

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

VALCLEI LUZ DE ABREU

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
NO TRATAMENTO DE OTITE CAUSADA POR *Malassezia* spp. EM CÃES
DOMICILIADOS**

ILHÉUS-BAHIA

2020

VALCLEI LUZ DE ABREU

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal.

Orientador: Prof. DSc. Fernando Alzamora Filho

ILHÉUS-BAHIA

2020

A162 Abreu, Valclei Luz de.
Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento de otite causada por *Malassezia* spp. em cães domiciliados / Valclei Luz de Abreu. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.
51 f. : il. ; anexo.

Orientador: Fernando Alzamora Filho.
Dissertação (mestrado) –Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Referências: f. 36-49.

1. Cães – Doenças. 2. Antibióticos. 3. Fungos. 4. Otite em animais. I. Título.

CDD 636.7

VALCLEI LUZ DE ABREU

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
NO TRATAMENTO DE OTITE CAUSADA POR *Malassezia* spp. EM CÃES
DOMICILIADOS**

Ilhéus - Bahia, 27 / 02 / 2020

Fernando Alzamora Filho – DSc
UESC/ DCAA
(Orientador)

Poliana Castro de Melo – DSc
UESC/ DCAA

Roberta Costa Dias – DSc
UFBA/ DMVPPA

**Ilhéus – Bahia
2020**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força, paciência, determinação e coragem ao cumprir todas atividades propostas a mim;

Agradeço ao professor e orientador Fernando Alzamora Filho pela oportunidade, incentivo e parceria durante os anos que passei no mestrado;

Agradeço a minha família, por estar sempre perto e presente, por acreditar sempre e pelo total apoio;

Agradeço aos colegas por dividir esses anos de trabalho. Dias risonhos, outrora, chorosos e assim findamos esta jornada, na torcida pelo sucesso merecido de cada um. Aqui fica o meu carinho em especial a Carol, Haissa, Rebeca Costa e Sophia. Deixo também registrado o meu imenso agradecimento a Rebeca Dálety, pela amizade, incentivo e parceria na realização deste trabalho;

Agradeço aos amigos que foram solícitos, principalmente no momento final deste trabalho, gratidão a Rebeca Silvy, Mayana, Janaína, Jaysa, Kenedy, Sara Helena;

Agradeço aos amigos que foram presentes e que sempre se preocuparam muito comigo, em especial a duas grandes amigas, que me acolheram muito bem, Reinilda e Dani Bispo, a vocês minha eterna gratidão.

Agradeço a CAPES pelo financiamento do meu mestrado;

Agradeço a todos os professores da pós-graduação, e funcionários que direta e indiretamente contribuíram para o meu crescimento acadêmico;

Agradeço a todos os tutores e animais que passaram por mim nas coletas e atendimentos, sem eles a realização desse mestrado não seria possível.

Gratidão a todos!

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DE OTITE CAUSADA POR *Malassezia* spp. EM CÃES DOMICILIADOS

RESUMO

A otite é uma doença inflamatória comum em cães que acomete o sistema otovestibulococlear, de etiologia multifatorial. As otites recidivantes são frequentes, devido a fatores perpetuantes como a colonização bacteriana, fungica e erros no tratamento por uso incorreto dos medicamentos. Por esse motivo, tem sido realizado pesquisas em busca de alternativas eficazes para o tratamento dessa doença, frente a resistência aos antimicrobianos. Objetivou-se avaliar a eficiência da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana como uma terapia alternativa, no tratamento de otite externa em cães. Foram utilizados 14 cães (27 orelhas) de raças distintas, domésticos, domiciliados, sintomáticos, avaliados por palpação, inspeção, otoscopia e exame citológico do cerúmen do ouvido externo e médio para identificação da *Malassezia* spp. Após o diagnóstico, os animais foram divididos igualmente em dois grupos (1 e 2), um para tratamento convencional e o outro para a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana. Os animais foram acompanhados por avaliação clínica e microbiológica durante 7 dias. Por meio da terapia fotodinâmica observou-se a diminuição da quantidade de leveduras presentes no conduto auditivo, conseqüentemente o desaparecimento dos sinais clínicos inicialmente identificados nos animais como otite externa causada por *Malassezia* spp. Ambos os tratamentos foram eficientes, não havendo diferença significativa entre eles. Conclui-se que a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana pode ser uma alternativa satisfatória para o tratamento da otite externa em cães, com potencial semelhante ao tratamento convencional.

Palavras-chaves: Antibiótico. Fototerapia. Fungo. Inflamação. Laser de baixa potência.

**EVALUATION OF THE EFFECT OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC
THERAPY ON THE TREATMENT OF OTITIS CAUSED BY *Malassezia* spp.
IN HOUSEHOLD DOGS**

ABSTRACT

Otitis is a common inflammatory disease in dogs that affects the otovestibulocochlear system, of multifactorial etiology. Recurrent otitis is common, due to perpetuating factors such as bacterial and fungal colonization and errors in treatment due to the incorrect use of medications. For this reason, research has been carried out in search of effective alternatives for the treatment of this disease, in the face of resistance to antimicrobials. The objective was to evaluate the efficiency of antimicrobial photodynamic therapy as an alternative therapy in the treatment of otitis externa in dogs. 14 dogs (27 ears) of different breeds were used, domestic, domiciled, symptomatic, evaluated by palpation, inspection, otoscopy and cytological examination of the outer and middle ear cerumen to identify *Malassezia* spp. After diagnosis, the animals were divided equally into two groups (1 and 2), one for conventional treatment and the other for antimicrobial photodynamic therapy. The animals were followed up by clinical and microbiological evaluation for 7 days. Through photodynamic therapy, a decrease in the amount of yeasts present in the auditory canal was observed, consequently the disappearance of the clinical signs initially identified in the animals as otitis externa caused by *Malassezia* spp. Both treatments were efficient, with no significant difference between them. It is concluded that antimicrobial photodynamic therapy can be a satisfactory alternative for the treatment of otitis externa in dogs, with potential similar to conventional treatment.

Keywords: Antibiotic. Phototherapy. Fungus. Inflammation. low power laser.

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Páginas
1	Pontos de incidência da luz laser no conduto auditivo dos cães.....	28
2	Avaliação da evolução clínica ao tratamento convencional, grupo 1. (A: antes de iniciar o tratamento; B: após 48h do tratamento; C: após 96h de tratamento; D: após 144h de tratamento).....	30
3	Avaliação da evolução clínica ao tratamento Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), grupo 2. (A: antes de iniciar o tratamento; B: após 48h do tratamento; C: após 96h de tratamento; D: após 144h de tratamento).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabelas		Páginas
1	Descrição dos sinais clínicos avaliados nos animais do grupo1, tratamento convencional.....	29
2	Descrição dos sinais clínicos avaliados nos animais do grupo 2, tratamento TFDa.....	29
3	Análise estatística e comparação dos resultados pelo teste de Friedman entre os grupos da terapia convencional e o grupo da terapia fotodinâmica.....	32
4	Análise estatística nos tempos 0, 48, 96 e 144 horas, entre os grupos de tratamentos Convencional e TFDa, pelo teste de Mann-Whitney.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SIMBOLOS

AM	Azul de metileno
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROS	Espécie Reativa de Oxigênio
FS	Fotossensibilizador
g	gramas
g/mL	gramas/ mililitro
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
J	Joules
kg	quilograma
mg	miligramas
mL	mililitro
mW	miliwatt
nm	nanomêtro
sp	Espécie
spp	Espécies
TFDa	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz
λ	lâmbida

SUMÁRIO

<u>INTRODUÇÃO</u>	11
<u>2 OBJETIVOS</u>	13
<u>2.1 OBJETIVO GERAL</u>	13
<u>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	13
<u>3 REVISÃO DE LITERATURA</u>	14
<u>3.1 CONDUTO AUDITIVO: ANATOMIA</u>	14
<u>3.2 OTITE EXTERNA</u>	14
<u>3.2.1 Etiologia</u>	15
<u>3.2.2 Patogenia</u>	18
<u>3.2.3 Sinais clínicos</u>	19
<u>3.2.4 Diagnóstico</u>	19
<u>3.2.5 Tratamento</u>	20
<u>3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA</u>	21
<u>3.3.1 Histórico</u>	21
<u>3.3.2 Mecanismo de ação</u>	22
<u>3.3.3 Fotossensibilizadores</u>	24
<u>4. MATERIAL E MÉTODOS</u>	26
<u>4.1 Animais</u>	26
<u>4.2 Colheita e avaliação das amostras</u>	26
<u>4.3 Análise estatística</u>	28
<u>5. RESULTADOS</u>	29
<u>5.1 Avaliação física</u>	29
<u>7. CONCLUSÃO</u>	36
<u>8. REFERÊNCIAS</u>	37

INTRODUÇÃO

A otite externa é uma inflamação do conduto auditivo externo, classificada em aguda, crônica e recidivante, causando danos parcial ou total no conduto, incluindo as estruturas anatômicas do pavilhão auricular (PATERSON, 2016). As otopatias representam um número significativo de doenças diagnosticadas, na clínica de pequenos animais. Em cães, 20% da espécie é acometida, sendo que a otite externa crônica é a mais comumente diagnosticada, seguida da otite média. Casos mais graves podem gerar surdez, problemas neurológicos, sepse e levar o animal a ao óbito (WOODY; FOX, 1987; HARVEY; HARARI; DELAUXE, 2004; FOSSUM, 2005).

A otite é uma doença multifatorial, cujas causas mais comuns são umidade, traumas, conformação e anatomia de orelhas, ectoparasitas, excesso de pelo, animais alérgicos, imunossuprimidos, dentre outras. Existem os fatores secundários que podem agravar à doença, como as infecções bacterianas e fúngicas. Os sinais clínicos comuns à doença são o excesso na produção de cerúmen, dor, hiperemia, prurido e inflamação. (ROSSER, 2004; PATERSON, 2016; GOMES ALLENDORF, 2018).

Os microrganismos frequentemente encontrados na microflora auricular são *Staphylococcus* spp. e *Malassezia* spp. A *Malassezia* spp. é um fungo oportunista, que promove perpetuação da doença quando há alguma desordem na microflora auricular (MERCHANT, 2005; SANCHEZ et al., 2011; BUDGEN, 2012).

O tratamento preconizado consiste na associação entre antibiótico, antifúngico e corticoides, preferencialmente pela via tópica. No entanto, é elevado o número de recidivas, pois a maioria dos tratamentos são instituídos sem exames complementares, promovendo resistência aos medicamentos (CRUZ, 2018).

Atualmente, um dos principais temas abordados na literatura científica é a resistência microbiana aos antibióticos, devido às infecções causadas por patógenos oportunistas, que elevam os índices de morbidade e mortalidade em humanos e animais. Por esse motivo, tem-se realizado pesquisas em busca de novas opções de tratamento para o controle das infecções. A terapia fotodinâmica tem sido utilizada como um método alternativo para o controle de

doenças infecciosas, como método bioestimulador para o reparo tecidual, promover efeitos anti-inflamatórios, angiogênese, redução da dor e no tratamento de neoplasias cutâneas (DEMINOVA; HAMBLIN, 2004; MAISCH et al, 2011; CRUZ, 2018).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) consiste na administração local ou sistêmica de um fotossensibilizador, que tem efeito citotóxico quando fotoativado em um determinado comprimento de onda. A interação entre fotossensibilizador, luz e oxigênio resulta em reações de fotoxidação pela via de geração de radicais livres (reação tipo I) e pela geração de oxigênio singleto (reação tipo II) e ambas promoverão morte do microrganismo, seja por apoptose, necrose ou autofagia (CAPELLA; CAPELLA, 2003; DEMINOVA; HAMBLIN, 2004;).

A TFDa tem sido bastante difundida tanto na medicina humana como em medicina veterinária, por apresentar vantagens como ausência de efeitos sistêmicos, de cepas microbianas resistentes, ser um método não invasivo, não possuir efeito cumulativo e não ser tóxico ao organismo hospedeiro (MELLO et al., 2011; WEISS et al. 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a eficiência da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana como alternativa de tratamento para otite causada por *Malassezia* spp. em cães domiciliados, por meio da terapia fotodinâmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a ação terapêutica da Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) como tratamento de otites por *Malassezia* sp. em cães, testando sua eficácia.

- Comparar o uso da TFDa com pelo menos um tratamento convencional (uso tópico da associação medicamentosa de antibiótico, antifúngico e glicocorticoides) utilizado para o tratar otites em cães.
- Descrever os principais sinais clínicos encontrados em cães acometidos pela inflamação do conduto auditivo ocasionados pela otite e comparar as alterações após as terapias realizadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONDUTO AUDITIVO: ANATOMIA

O sistema auditivo é dividido em três partes: externa, média e interna. Cada uma dessas partes é composta por diferentes estruturas, mas que permanecem em comunicação e desempenham a função de identificação do som, por meio das vibrações captadas (LIBERATO, 1999; KONIG; LIEBICH,2011).

O ouvido externo é constituído pela orelha e meato acústico externo, o ouvido médio é composto pela cavidade e pela membrana timpânica e três ossículos com ligamentos e músculos associados e o interno, formado pela cóclea e os canais semicirculares (GETTY; SISSON; GROSSMAN, 1986).

O conduto auditivo externo varia de tamanho entre indivíduos, apresentando em média entre 5 - 10 cm, dividido em duas porções, vertical e horizontal. O lúmen do canal auditivo externo possui tamanho médio entre 0,5-1cm. Características como tamanho de orelha, posicionamento da mesma, diâmetro do meato acústico externo, quantidade de pelo são distintas entre as raças (RICHARD; HARARI; DELAUCHE, 2002; NASCENTE, 2006).

O canal auditivo é coberto por um epitélio estratificado, escamoso, constituído por folículos pilosos e glândulas sebáceas e ceruminosas. Conforme mais próximo é da membrana timpânica, mais fina a derme e epiderme, conseqüentemente menor é a quantidade de folículos pilosos e de glândulas sebáceas (ETTINGER; FELDMAN, 2004). O cerúmen confere proteção ao canal auditivo externo contra infecções, pois realizaram-se análises com amostras de

cerúmen de cães e identificaram presença de imunoglobulinas do tipo IgA, IgG e IgM (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; THOMAS, 2006).

3.2 OTITE EXTERNA

A otite é a inflamação do sistema oto-vestibulococlear, sendo avaliada como uma das importantes morbidades na espécie canina. Pode ser classificada quanto ao acometimento, uni ou bilateral; quanto a localização, externa, média e interna e pela evolução, classificada como aguda, crônica e recorrente (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

A otite externa é caracterizada pela inflamação do pavilhão auricular externo, conseqüentemente, observa-se o aumento na quantidade de cerúmen decorrente da hiperplasia glandular ceruminosa, fibrose por meio do espessamento da derme e epiderme, diminuição do diâmetro do canal devido ao aumento na espessura das dobras, resultando em calcificação da cartilagem (WERNER, 2005). Por se tratar de uma inflamação, torna o epitélio predisposto a traumas, e posteriormente, tornar-se uma lesão secundária infeccionada (MEDLEAU; HINILICA, 2008).

3.2.1 Etiologia

A otite é uma doença multifatorial, e está associada a diversos fatores etiológicos sendo eles primários, predisponentes e perpetuantes (WOOD; FOX, 1987).

Os fatores primários desencadeiam acometimento direto da doença, por meio de um processo inflamatório no conduto auditivo como corpos estranhos, doença autoimune, parasitas, hipersensibilidades, distúrbios de queratinização, otites idiopáticas inflamatórias, entre outras (GOTTHELF, 2007; ROSSER, 2004).

A presença de corpo estranho são causas relativamente raras para otite, podendo ser induzida por areia, sujeira, medicamento e insetos. Em relação as causas parasitárias, Griffin (1993) relatou que o *Otodectes cynotis* é responsável em até 10% das causas de otite em cães. Em casos agudos, a secreção é caracterizada pela coloração cor marrom escura e preta. Em casos crônicos,

pode haver contaminação secundária por fungos e bactérias, e o exsudato fica mais ceruminoso ou purulento. Os carrapatos causam inflamação ao tecido de revestimento do pavilhão (ROSSER, 2004).

As doenças autoimunes como pênfigo (foliáceo, eritematoso, bolhoso), discoide *lúpus* eritematoso, vasculite cutânea pode afetar as pinças ou canal auditivo, mas são causas raras de otite externa. Os distúrbios de queratinização podem ocorrer devido alterações endócrinas como hipotireoidismo, hiperadrenocorticismos e desequilíbrio hormonal sexual, alterando também a glândula de cerúmen (ROSSER, 2004).

O hipotireoidismo, resulta na perda progressiva de tecido funcional, característica do hipotireoidismo primário, já o secundário ocorre em menos de 5% dos casos, ambos, causam destruição progressiva da glândula e diminuição da produção hormonal. A atrofia folicular idiopática é caracterizada por perda progressiva de células foliculares, que são substituídas por tecido adiposo. A deficiência do hormônio tireoideano compromete o crescimento do pelo (fase anagênica do folículo piloso). Não causa prurido, no entanto, este sinal pode estar associado a infecção secundária por bactérias, *Malassezia* spp., demodicose e seborreia (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2017).

O hiperadrenocorticismos, define-se pelo excesso de glicocorticoides na corrente sanguínea, apresentando várias sintomatologias decorrentes dos efeitos gliconeogênicos, imunossupressores, antiinflamatórios e catabólicos do glicocorticoide em vários sistemas orgânicos (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2017). A ação dos corticosteroides é inibitória à divisão celular e síntese de DNA, diminuindo a síntese do colágeno pelos fibroblastos cutâneos, suprimem a mitose folicular e a fase anagênica e, causam supressão imunopática local, predispondo a infecções secundárias (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2017).

Mais de 90% das otites bilaterais de curso crônico ou recorrente são causadas por dermatite atópica ou alergia alimentar em cães. Sinais estão relacionados ao prurido e inflamação em outras áreas do corpo (ROSSER, 2004). Griffin e DeBoer (2001) afirmaram que até 55% dos caninos com dermatite atópica apresentam otite externa concomitante. Em 80% dos casos de alergia alimentar os animais apresentam otite externa (ROSSER, 1993).

Os fatores perpetuantes impedem a resolução da otite, pois agravam e prologam o tempo da resposta inflamatória mesmo que os fatores primários não estejam mais presentes. Por esse motivo, é importante identifica-los para obter melhores resultados no tratamento. Esses fatores incluem a contaminação por outros microrganismos, entre eles as infecções bacterianas, infecções fúngicas, otite média, hipersensibilidades de contato, fibrose e calcificação, excesso de dobras cutâneas, otite média e tratamentos inadequados (GOTTHELF, 2007; NOBRE et al., 2001; HARVEY; HARARI; DELAUCHE, 2004).

Existe também os fatores predisponentes, que estão relacionando principalmente a anatomia e fisiologia do conduto auditivo, tornando o animal mais suscetível a alterações primárias. Alterações como estenose do canal, excesso de pelo e de produção de cerumen, traumas, granulação excessiva do tecido, tumor, posicionamento e tamanho de orelhas são fatores predisponentes (WHITE, 1999; HARVEY; HARARI; DELAUCHE, 2004).

Não há evidências de predisposição sexual ou idade, no entanto, alguns autores relatam maior ocorrência nas raças Basset Hound, Dachshund, Cocker Spaniel, Shih-tzu, Caninche, Pastor Alemão, Pastor de Shetland, Jack Russel Terrier, Shar Pei e Collie. Acreditam que a maior observação de casos nessas raças aconteça por uma questão de variações climáticas regionais, relacionando o aumento da produção de cerúmen ao aumento da temperatura (CHEN; HILL, 2005; NARDONI; CORAZZA; MANCIANTI, 2008).

Os microrganismos comumente isolados de amostras provenientes do conduto auditivo são *Staphylococcus spp* e *Malassezia pachydermatis* (GOTTHELF, 2007). *Malassezia spp.* é o microrganismo facilmente encontrado na pele e ouvido dos cães, pois é um agente oportunista e por isso, promove perpetuação da doença quando ocorre alteração na microflora auricular (CH et al., 2011; BUDGEN, 2012). *Malassezia spp.* pode ocasionar doença em diversas espécies, além do cão e gato, como por exemplo em porcos, ursos, primatas, furões, cavalos, raposas, aves, roedores e lagomorfos (GUILLOT; BOND, 1999; GALUPPI; TAMPIERI, 2008).

Malassezia spp. faz parte da microflora do conduto auditivo dos cães. As alterações dos fatores intrínsecos e extrínsecos, promovem a multiplicação da levedura nesse microambiente, por consequência, alteram a relação de comensalismo para parasitismo (NOBRE et al.,1998).

Existem 12 espécies de *Malassezia sp.* (CAFARCHIA; OTRANTO, 2008), são caracterizados por serem lipofílicos, conseguem aproveitar o lipídio como fonte de carbono (GUÉHO et al., 1996), no entanto, a *Malassezia pachydermatis* diferencia-se das demais espécies por não ser lipodependente, devido a isso é frequentemente encontrada no ambiente auricular (GUILLOT; BOND, 1999; CHEN; HILL, 2005).

Malassezia spp. possui formato oval, assemelha-se ao formato de um amendoim, sua reprodução ocorre por gemulação unipolar. Possui tamanho médio de 4 a 5 micrometros de comprimento e de 2 a 3 micrometros de largura, multilamelar e internamente a parede celular é enrugada (GUILLOT; BOND, 1999; SCOOT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

Da Silva Nascente et al. (2010) afirmaram que a *M. pachydermatis* pode ser encontrada em animais hígidos, pois este microrganismo faz parte da microbiota do conduto auditivo. Essa espécie tem a característica de ser lipofílico, possui capacidade de crescer em ágar Sabouraud sem a necessidade de ácidos graxos de cadeia longa, a uma temperatura entre 31° e 45° (SCHLOTTFELD et al., 2002).

A presença do fungo foi observada em outros locais, além do conduto auditivo de cães e gatos, como na região retal, interdigital, sacos anais e em vagina. Os sinais comuns a esta infecção foram, prurido, alopecia, liquineficação, eritema, hiperpigmentação (RHODES, 2005; MELLO et al., 2010).

Alguns fatores predispõe o crescimento deste microrganismo, dentre eles, hipersensibilidades, doenças alérgicas (Dermatite Alérgica a Pica de Ectoparasitas, atopia), doenças parasitárias, doenças bacterianas, doenças endócrinas (Diabetes *Mellitus*, hiperadrenocorticism), como também as doenças virais que deprimem o sistema imunológico (CAFARCHIA; OTRANTO, 2008; DE MELLO MARASCHIN et. al., 2008).

A *Malassezia sp.* pode ocasionar otite média a partir da otite externa crônica, por meio da ruptura da membrana timpânica (ROSSER, 2004), o que torna essencial a avaliação desta membrana antes mesmo de instituir um tratamento, pois a administração de medicamentos tópicos podem causar ototoxicidade (COLE, 2004).

3.2.2 Patogenia

Malassezia spp. se adere a epiderme e produz o zimogênio, ativando a cascata do complemento, facilitando a multiplicação da levedura, por alteração da barreira epidérmica e expondo a antígenos. Por meio da ação das lipases e fosfolipases ocorre a quebra dos lipídeos e fosfolipídios, formando o ácido araquidônico, resultando em processo inflamatório local que favorece a penetração da levedura ao tecido (MAZZEI et al., 2002).

Segundo Santin et al. (2014), a patogenia dessa doença não está elucidada, e relatam maior susceptibilidade em animais imunodeprimidos ou associado a outras enfermidades, que predispõe alterações no microambiente do conduto auditivo como aumento da temperatura, da umidade e alterações na produção de cerúmen, favorecendo a multiplicação da levedura e alterando a relação de forma comensal para parasitária ou patogênica.

3.2.3 Sinais clínicos

Na avaliação física do animal são observados sinais clínicos da otite externa como eritema, prurido, descamação, edema, secreção, alopecia no pavilhão auricular, otomatomas e alterações de posicionamento de cabeça. Animais diagnosticados com otite média, apresentam, disacusia e sensibilidade dolorosa à palpação em região de bula timpânica e da articulação tempero-mandibular. Exames complementares são fundamentais para identificação do agente e para escolha da terapia adequada (HARVEY; HARARI; DELAUCHE, 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

3.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da otite externa acontece por meio da anamnese, sendo fundamental a realização de exames complementares como avaliação por otoscópio, citologia auricular, cultura e antibiograma, radiografia e biópsia. É possível realizar a identificação do agente infeccioso causador de otite externa por meio da citologia auricular, sendo um método de fácil execução e pode ser incluso na rotina clínica do médico veterinário (MURPHY, 2001; ANGUS, 2004).

A solicitação conjunta dos exames de citologia e cultura fornecem resultados precisos, aumenta a eficiência para diagnóstico do agente causal (ANGUS, 2004).

3.2.5 Tratamento

A otite externa não apresenta risco de morte ao animal, porém causa desconforto, pois é considerada uma infecção dolorosa. Dessa maneira, o objetivo do tratamento é controlar a inflamação, a infecção e promover bem-estar ao paciente pela ação analgésica (MOTA et al., 2000; GOTTHELF, 2007).

A eficácia do tratamento depende principalmente da identificação correta do agente causal, por meio da realização de exames laboratoriais. O tratamento pode ser sistêmico ou tópico mais eficaz por tratar de uma infecção local. A maioria dos medicamentos são compostos pela associação de glicocorticoide, antifúngico e antibiótico, porque a causa dessa patologia raramente é apenas fúngica (KISS; RADVÁNYI; SZIGETI, 1997). A prescrição de corticosteroides é utilizada em casos de edema e estenose do canal, para diminuição do prurido e inflamação (ROSYCHUK; LUTTGEN, 2005; GOTTHELF, 2007).

Dentre os antibióticos usados para o tratamento de otite, têm-se utilizado fármacos do grupo aminoglicosídeos (gentamicina, neomicina, polimixina B), porém apresentam potencial de ototoxicidade, devendo ser usados com cautela em animais que apresentam ruptura da membrana timpânica (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; GOTTHELF, 2007; LEITE, 2008)

No caso de otite externa fúngica, o tratamento tem sido responsivo ao uso de miconazol 1% ou cetoconazol. Há relatos de que a associação da gentamicina ao clotrimazol e a betametasona, promovem boa ação no controle de infecções causadas por *Malassezia spp.* e bactérias (ROSYCHUK; LUTTGEN, 2005). Outros antifúngicos também podem ser utilizados por via tópica no tratamento de *Malassezia spp.* como a piramicina, nistatina, tiabendazol, hexidine (MACHADO; APPELT; FERRERO, 2004).

Os medicamentos sistêmicos não são eficazes devido ao acúmulo de cerúmen no conduto, sendo assim importante o uso do ceruminolítico como adjuvante ao tratamento (THOMAS, 2006; GUARDABASSI; GHIBAUDO; DAMBORG, 2010).

3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

3.3.1 Histórico

A terapia fotodinâmica antimicrobiana é um tratamento minimamente invasivo que ocorre por meio da interação entre as moléculas do fotossensibilizador, da radiação de luz e do oxigênio, desencadeando dois tipos distintos de respostas que proporcionam a morte da célula microbiana. Esta terapia tem sido direcionada ao tratamento de doenças neoplásicas principalmente as de origem cutânea e no tratamento de doenças microbianas (MELLO et al., 2011; WEISS et al., 2012).

Desde a antiguidade, no Egito, buscava-se opções de tratamento de doenças, utilizando-se como terapia produtos oriundos das plantas, resultado das reações promovidas pela luminosidade. Em 1901, Niels Finsen, publicou o livro com o título “Phototherapy”, onde foi descrito a utilização da luz no tratamento de patologias dermatológicas como o *lupus vulgaris*. Este mesmo cientista recebeu o prêmio Nobel de Medicina pelo uso dessa terapia no tratamento de doenças (ACKROYD et al., 2001).

Em 1903, Von Tappeiner e Finsen Raab iniciaram as pesquisas sobre a utilização do corante eosina associado a luz no tratamento de tumores em pele. Alguns anos depois, em 1908, foi realizado novos estudos com o uso de fotossensibilizadores, surgindo a fotoquimioterapia, conhecida como Terapia Fotodinâmica antimicrobiana, oriundo do inglês Photodynamic Therapy (PENG; MOAN; NESLAND, 1997). Durante um experimento observaram o efeito letal da associação da luz associado ao corante de acridina sobre a cultura de *Paramecium* spp. (protozoário), entretanto, também observaram a possibilidade de toxicidade para as células do hospedeiro (ACKROYD et al., 2001).

Em 1924, o cientista Policard observou a reação de fluorescência em tumores pré-irradiados com substância de porfirina, em seguida, expostos a lâmpada de Wood. As pesquisas prosseguiram e constataram que as porfirinas tinham predileção por células neoplásicas (ACKROYD et al., 2001; KESSEL, 2004).

Em 1960, houveram novos relatos sobre o uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana, principalmente na área de dermatologia em humanos. A partir dos novos resultados experimentais, começaram a desenvolver aparelhos laser mais adequados, cujo fluxo de luminosidade era ideal para uso específico em cada órgão como pulmão, bexiga, esôfago e outras cavidades corporais (KESSEL, 2004).

Na década de 70, o pesquisador Thomas Dougherty avançou os estudos com o uso da TFD, utilizando compostos derivados de hematoporfirinas como agente fotossensibilizador (FS) no tratamento de pacientes oncológicos. Nesta mesma época foram descritos casos de resistência microbiana aos antibióticos, anos após a descoberta da penicilina, tornando a TFDa uma alternativa para o controle de infecções (KESSEL, 2004; WILSON; PATTERSON, 2008; MAISCH et al., 2011).

Em 1980, teve início experimentos com o uso do TFDa na medicina veterinária, como alternativa de tratamento em pacientes oncológicos nas espécies canina e felina. Buscavam-se por meio dessas pesquisas resultados que fossem satisfatórios para as espécies animais e para continuidade do uso em humanos (CHELI et al., 1984).

As pesquisas em relação a esta terapia ainda continuam, e novos relatos tem demonstrado resultados satisfatório sobre utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana em relação ao controle de infecções, (RIBEIRO et al., 2013; ALZAMORA FILHO et al., 2018). Além do tratamento de infecções, a TFDa revelou ação analgésica sobre lesões teciduais (MOURA; BRANDÃO; BARCESSAT et al., 2018).

3.3.2 Mecanismo de ação

A Terapia Fotodinâmica antimicrobiana ocorre através da combinação de fotossensibilizadores não tóxicos, luz laser vermelho (660nm) e oxigênio molecular, a associação entre eles promovem a eliminação de microrganismos patogênicos (GAD et al., 2004; ZHU; FINLAY, 2008; MELLO et al., 2011).

As respostas desencadeadas, são reações classificadas como dos tipos I ou II. Reações do tipo I são oriundas da interação de radicais livres, resultando em reação de oxidação de diversas biomoléculas. Nas reações do tipo II, há

formação de uma molécula identificada como oxigênio singleto, a partir da transferência de energia do fotossensibilizador de um estado excitado para o estado fundamental do oxigênio (ZHU; FINLAY, 2008).

O oxigênio singleto originado pela TFDa, causa toxicidade aos microrganismos patogênicos através de reações bioquímicas promovendo a ruptura da membrana celular e destruindo algumas organelas citoplasmáticas, lisossomos e mitocôndrias. Este oxigênio advém de uma reação inespecífica, reagindo com os compostos insaturados, tornando os componentes celulares susceptíveis à sua ação. A primeira barreira para atuação do oxigênio singleto é a membrana celular, sendo ela composta por lipídeos insaturados que serão danificados e ocorre inviabilidade celular. A formação de espécie reativa de oxigênio (EROS) pode ocorrer pelos hidroperóxidos resultantes das reações catalíticas (BERTOLONI et al., 1987; CARRÉ et al., 1999; PEREIRA et al., 2011).

Não existe uma reação específica entre a formação de EROS com a molécula orgânica, dessa forma, qualquer macromolécula pode ser sensível a ação do TFDa. Assim, não há resistência do microrganismo a ação da terapia e por isso tem apresentado bons resultados quanto ao tratamento de doenças fúngicas, bacterianas e virais. A TFDa se torna eficaz quando o tempo de irradiação da luz, o comprimento da onda estão ajustados ao uso, pois o oxigênio singleto possui meia-vida curta (CARRÉ et al., 1999; DEMINOVA; HAMBLIN, 2005).

O resultado da ação da terapia está ligado ao local de ação do fotossensibilizador na célula (SILVA, 2018). Straten et al. (2017) em um estudo de comparação da ação da TFD, perceberam que o violeta cristal teve melhor resposta em seu experimento em relação a morte celular de microrganismos quando comparado a ação da luz laser com a pré-irradiação pelo azul de metileno. O azul de metileno localiza-se no citosol e lisossomos, já o violeta cristal na mitocôndria da célula.

Uma das características da TFDa é que o aparelho laser é unidirecional, possibilitando limitar a ação apenas sobre áreas lesionadas preservando o tecido íntegro. É bem tolerada, porém como efeito adverso à utilização inadequada pode promover dor ardente devido ao calor produzido pela irradiação (DEMINOVA; HAMBLIN, 2004; WARREN et al., 2009; AIRTS et al., 2010; DOVIGO et al., 2011).

A utilização dessa terapia não possui efeito tóxico e nem cumulativo, o que permite a repetição de uso quantas vezes for necessário. Na medicina humana esta terapia tem sido utilizada em idosos, como tratamento alternativo (CAPELLA; CAPELLA, 2003).

3.3.3 Fotossensibilizadores

O uso do fotossensibilizador (FS) é indispensável à terapia, podendo ser administrado por duas vias, a intravenosa, geralmente utilizada para o tratamento de neoplasias e a via tópica, para o tratamento de lesões cutâneas (MOURA; BRANDÃO; BARCESSAT, 2018).

O sucesso dessa terapia depende de fatores relacionados principalmente a concentração do fotossensibilizador, que deve ser mínima e para produzir efeito citotóxico apenas nas células alvo, propiciando segurança ao paciente. Outras características importantes em relação ao FS estão relacionadas a pureza, hidrossolubilidades, fácil metabolização e eliminação rápida, ausência de reações adversas ao organismo do hospedeiro bem como alergias. Segundo Longo e Azevedo (2010), quanto mais próximo for a banda de absorção do agente fotossensibilizador ao comprimento de onda do laser, maior é a profundidade de penetração, melhor e mais eficiente se torna a terapia contra os microrganismos.

As substâncias fotossensibilizadoras mais estudadas e utilizadas são os xantenos halogenados (rosa bengala), os fenotiazínicos (azul de toluidina e azul de metileno), acridinas e conjugados de clorina (WAINWRIGHT, 2002; CHAN et al., 2003; DEMINOVA; HAMBLIN, 2005; DOVIGO et al., 2011).

O azul de metileno (AM) é um corante químico, classificado como fenotiazínico, junto com azul de toluidina são os mais utilizados na TFDa. Possui peso molecular de 319,86 g/mol na forma anidra (sem água). É uma solução aquosa em formato de monômeros, dímeros e agregados maiores em solução de grande concentração. A banda de absorção entre 500 e 700, porém os picos máximos de absorção ocorrem em 609 e 668 nm, podendo variar devido a alguns fatores como o tipo de solvente e concentração do FS na solução (SOUKOS et al., 1996; TARDIVO et al., 2005).

O AM tem sido bastante utilizado na rotina laboratorial como corante histológico, muito importante na área da microbiologia e farmacologia. Outra característica química deste corante, é possuir uma substância lipofílica, carga positiva o que explica a atratividade seletiva pelas mitocôndrias que possuem carga negativa (GABRIELLI et al., 2004).

As pesquisas demonstram que a TFDa possui ação eficaz no tratamento de diversas patologias causadas por microrganismos. Autores relatam sobre o sucesso da terapia com a utilização de corantes como azul de metileno, ativado por luz, cujas reações resultam em efeito antimicrobiano, principalmente contra bactérias, fungos e protozoários (DOBSON & WILSON, 1992; SOUZA et al., 2010; TANAKA et al., 2010; PRATES et al., 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Hospital Veterinário da UESC e na Pet Clin – Clínica Veterinária 24h, localizada na cidade de Itabuna, Bahia. Obteve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) sob protocolo nº 011/19.

4.1 Animais

Foram selecionados 14 animais (27 orelhas) de raças distintas e que apresentavam sinal clínico de otite, divididos em dois grupos, num total de 7 animais cada. Todos passaram por avaliação clínica, com observação de produção excessiva de cerúmen, eritema no meato acústico, prurido e odor. Com o uso do otoscópio para diagnóstico, visualizou-se a integridade da bula timpânica. Dentre os 14 animais avaliados, 13 possuíam otite externa bilateral e apenas 1 era unilateral. O tratamento foi instituído por orelha. Os animais de ambos os grupos não apresentaram nenhuma outra alteração física digna de nota.

4.2 Colheita e avaliação das amostras

Após exame clínico otológico no animal, foi realizado a colheita do cerúmen no conduto auditivo externo para avaliação citológica. Utilizou-se swab estéril para colheita do material, e em seguida foi realizado esfregaço, rolando o swab com o conteúdo sobre a lâmina e corada por meio do kit panótico para avaliação em microscópio óptico. A identificação de *Malassezia* spp. foi feita pela objetiva de 40x e a contagem da levedura pelo aumento de 100x (MAGALHÃES et al., 2017).

Micromorfologicamente, a levedura pode ser observada como células isoladas ou em grupos. A citologia auricular foi avaliada percorrendo toda a lâmina e contando as células semelhantes a *Malassezia* spp. em um total de 10 hipocampos. Foram considerados animais saudáveis, aqueles cuja gama de *Malassezia* spp. foi <10 leveduras por hipocampo, o que apresentaram número >10 leveduras por hipocampo, foram considerados animais doentes, diagnosticados com otite por malasseziose (NOBRE et al., 1998; MELCHERT; JEFERY; GIUFFRIDA, 2011).

O experimento foi dividido em dois grupos aleatórios de tratamento, com sete exemplares em cada grupo:

- Grupo 1: foi realizado o tratamento utilizando o ceruminolítico (cada 10 mL contendo Ácido Salicílico 0,11g; Ácido Lático a 90% 2,98g, Essência Herbal 0,01g- veículo q.s.p 100mL) pela via tópica, 24/24h, na dose de 4 gotas por conduto auditivo, durante 7 dias. Fez-se associação ao antimicrobiano com composição de a cada 100g contendo Gentamicina 300mg; Valerato de Betametasona 122mg; Clotrimazol 1.000mg), em uso externo, na dose de 4 gotas/conduto auditivo/15kg peso vivo, pela via tópica, 12/12h, durante 7 dias (JACOBSON, 2002; TILLEY; SMITH JR, 2003; PEANO; GALLO, 2008).
- Grupo 2: os animais desse grupo foram tratados por meio da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa), com o laser de diodo com 0,1W de potência, área do *spot* de 0,028cm², irradiação a cada 48h, num total de três sessões. Foi realizado a aplicação de 2mL da solução de azul de

metileno a 0,01% em cada conduto auditivo, com o tempo de pré-irradiação de 3 min, e após esse período foi retirado o excesso do fotossensibilizador com auxílio de gaze limpa e seca (DE OLIVEIRA et al., 2018). Determinou-se quatro pontos no pavilhão auricular do animal, sendo realizado a irradiação com o laser vermelho ($\lambda = 660\text{nm}$), a energia de 9 J/ponto de aplicação, a densidade energética de $321,4 \text{ J/cm}^2$, potência do equipamento de 100mW, com tempo de exposição de 90 segundos (Fig. 1).

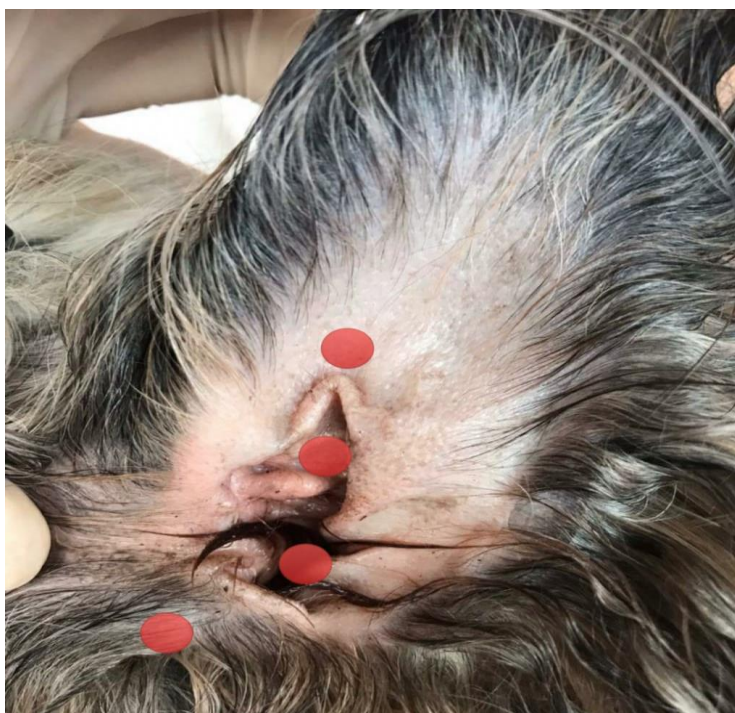


Figura 1 - Locais dos pontos de irradiação com laser de diodo ($\lambda = 660\text{nm}$, 100mW) no conduto auditivo dos cães

Todos os animais foram avaliados num intervalo de 48h após cada sessão realizada, por meio da citologia auricular. O patologista analisava as lâminas sem quaisquer informações, tanto sobre a clínica do animal, quanto ao tratamento realizado naquele indivíduo, tornando o experimento duplo-cego. Todos os animais utilizaram colar elisabetano durante o período da terapia.

4.3 Análise estatística

A avaliação estatística para verificação dos dados dentro de cada grupo, nos diferentes momentos, foi realizada pelo teste não paramétrico de Friedman. A análise comparativa entre os tempos de tratamento para cada terapia foi feita pelo teste de Mann-Whitney. Os dados foram avaliados pelo programa estatístico SPSS vs 13.0, considerando o grau de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação física

Os animais apresentavam idade entre 9 meses e 11 anos. Durante a inspeção visual do conduto auditivo, todos possuíam orelhas caídas e 10 animais continham pelos dentro do conduto. Dentre os 14 animais avaliados, 9 tiveram otite recorrente (5 animais do grupo 1 e 4 animais do grupo 2) e haviam sido tratados empiricamente, sem confirmação por exames.

Tabela 1- Descrição dos sinais clínicos avaliados nos animais do grupo1, tratamento convencional.

Paciente	Sinais clínicos tratamento convencional					
	Eritema	Prurido	Odor	Secreção	Edema	Liquenificação
A1	+	+	+	+	+	-
A2	+	+	+	+	+	+
A3	+	++	+	+	+	+
A4	+	++	+	++	+	+
A5	+	+	+	+	+	-
A6	+	++	+	++	+	+
A7	+	++	+	++	+	+

(+) para alteração leve; (++) para alteração intensa; (-) para ausência do sinal.

Tabela 2- Descrição dos sinais clínicos avaliados nos animais do grupo 2, tratamento TFDa.

Paciente	Sinais clínicos					
	Eritema	Prurido	Odor	Secreção	Edema	Liquenificação
A1	+	++	+	++	+	-
A2	+	++	+	++	-	-
A3	+	++	+	++	+	+
A4	-	+	+	++	-	-
A5	+	++	+	+	+	-
A6	+	+	+	+	-	-
A7	+	++	+	++	+	+

(+) para alteração leve; (++) para alteração intensa; (-) para ausência do sinal.

Todos os animais apresentavam alterações clínicas como eritema (92,8%), prurido (100%), odor (100%), secreção (100%) e edema (78,5%) e liquenificação (50%).

Realizou-se a palpação externa para avaliação de dor onde nenhum animal apresentou sensibilidade da integridade da bula timpânica e não foi observada nenhuma lesão na membrana timpânica.

Após início do tratamento todos os animais apresentaram melhora clínica, tanto os animais do grupo 1 quanto os do grupo 2. Visualmente foi notado redução do edema, diminuição da quantidade de cerúmen, áreas menos eritematosas, como também foi relatado pelos tutores a diminuição do prurido nos animais, todos esses sinais percebidos após 48h do início do tratamento. É possível perceber nas figuras 2 e 3 a evolução clínica mediante a terapia instituída em um paciente de cada grupo.

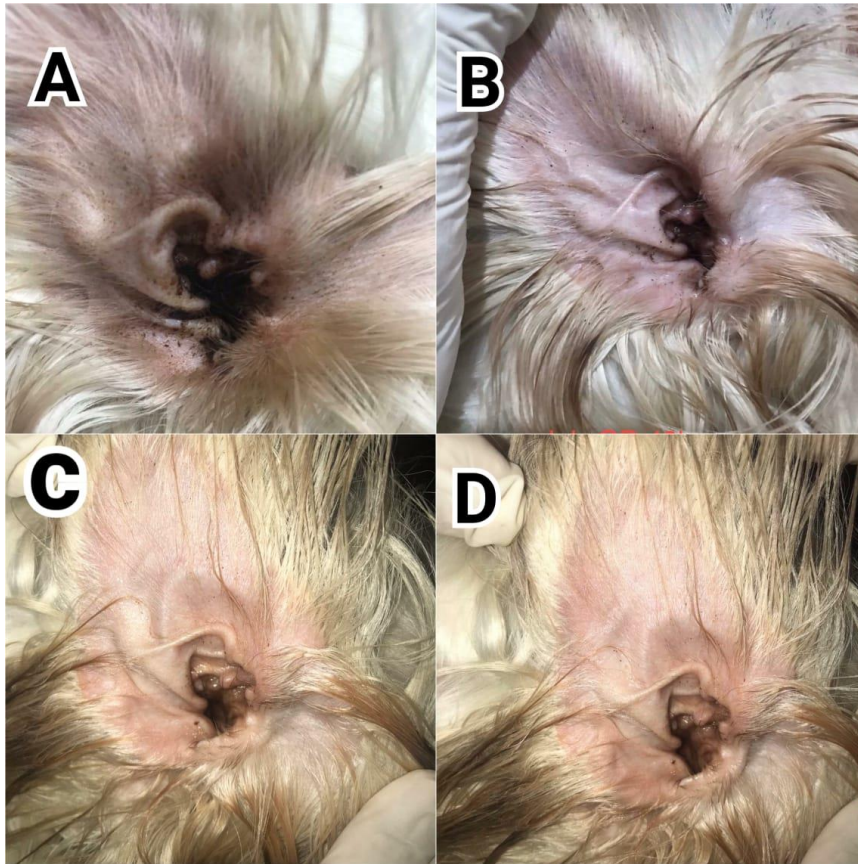


Figura 2- Avaliação da evolução clínica ao tratamento convencional, grupo 1. (A: antes de iniciar o tratamento; B: após 48h do tratamento; C: após 96h de tratamento; D: após 144h de tratamento)



Figura 3- Avaliação da evolução clínica ao tratamento TFDa, grupo 2. (A: antes de iniciar o tratamento; B: após 48h do tratamento; C: após 96h de tratamento; D: após 144h de tratamento)

5.2 Avaliação estatística

Além da melhora clínica visual, houve diminuição significativa da presença de *Malassezia spp.* nos condutos auditivos. Este dado foi obtido através da avaliação citológica, onde as coletas ocorreram num intervalo de 48h entre uma sessão e outra.

Ambas as terapias foram satisfatórias ao controle da infecção tanto para os animais do grupo 1 (tratamento convencional) quanto o grupo 2 (laser). Os resultados foram semelhantes quanto a eficiência, havendo diferença estatística ($p < 0,05$) (Tabela 3). Esta análise foi realizada para poder avaliar a eficiência dos tratamentos dentro de cada grupo, pelo teste de Friedman. Foi observado que, dentro dos grupos os dois tratamentos foram eficientes independentes da orelha, proveram redução significativa da quantidade de fungos encontrados no início

do tratamento, culminando com a regressão da infecção, melhora dos sinais clínicos, proporcionando bem-estar aos animais.

Tabela 3- Análise estatística e análise intra-grupo utilizando teste Friedman entre os grupos da terapia convencional e o grupo da terapia fotodinâmica antimicrobiana.

	Tratamento			
	Convencional		Tratamento TFDa	
	OE	OD	OE	OD
Friedman qui-quadrado	16,8	17,4	18,6	13,4
Graus de liberdade	3	3	3	3
p-Valor	0,001	0,001	0,000	0,004

Entretanto, quando realizado a comparação entre os tratamentos, não se observa diferença estatística entre eles (Tabela 4), tanto o tratamento TFDa quanto o tratamento Convencional, são eficientes de forma equivalente. Foi realizado a avaliação dos dados em relação ao tempo, comparando os resultados entre os grupos. Houve redução da população de leveduras em todos os intervalos de tempo, no entanto, não foi observado diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 4- Análise estatística nos tempos 0, 48, 96 e 144 horas, entre os grupos de tratamentos Convencional e TFDa, pelo teste de Mann-Whitney.

	Tratamento Laser- OE				Tratamento Convencional- OD			
	0H	48H	96H	144H	0H	48H	96H	144H
Mann-Whitney U	13,000	20,000	17,500	20,000	16,000	7,000	5,000	14,000
Wilcoxon	41,000	48,000	45,000	48,000	44,000	35,000	32,000	42,000
Z	-1,469	-,575	-,896	-,576	-,714	-2,003	-2,289	-1,000
p-Valor	,142	,565	,370	,564	,475	,045	,022	,317
p- Ajustado	,165	,620	,383	,620	,534	,051	,022	,366

6. DISCUSSÃO

Este estudo permitiu avaliar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre a infecção fúngica, observado pelos sinais clínicos e microscópicos.

A otite externa fúngica é uma doença que apresenta alta casuística na rotina clínica veterinária, pois *Malassezia* spp. é um fungo facilmente encontrado principalmente na pele dos animais domésticos. Como foi descrito não houve classificação por idade nesse experimento e nota-se acometimento em diferentes faixas etárias. Alguns autores não caracterizam a idade como um fator etiológico e os sinais clínicos encontrados corroboram com as descrições da literatura (CHEN; HILL, 2005; RHODES, 2005; FERREIRA et al, 2008; NARDONI et al., 2008).

Neste estudo todos os animais apresentaram orelhas com característica pendular, tal característica anatômica se torna um fator de predisposição, pois confere ao conduto auditivo um ambiente favorável para multiplicação de *Malassezia* spp. (ETTINGER; FELDMAN, 2004). Girão (2003) apontaram a mesma característica anatômica como fator predisponente.

Em relação ao diagnóstico, existem vários métodos de identificação do agente. Para Breitwieser (1997), o exame direto pode resultar em falso negativo, sendo o cultivo o melhor diagnóstico. Maraschin et al. (2008) concorda em que o cultivo é um bom método de identificação. No entanto, Campos (2011) afirma que o exame citológico do ouvido apresenta grande probabilidade de diagnóstico, além de ser um método simples, rápido e principalmente de baixo custo. Por esse motivo essa técnica foi escolhida para avaliação neste trabalho.

O presente trabalho corrobora com a descrição de Ginel et al (2002), onde o número elevado de leveduras quantificadas pela avaliação citológica, correlaciona com as alterações clínicas avaliadas nos animais acometidos pela otite externa, como prurido, edema, odor, eritema.

É comum na rotina clínica a prescrição medicamentosa por meio da percepção dos sinais, descartando a realização de exames. O tratamento de sinais pode ser temporário e se não for identificado os fatores predisponentes e perpetuantes da doença ela se torna recorrente, podendo se tornar crônica e

predispor o animal a doenças mais graves (NASCENTE, 2001; BRISAC, 2009; LEITE, 2008).

Estudos comprovam que o uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos tem promovido resistência aos microrganismos, e assim um aumento de falhas no tratamento de algumas doenças. Por esse motivo, surge a necessidade de implementar novas terapias, mais eficientes e seguras ao paciente (MAISH et al., 2011).

A TFDa apresenta mais uma vantagem, pois não há seletividade em eliminar os microrganismos. Após uso da TFDa, Bevilacqua et al., (2011) afirmaram que esta terapia tem efeito positivo no controle de infecção fúngica causada por *Candida albicans*. O uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana tem sido muito utilizada, promovendo excelentes resultados no combate a infecções sem uso associado de antibiótico (CHAVANTES, 2009; ALZAMORA FILHO et al., 2018).

A escolha em utilizar o azul de metileno como agente fotossensibilizador, deveu-se a sua banda de absorção apresentar pico de 668nm, próximo ao valor do comprimento de onda de luz vermelha ($\lambda = 660\text{nm}$) do aparelho laser utilizado. Segundo Longo e Azevedo (2010), quanto mais próximos esses valores, melhores são os resultados esperados em relação ao controle microbiológico, pois melhor é a absorção da luz, corroborando com os resultados desse experimento.

Belhassen et al., (2017) avaliaram a segurança do AM em comparação ao uso da gentamicina no tratamento de otites, realizando aplicações intratimpânica, em Porquinho da Índia. Concluíram que o uso da gentamicina sem avaliação específica de bula timpânica, pode promover ototoxicidade aos animais, em decorrência deste fator, gerar também surdez, diferente do uso do azul de metileno, que observaram a ausência de ototoxicidade, sendo seguro o seu uso no conduto auditivo.

A associação de fatores como o comprimento da onda, densidade de energia e a concentração do fotossensibilizador são importantes para o sucesso da terapia (SOUKOS et al, 1996; BEVILACQUA; BRUNGNERA JUNIOR; NICOLAU, 2011), por esse motivo, observou-se neste trabalho que *Malassezia* spp. apresentou sensibilidade a TFDa, havendo redução da quantidade desses microrganismos no contudo auditivo dos cães.

A otalgia é também um sinal clínico característico da otite, principalmente de acometimento da porção média do ouvido e nenhum dos animais avaliados neste trabalho apresentou sensibilidade dolorosa à palpação em região de bula timpânica. Segundo Moura et al. (2018), a terapia fotodinâmica antimicrobiana além de controlar a infecção, tem ação de analgesia e modulação do processo inflamatório tecidual.

Nos trabalhos realizados por Nascente (2006) e Paula (2013), os dados de eficiência no tratamento de otite externa utilizando o cetoconazol em associação a outros fármacos foram semelhantes. Observaram o controle da infecção num intervalo de 21 dias, com 2 aplicações diárias do medicamento. Leite (2003) não observou bons resultados no tratamento de otite externa com o uso da nistatina. O presente trabalho demonstrou bom resultado no controle da infecção, conseqüentemente, a melhora clínica do paciente pela TFDa, foi menor número de sessões quando comparado ao tempo de tratamento pela terapia convencional.

Segundo Rosser (2004), as otites também são decorrentes de causas iatrogênicas, como o trauma no momento da limpeza, durante a aplicação de medicamentos, devido à falta de habilidade dos tutores em realizar os procedimentos. A terapia fotodinâmica antimicrobiana deverá ser realizada por profissional capacitado, o que permite o acompanhamento e realização correta da terapia, enquanto que no tratamento com a medicação tópica, nem sempre o tutor consegue realizar a terapia de forma adequada, ocasionando erros no tratamento prescrito pelo Médico Veterinário.

7. CONCLUSÃO

A TFDa teve efeito significativo na redução de microrganismos, conseqüentemente, foi observado o desaparecimento dos sinais clínicos, promovendo bem-estar aos animais. No entanto, existem poucos relatos desta terapia sobre a otite externa pela levedura, sendo necessário a realização de novas pesquisas para estabelecer um protocolo terapêutico. Nesta perspectiva, o trabalho demonstrou indícios positivos da TFDa, para o tratamento de otite externa causada por *Malassezia spp.* podendo torna-la uma alternativa ao tratamento convencional.

8. REFERÊNCIAS

ACKROYD, R., KELTY, C., BROWN, N., & REED, M. (2001). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, 74(5), 656.

ALZAMORA FILHO, F., CAVALCANTE, M. P., ROCHA, N. M. A., SOUZA, V. D. O. C., RIBEIRO, T. S., DE BRITO, T. M., & REIS, L. G. R. (2018). Utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana e fototerapia a laser no tratamento da dermatite interdigital infecciosa ovina. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, 16, 1-5.

ANGUS, J. C. (2004). Otic cytology in health and disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 34(2), 411–424.

BELHASSEN, S., ALZHRANI, M., NADER, M. E., GABOURY, L., SALIBA, I. (2017). Study of Methylene Blue Ototoxicity in the Guinea Pig. **Journal of clinical medicine research**, 9(11), 900.

BERTOLONI, G., ZAMBOTTO, F., CONVENTI, L., REDDI, E., & JORI, G. (1987). Role of Specific Cellular Targets in the Hematoporphyrin-Sensitized Photoinactivation of Microbial Cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, n. 5, p. 695–698.

BEVILACQUA, I. M., BRUGNERA JUNIOR, A., & NICOLAU, R. A. (2011). Ação do laser de baixa potência associado à substâncias fotoativadoras na redução de cândidas em meio bucal (Revisão da literatura). **IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**, 1925-8.

BLAKE, J., KEIL, D., KWOCKHA, K., PALMA, K., & SCHOFIELD, J. (2017). Evaluation of a single-administration ototopical treatment for canine otitis externa: a randomised trial. **Veterinary Record Open**, 4(1), e000219.

BREITWIESER, F. (1997). Results of bacteriologic and mycologic investigations of otitis media in dogs. **Tierärztliche Praxis**, v. 25, n. 3, p. 257-260.

BUGDEN, D. L. (2012). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. **Australian Veterinary Journal**, 91(1-2), 43–46.

CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. (2008). The pathogenesis of Malassezia yeasts. **Parassitologia**, v. 50, n. 1/2, p. 65.

CAMPBELL, J. J., COYNER, K. S., RANKIN, S. C., LEWIS, T. P., SCHICK, A. E., & SHUMAKER, A. K. (2010). Evaluation of fungal flora in normal and diseased canine ears. **Veterinary Dermatology**, 21(6), 619–625.

CAPELLA, M. A. M., CAPELLA, L. S. (2003). A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. **Journal of biomedical science**, v. 10, n. 4, p. 361-366.

CARRÉ, V., GAUD, O., SYLVAIN, I., BOURDON, O., SPIRO, M., BIAIS, J., ... GUILLOTON, M. (1999). Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 48(1), 57–62.

CH, R.S., CALLE, S., FÁLCÓN, N., PINTO, C. (2011). Aislamiento bacteriano em casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica. **Revta Investig. Vet. Perú** 22 (2): 161-166.

CHAVANTES, M. C. (2009). **Laser em Bio-medicina: princípios e prática**. São Paulo: Atheneu, 281p.

CHAN, W. M., LAM, D. S., WONG, T. H., LAI, T. Y., KWOK, A. K., TAM, B.S., LI, K.K. (2003). Photodynamic Therapy with Verteporfin for Subfoveal Idiopathic Choroidal Neovascularization: One-Year Results from a Prospective Case Series. **Ophthalmology**, v. 110, n. 12, p. 2395–2402.

CHELI, R., ADDIS, F., MORTELLARO, C. M., FONDA, D., ANDREONI, A., & CUBEDDU, R. (1984). Hematoporphyrin derivative photochemotherapy of spontaneous animal tumors: Clinical results with optimized drug dose. **Cancer Letters**, 23(1), 61–66.

CHEN, T.-A., HILL, P. B. (2005). The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary Dermatology**, 16(1), 4–26.

COLE, L. K. (2004). Otoscopic evaluation of the ear canal. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, 34(2), 397-410.

COUTINHO, S. D. (2003). Malasseziose: a necessidade de se pesquisar as espécies lipodependentes e, medicina veterinária. **MEDVEP. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. p. 70-73.

CRUZ, M. D. S. (2018). **Tratamento de otites externas caninas com mel manuka 40%: estudo de casos (Master's thesis)**. 55 f. Dissertação (Mestrado Integrado de Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lusófona de Humanidades e Tecnologia.

CUSTÓDIO, C. D. S. (2019). **Otite externa em cães: uma revisão de literatura**. 43f. TCC (Graduação em Medicina Veterinária) Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Santa Catarina.

DA SILVA MACHADO, M. L., APPEL, C. E., FERREIRO, L. (2004). Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32(3), 225-232.

DA SILVA NASCENTE, P., SANTIN, R., MEINERZ, A. R. M., MARTINS, A. A., MEIRELES, M. C. A., MELLO, J. R. B. (2010). Estudo da frequência de *Malassezia pachydermatis* em cães com otite externa no Rio Grande do Sul. **Ciência Animal Brasileira**, 11(3), 527-536.

DE MELLO MARASCHIN, M., SPADER, T., MARIO, D. A. N., ROSSATO, L., LOPES, P. G. M. (2008). Infecções causadas por *Malassezia*: novas abordagens. **Saúde (Santa Maria)**, 34(1 e 2), 04-08.

DE OLIVEIRA, B. P., CÂMARA, A. C., FERREIRA, G., NETO, S., DA SILVA, P., & AGUIAR, C. M. (2018). Photodynamic Therapy: A Novel Ally for Surgical Endodontic Treatment? Case Report. **Journal of lasers in medical sciences**, 9(4), 288–290.

DE OLIVERIA, B. P., AGUIAR, C. M., & CÂMARA, A. C. (2014). Photodynamic therapy in combating the causative microorganisms from endodontic infections. **European journal of dentistry**, 8(03), 424-430.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. (2005). Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329–2335.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. (2004) Photodynamic therapy targeted to pathogens. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 245-254.

DOBSON, J., WILSON, M. (1992). Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Archives of Oral Biology**, 37(11), 883–887.

DOVIGO, L. N., PAVARINA, A. C., CARMELLO, J. C., MACHADO, A. L., BRUNETTI, I. L., BAGNATO, V. S. (2011). Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. **Lasers in surgery and medicine**, 43(9), 927-934.

ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. (2004). **Tratado de Medicina Veterinária: Moléstia do cão e do gato**. 5. ed. vol 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

GABRIELLI, D., BELISLE, E., SEVERINO, D., KOWALTOWSKI, A. J., & BAPTISTA, M. S. (2004). Binding, Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, 79(3), 227.

GAD, F., ZAHRA, T., HASAN, T., & HAMBLIN, M. R. (2004). Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 48(6), 2173-2178.

GALUPPI, R., TAMPIERI, MP. (2008). Epidemiology and variability of *Malassezia* spp. **Parasitologia**, 50 (1-2), 73- 76.

GINEL, P. J., LUCENA, R., RODRIGUEZ, J. C., ORTEGA, J. (2002). A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. **Veterinary Dermatology**, 13(3), 151–156.

GIRÃO, D. M. (2003) **Aspectos epidemiológicos, fenotipagem e métodos de estocagem de *Malassezia pachydermatis* isolados do canal auditivo de cães**. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

GOMES, L. M., ALLENDORF, S.D. (2018). Otite externa em cães e gatos. **Veterinary & Science**. VetPet n.42, p.56- 58.

GOTTHELF, L. N. (2000). Factors that predispose the ear to otitis externa. In: **Gotthelf small animal ear diseases an illustrated guide**. 1. ed. Philadelphia.

GOTTHELF, L. N. (2007). **Doenças do ouvido em pequenos animais**. Editora Roca. GOTTHELF, L. N. **Small Animal Ear Diseases-E-Book: An Illustrated Guide**. Elsevier Health Sciences, 2004.

GRIFFIN C., DEBOER, D. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 81(3-4), 255–269.

GRIFFIN C.E. Otitis externa and otitis media. In: Griffin CE, Kwochka KW, MacDonald JM, editors. **Current veterinary dermatology: the science and art of therapy**. St. Louis: Mosby Year Book; 1993. p. 245–62.

GUARDABASSI, L., GHIBAUDO, G., DAMBORG, P. (2010). In vitro antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris–EDTA. **Veterinary dermatology**, v. 21, n. 3, p. 282-286.

GUÉHO, E., BOEKHOUT, T., ASHBEE, H. R., GUILLOT, J., VAN BELKUM, A., & FAERGEMANN, J. (1998). The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. **Medical mycology**, 36(1), 220-229.

GUILLOT, J., BOND, R. (1999). *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**, 37(5), 295–306.

HARVEY, R. G.; HARARI, J; DELAUCHE, A. J. (2004). Doenças de ouvido em cães e gatos. **Rio de Janeiro: Revinter**, 272 p.

HORST ERICH KONIG; HANS-GEORG LIEBICH. (2011). **Anatomia dos Animais Domésticos**. 4. ed. Porto Alegre: 2011,

JACOBSON, L.S. (2002). Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat: review article. **Journal of the South African Veterinary Association**, 73: 162

JERICÓ, M.M., ANDRADE NETO, J. P DE., KOGIKA, M.M. (2017). Tratado de Medicina interna de cães e gatos. Rio de Janeiro: Roca.

KESSEL, D. (2004). Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 1(1), 3–7.

KISS, G.; RADVÁNYI, S.; SZIGETI, G. (1997). New combination for the therapy of canine otitis externa: I Microbiology of otitis externa. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, n. 2, p. 51–56.

LEITE, C. A. L. (2008). Terapêuticas tópica e sistêmica: pele, ouvido e olho. **Manual De Terapêutica Veterinária**, v. 3, p. 168-179, São Paulo: Editora Roca.

LEITE, C. A. L.; ABREU, V. L. V.; COSTA, G. M. (2003). Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 102-104.

LIBERATO, J. A. DI DIO. (1999). **Tratado de Anatomia Aplicada**. 1. ed. São Paulo.

LONGO, J. P. F., DE AZEVEDO, R. B. (2010). Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas. **Archives of Oral Research**, 6(3).

MACHADO, M. L. S; APPELT, C.E; FERRERO, L. (2004). Dermatófitos e leveduras isoladas da pele de cães com dermatopatias diversas. **Acta Scientiae Veterinae**, v.32, p. 225- 232.

MAGALHÃES, N. R., MORAES, S. F. S., DRESCH, D., KATAOKA, A. (2017). Frequency of *Malassezia* spp. in dogs presenting external otitis. **Scientific Electronic Archives**, 10(6), 50-55.

MAISCH, T., HACKBARTH, S., REGENSBURGER, J., FELGENTRÄGER, A., BÄUMLER, W., LANDTHALER, M., RÖDER, B. (2011). Photodynamische Inaktivierung von multiresistenten Bakterien (PIB)–ein neuer Ansatz zur Behandlung oberflächlicher Infektionen im 21. Jahrhundert. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, 9(5), 360-367.

MAZZEI, C. R. N., LARSSON, C. E., GAMBALE, W., DE PAULA RODRIGUES, C., VALENTE, N. S. (2002). Malasseziose tegumentar canina: estudo clínico-epidemiológico retrospectivo de 92 casos (1989 a 1995), São Paulo, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, 5(3), 243-252.

MEDLEAU, L., HINILICA, K.D. **Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico**- São Paulo: Roca.

MELCHERT, A., JEFERY, A. B. S., GIUFFRIDA, R. (2011). Avaliações citológicas em otites caninas por *Malassezia* spp.: estudo retrospectivo. In: **Colloquium Agrariae. ISSN: 1809-8215**. p. 27-34.

MELLO, J. (2010). Estudo da frequência de *Malassezia pachydermatis* em cães com otite externa no Rio Grande do Sul. **Ciência Animal Brasileira**, 11(3), 527 - 536.

MELLO, R., MARTÍNEZ-FERRER, J., ALCALDE-ARAGONÉS, A., VAREA, T., ACERETE, R., GONZÁLEZ-NÚÑEZ, M. E., ASENSIO, G. (2011). Reactions at interfaces: Oxygenation of n-butyl ligands anchored on silica surfaces with methyl (trifluoromethyl) dioxirane. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 24, p. 10129–10139.

MOTA, R. A., FARIAS, J. K. O., SILVA, L. B. G., LIMA, E. T., OLIVEIRA, A. A. F., MOURA, R. T. D. (2000). Eficácia do Otomax no tratamento da otite bacteriana e fúngica em cães. **Vet News**.

MOURA, J. P. G., BRANDÃO, L. B., BARCESSAT, A. R. P. (2018). Estudo da Terapia Fotodinâmica (PDT) no reparo de lesões teciduais: estudo de casos clínicos. **Estação Científica (UNIFAP)**, 8(1), 103-110.

MURPHY, K. M. (2001). A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, 16(4), 236–241.

NARDONI, S., CORAZZA, M., MANCIANTI, F. (2008). Diagnostic and clinical features of animal malasseziosis. **Parassitologia**, 50 (1/2), 81.

NASCENTE, P. D. S. (2006). **Estudo da população de Malassezia pachydermatis em otite externa canina e avaliação da sensibilidade in vitro e in vivo frente a antifúngicos**. 135f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NEVES, L. S., SILVA, C. M. D. S., HENRIQUES, J. F. C., CANÇADO, R. H., HENRIQUES, R. P., JANSON, G. (2005). A utilização do laser em Ortodontia. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, 10(5), 149-156.

NOBRE, M., MEIRELES, M., GASPAR, L. F., PEREIRA, D., SCHRAMM, R., SCHUCH, L. F., SOUZA, L. (1998). Malassezia pachydermatis e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência Rural**, 28(3), 447-452.

NOBRE, M.O., CASTRO, A. P., FERREIRO, L. & MEIRELES, M.C.A. (2001). Occurrence of Malassezia pachydermatis and other infectivous agents as cause of external otitis in dog from Rio Grande do Sul state, Brazil (1996/1997). **Brazilina Journal of Microbiology**. 32 (3): 245-249.

OLIVEIRA, L. C., BRILHANTE, R. S. N., CUNHA, A. M. S., CARVALHO, C. B. M. (2006). Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1009–1017.

PATERSON, S. (2016). Discovering the causes of otitis externa. **In Practice**, 38(Suppl 2), 7–11.

PEANO, A., GALLO, M.G. (2008). Management of Malasseziarelated diseases in the dog. **Parasitologia**, 50: 85-88.

PENG, Q., MOAN, J., NESLAND, J. M. (1996). Correlation of Subcellular and Intratumoral Photosensitizer Localization with Ultrastructural Features After Photodynamic Therapy. **Ultrastructural Pathology**, 20(2), 109–129.

PEREIRA, C. A., ROMEIRO, R. L., COSTA, A. C. B. P., MACHADO, A. K. S., JUNQUEIRA, J. C., & JORGE, A. O. C. (2011). Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: An in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 26, n. 3, p. 341–348.

PERRY, L. R., MACLENNAN, B., KORVEN, R., RAWLINGS, T. A. (2017). Epidemiological study of dogs with otitis externa in Cape Breton, Nova Scotia. **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**, 58(2), 168–174.

PRATES, R. A., FUCHS, B. B., MIZUNO, K., NAQVI, Q., KATO, I. T., RIBEIRO, M. S., HAMBLIN, M. R. (2013). Effect of Virulence Factors on the Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans*. **PLoS ONE**, 8(1), e54387.

RIBEIRO, A. P. D., ANDRADE, M. C., BAGNATO, V. S., VERGANI, C. E., PRIMO, F. L., TEDESCO, A. C., PAVARINA, A. C. (2013). Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. **Lasers in Medical Science**, 30(2), 549–559.

RIBEIRO, A. P. D., ANDRADE, M. C., BAGNATO, V. S., VERGANI, C. E., PRIMO, F. L., TEDESCO, A. C., PAVARINA, A. C. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. **Lasers in medical science**, 30(2), 549-559.

RICHARD, G.H., HARARI, J., DELAUCHE, A.J., (2002). **Enfermedades óticas del perro y del gato: Editores Médicos S.A.** Madrid: Spain

ROBERT GETTY; SEPTIMUS SISSON; JAMAES DANIELS GROSSMAN. (1986). **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro.

RHODES, K. H. (2005). **Dermatologia de Pequenos Animais: consulta em 5 minutos**. Editora Revinter, Rio de Janeiro, 1 ed.,pg. 13- 18.

ROSSER, E. J. (2004). Causes of otitis externa. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 34(2), 459–468.

ROSSER, J. E. (1993). Diagnosis of food allergy in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 203(2), 259-262.

ROSYCHUK; LUTTGEN. (2005). Olhos, ouvidos, nariz e garganta. In: **Tratado de Medicina Interna Veterinária Doenças do cão e do gato**. 5. Ed., p. 1048-1056, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

SANTIN, R., GIORDANI, C., MADRID, I. M., MATOS, C. B. D., FREITAG, R. A., MEIRELES, M. C. A., MELLO, J. R. B. D. (2014). Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia= Brazilian journal of veterinary and animal sciences**. Belo Horizonte. Vol. 66, n. 2 (jan./abr. 2014), p. 367-373.

SCHLOTTFELDT, F. D. S., TRAMONTIN, S. W., NAPPI, B. P., SANTOS, J. I. D. (2002). Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 38(3), 199-204.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. (2001). Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears. **Muller & Kirk's small animal dermatology**, p. 1203-1232.

SILVA, V. C. R. D. (2018). **Eficácia da terapia fotodinâmica (PDT) e da fotobiomodulação (FBM) no controle da mucosite oral quimioinduzida de**

pacientes oncológicos pediátricos. 155 f. Tese (Doutorado em Clínica Integrada) Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Pernambuco.

SOUKOS, N. S., WILSON, M., BURNS, T., SPEIGHT, P. M. (1996). Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, 18(3), 253–259.

SOUZA, R. C., JUNQUEIRA, J. C., ROSSONI, R. D., PEREIRA, C. A., MUNIN, E., JORGE, A. O. C. (2009). Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, 25(3), 385–389.

TARDIVO, J. P., DEL GIGLIO, A., DE OLIVEIRA, C. S., GABRIELLI, D. S., JUNQUEIRA, H. C., TADA, D. B., BAPTISTA, M. S. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2(3), 175–191.

FOSSUM, T. W. (2014). **Cirurgia de pequenos animais**. 4. ed. São Paulo.

THOMAS, C.R. (2006). Otitis Externa: A Systematic Approach to Diagnosis and Treatment. **Proceeding of the North American Veterinary Conference (NAVC)**. Jan. 11/2006. Congress: Ithaca, New York.

TILLEY, L. P; F. W. K. (2003). **Consulta veterinária em 5 minutos**. Editora manole, são Paulo 2º edição.

VAN STRATEN, D., MASHAYEKHI, V., DE BRUIJN, H. S., OLIVEIRA, S., ROBINSON, D. J. (2017). Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. **Cancers**, v.9, n. 2, p.19.

Vaz, A. K., Zamban, A. L. M. (2002). Prevalence of *Malassezia* sp. in the ears of asymptomatic dogs and dogs with otitis examined at the veterinary hospital clinic

in Lages/SC from October to December 2000. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 1(1), 16-20.

WAINWRIGHT, Mark. (2002). The emerging chemistry of blood product disinfection. **Chemical Society Reviews**, v. 31, n. 2, p. 128-136.

WARREN, C. B., KARAI, L. J., VIDIMOS, A., MAYTIN, E. V. (2009). Pain associated with aminolevulinic acid-photodynamic therapy of skin disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 61(6), 1033–1043.

WEISS, A., DEN BERGH, H. VAN, GRIFFIOEN, A. W., NOWAK-SLIWINSKA, P. (2012). Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: The revival of a promising idea. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, 1826(1), 53–70.

WERNER, A.H. Otite Externa e Otite Média In: JONES, K.H. (2005). **Dermatologia de pequenos animais: consulta em 5 minutos**. Rio de Janeiro: Revinter, p 144- 150.

WHITE, P. D. (1999). Medical management of chronic otitis in dogs. **The Compendium on Continuing Education for the Practitioner Veterinary** v.21,n. 8, p 716- 727.

WILSON, B. C., PATTERSON, M. S. (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, 53(9), R61–R109.

WOODY, B. J., FOX, S. M. (1987). Otite externa: revisando os sintomas para descobrir a causa determinante. **Cães & Gatos**, v. 17, p 38- 41.

Yamamoto, D. M., Colino, V. C. M., Leal, C. R. B., Babo-Terra, V. J. (2010). Otite externa canina em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **PUBVET**, 4, Art-893.

ZAMANKHAN MALAYERI, H., JAMSHIDI, S., ZAHRAEI SALEHI, T. (2010). Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. **Veterinary Research Communications**, 34(5), 435–444.

ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. (2008). The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Medical Physics**, v. 35, n. 7, p. 3127–3136.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Sr/Sr^a

Convido o Sr. (a) a **autorizar a participação de seu animal** _____, **canino**, _____ (**sexo**), na pesquisa intitulada “Utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento de otite causada por *Malassezia* sp. em cães domiciliados”, que tem como objetivo realizar o tratamento de otites em cães, utilizando o Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) como uma nova opção de terapia complementar. Estamos fazendo esta pesquisa porque almejamos mais uma forma de tratar a otite em cães de forma que seja segura aos animais, tornando-a uma terapia alternativa. Caso o seu animal tenha algum sinal característico desta doença, o mesmo poderá ser fotografado por nossa equipe.

A participação será importante para contribuir com informações que ajudem a desenvolver uma nova alternativa de tratamento.

O Sr. (a) terá liberdade para pedir esclarecimentos sobre qualquer pergunta, bem como para desistir de participar da pesquisa a qualquer momento que desejar, mesmo depois de ter assinado este documento, e não será, por isso, penalizado de nenhuma forma. Caso desista, basta avisar ao (s) pesquisador (es) e este termo de consentimento será devolvido, bem como todas as informações dadas pelo Sr. (a) serão destruídas.

Informo que o resultado deste estudo poderá servir para o desenvolvimento de ações de tratamento e prevenção da doença. Os resultados desta pesquisa serão retornados a sua pessoa e serão indicadas as melhores maneiras para cuidar caninos acometidos. Esses resultados gerarão como produto final um artigo científico que terá como finalidade divulgação no meio acadêmico-científico.

Fernando Alzamora Filho

Pesquisador Responsável/ Telefone para contato: (73) 99991-2555

Eu,

_____, RG _____, aceito participar das atividades da

pesquisa: “ *Utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento de otite causada por malassezia spp. em cães domiciliados*”. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Além disso, autorizo, de livre e espontânea vontade, o uso da imagem de meu cão em qualquer meio de comunicação para fins de pesquisa e divulgação de conhecimento científico, não recebendo para tanto qualquer tipo de pagamento.

Autorizo o uso de imagem

Marca do polegar



Não autorizo o uso de imagem

A rogo do(a) Sr.(a) _____ m:

Assinatura da Testemunha 1

Assinatura da Testemunha 2

[Obs.: Informo que o presente documento será obtido em duas vias (uma via para o sujeito da pesquisa e uma para guarda do pesquisador) e será impresso em folha única (frente e verso).