donnelly R.F. & Tunney M.M. Effect of sub-lethal challenge with Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) on the antibiotic susceptibility of clinical bacterial isolates. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 99:62-66, 2010.
- Demirkan I., Murray R.D. & Carter S.D. Skin diseases of the bovine digit associated with lameness. *Veterinary Bulletin*, 70:149-171, 2000.
- Gabrielli D., Belisle E., Severino D., Kowaltowski A.J. & Baptista M.S. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochemistry and Photobiology*, 79:227-232, 2004.
- Garcia M., Libera A.M.M.P. & Barros Filho I.R. *Manual de Semiologia e Clínica dos Ruminantes*. Varela, São Paulo, 1996. 248p.
- Gasparetto A., Lapinski T.F., Zamuner S.R., Khouri S., Alves L.P., Munin E. & Salvador M.J. Extracts from *Alternanthera maritima* as Natural Photosensitizers in Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 99:15-20, 2010.
- Greenough P.R., McCallum F.I. & Weaver A.D. *Les Boiteries des Bovins*. 3ª ed. Point Veterinaire, Paris, 1993. 478p.

- Hamblin M.R. & Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3:436-450, 2004.
- Itoh Y., Ninomiya Y., Tajima S. & Ishibashi A. Photodynamic therapy for acne vulgaris with topical 5-aminolevulinic acid. *Journal of the American Medical Association: Dermatology*, 136:1093-1095, 2000.
- Jones G.M. *On-farm tests for drug residues in milk*. Virginia State University, Petersburg, 1999. 6p.
- Kasari T.R., Marquis H. & Scanlan C.M. Septic arthritis and osteomyelitis in a bovine digit: a mixed infection of *Actinomyces pyogenes* and *Fusobacterium necrophorum*. *Cornell Veterinarian*, 78:215-9, 1988.
- Kashef N., Esmaeeli Djavaid G., Sirosy M., Taghi Khani A., Hesami Zokai F. & Fateh M. Photodynamic inactivation of drug-resistant bacteria isolated from diabetic foot ulcers. *Iranian Journal of Microbiology*, 3:36-41, 2011.
- Komerik N. & MacRobert A.J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 25:487-504, 2006.
- Laven R.A. & Hunt H. Comparison of valnemulin and lincomycin in the treatment of digital dermatitis by individually applied spray. *Veterinary Record*, 149:302-303, 2000.
- Leão M.A., da Silva L.A.F., Jayme V.S., da Silva L.M., de Moura M.I. & Barbosa V.T. Aspectos epidemiológicos da dermatite digital em duas propriedades produtoras de leite do Estado de Goiás, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*. 10:1135-1147, 2009.
- Marques D.C.M. *Criação de Bovinos*. 7ª ed. Consultoria Veterinária e Publicações, Belo Horizonte, 2006. 586p.
- Mendonça A.C., da Silva L.A.F., Fioravanti M.C.S., de Moraes J.O.R., Almeida C.F., Oliveira K.S., Oliveira M.P. & da Silva L.M. Aspectos morfológicos dos dígitos de bovinos das raças Gir e Holandesa. *Ciência Animal Brasileira*. 4:53-60, 2003.
- Nicoletti J.L.M. *Manual de podologia bovina*. Manole, São Paulo, 2004. 126p.
- Nocek J.E. *Hoof care for dairy cattle*. W.D. Heard, Fort Atkinson, 1993. 32p.
- O'Riordan K., Akilov O.E. & Hasan T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2:247-262, 2005.
- Pardo P.E., Bremer Neto H., Chiacchio S.B., Nagoshi M. & Padilha P.M. Determinação de zinco da sola do casco de bovinos leiteiros com ou sem lesões podais, suplementados ou não com levedura seca de cana de açúcar. *Ciência Rural*, 34:1501-1504, 2004.
- Pelczar Jr.J.M., Chan E.C.S. & Krieg N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2ª ed. Makron Books, São Paulo, 1996. 556p.
- Phoenix D.A., Sayed Z., Hussain S., Harris F. & Wainwright M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39:17-22, 2003.
- Prates R.A., Yamada Jr. A.M., Suzuki L.C., Eiko Hashimoto M.C., Cai S., Gouw-Soares S., Gomes L. & Ribeiro M.S. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 86:70-76, 2007.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. *Clínica Veterinária - Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002. 1737p.
- Rebhun W.C., Guard C. & Richards C.M. *Doenças do gado leiteiro*. Roca, São Paulo, 2000. 642p.
- Rovaldi C.R., Pievsky A., Sole N.A., Friden P.M., Rothstein D.M. & Spacciapoli P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44:3364-67, 2000.
- Silva L.A., Silva C.A., Borges J.R., Fioravanti M.C., Borges G.T. & Atayde I.B. A clinical trial to assess the use of sodium hypochlorite and oxytetracycline on the healing of digital dermatitis lesions in cattle. *Canadian Veterinary Journal*, 46:345-348, 2005.
- Tubby S., Wilson M. & Nair S.P. Inactivation of staphylococcal virulence factors using a light-activated antimicrobial agent. *BMC Microbiology*, 9:1-10, 2009.
- Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42:13-28, 1998.
- Zhang L.Z. & Tang G.Q. The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 74:119-125, 2004.