

Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutânea, alterações histológicas e imuno-histoquímicas na pele do modelo animal*
*Topical photodynamic therapy with zinc phthalocyanine: evaluation of fluorescence intensity, skin absorption, skin histological and immunohistochemical changes in animal model**

Marília Vannuchi Tomazini¹
Sérgio Britto Garcia³

Cacilda da Silva Souza²
Antônio Cláudio Tedesco⁴

Resumo: FUNDAMENTOS – Ftalocianinas são promissores agentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica (TFD).

OBJETIVOS – Avaliar intervalos, veículos e a incorporação de promotor de absorção na formulação tópica da ftalocianina de zinco (FC-Zn). Avaliar alterações macro e micromorfológicas e a expressão de Fas promovidas pela TFD com FC-Zn tópica no modelo murino.

MÉTODOS – Por meio da espectrometria de fluorescência, foram avaliadas combinações de diferentes períodos de oclusão tópica das formulações gel ou emulsão de FC-Zn (1mg/dl), com ou sem monoleína 5%, no dorso do camundongo *hairless*. Após oito horas das diferentes formulações, os camundongos foram expostos ao laser de diodo de 670nm, dose de 50J/cm².

RESULTADOS – A fluorescência foi discretamente superior após oito horas e com a emulsão nos intervalos de uma, duas e quatro horas de oclusão. A intensidade do edema e da erosão correspondeu à necrose da epiderme e à imunoexpressão de Fas nos cortes histológicos de pele.

CONCLUSÕES – Os achados indicam a ação fotodinâmica promovida pela interação entre FC-Zn e fonte de luz de 670nm. As alterações macro e micromorfológicas foram correspondentes e mais substanciais com a emulsão FC-Zn e monoleína, sugerindo a acentuação dos efeitos com essa formulação. A imunoexpressão de Fas e as alterações histológicas sugeriram a apoptose como mecanismo de morte celular na TFD com FC-Zn tópica.

Palavras-chave: Absorção cutânea; Apoptose; Espectrometria de fluorescência; Fotoquimioterapia; Imunoistoquímica; Lasers; Modelos animais

Abstract: BACKGROUND – Phthalocyanines are promising photosensitizers used in photodynamic therapy (PDT).

OBJECTIVES – To evaluate the following parameters: intervals, vehicles and enhancer using topical zinc-phthalocyanine (Zn-PC) formulation. To examine macro and micromorphological changes and Fas expression induced by topical Zn-PC-PDT on murine skin.

MATERIAL AND METHODS – Using fluorescence spectrometry, different intervals of topical occlusion employing Zn-PC gel or emulsion, with or without monolein 5% were studied. After an 8-hour occlusion of different formulations, the mice were exposed to 670 nm laser, at a 50 J.cm⁻² dose.

RESULTS – Fluorescence was slightly higher after 8 hours, and also with emulsion formulation at one-, two- and four-hour occlusion periods. The intensity of edema and erosion were correlated to epidermal necrosis and to Fas immunorexpression in skin histological specimens.

Conclusions – The results show the effects of photodynamic action promoted by the interaction between Zn-PC formulation and a 670-nm light source. Macro and micromorphological alterations were correlated and more substantial with monolein and Zn-PC emulsion, suggesting more marked effects with this formulation. The Fas immunorexpression and histological changes suggested that apoptosis plays a role in the mechanism of cell death caused by PDT based in Zn-PC.

Keywords: Apoptosis; Immunohistochemistry; Lasers; Models, animal; Photocchemotherapy; Skin absorption; Spectrometry, fluorescence

Recebido em 19.04.2005.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 14.09.2007.

* Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCL-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / Conflict of interest: None

Suporte financeiro / Financial funding: Fonte de Apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

¹ Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic) do CNPq, 2004/2005. Residente da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

² Professora doutora da Divisão de Dermatologia, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

³ Professor-associado do Departamento da Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁴ Professor-associado do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCL-USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste em modalidade terapêutica que envolve a ativação de substâncias fotossensíveis, fonte de luz e a geração de espécies citotóxicas de oxigênio e de radicais livres para promover a destruição seletiva dos tecidos-alvo.¹ A absorção da luz pelo corante, na presença de oxigênio, desencadeia processos fotofísicos e biológicos que resultam na formação de espécies reativas de oxigênio capazes de agredir constituintes celulares e ocasionar a morte celular por apoptose ou necrose.¹

Os trabalhos clínicos pioneiros de Dougherty et al.² com o uso sistêmico do derivado de hematoporfirina (DHE) em TFD e a posterior aprovação de seu derivado purificado (*porfimer sodium*) para tratamento de certos tipos de tumores sólidos consistiram em avanços e ampliaram as perspectivas da inclusão da TFD no arsenal da terapêutica oncológica. Entretanto, a transitória e generalizada fotossensibilidade cutânea dos componentes porfirínicos administrados sistemicamente, como o DHE e seus derivados purificados, foi uma das limitações a seu amplo emprego clínico.¹ Posteriormente, Kennedy et al.³ introduziram o uso tópico do ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), precursor metabólico de porfirinas endógenas, o que permitiu a restrição da fototoxicidade ao local de aplicação. Indubitavelmente, esses fatores encorajaram o acelerado desenvolvimento de estudos explorando os inúmeros aspectos implicados na síntese e potencial emprego de novos agentes fotossensibilizadores.^{1,4,5}

Nas últimas décadas foram desenvolvidos compostos, a segunda geração de corantes, com propósitos diagnóstico e terapêutico, entre os quais está incluída uma das alternativas mais promissoras para a TFD, o grupo das ftalocianinas (FC).^{4,5}

Ftalocianinas são corantes sintéticos semelhantes às porfirinas e estruturalmente consideradas azaporfirinas.⁶ São classificadas como fotossensibilizadores de segunda geração, cuja lipofilicidade contribuiria para sua localização nas membranas plasmáticas, nos microsomas e nas mitocôndrias, e, consequentemente, para a ação fotodinâmica.⁷ O metal central possuiria influência considerável em sua propriedade fotossensibilizadora, e as ftalocianinas de zinco (FC-Zn) estão entre os sensibilizadores mais promissores deste grupo.^{6,8} Estudos mais recentes têm corroborado a eficiência das ftalocianinas como agentes fotossensíveis para uso em TFD,^{9,10} que já tem seu emprego clínico aprovado na Rússia.⁵

No processo de fototoxicidade e extensão do fotodano da reação fotodinâmica estão implicados múltiplos fatores, tais como classe, dose, via de administração, absorção, seletividade e biodistribuição do fotossensibilizador, tipo de fonte de luz, irradiância (taxa de fluência) e dose (fluência), disponibilidade

do oxigênio no tecido-alvo e intervalo entre administração do fotossensibilizador e a exposição à fonte de luz.^{1,4} Na destruição do tecido-alvo, mediada por espécies citotóxicas de oxigênio e de radicais livres, estão envolvidos mecanismos diretos, apoptose e/ou necrose, e indiretos, resposta imune e inflamatória. A apoptose por envolvimento da via do Fas parece ter papel relevante como mecanismo de morte celular promovida pela TFD, com o uso em particular dos fotossensibilizadores tópicos.^{4,11-13}

Este estudo em modelo animal buscou avaliar as variáveis intervalo e veículo, a incorporação de promotor de absorção na formulação tópica da FC-Zn, por meio de ensaio de espectrofluorimétrico; as alterações macroscópicas, histopatológicas, e a expressão de Fas na pele do camundongo submetido à TFD com FC-Zn tópica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 37 camundongos *hairless*, fêmeas, de oito semanas, mantidos aclimatados à temperatura ambiental controlada (23°C) em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz das 7h às 19h) e livre acesso à água e dieta comercial balanceada.

Ensaio fluorimétrico: A intensidade de fluorescência foi avaliada com o espectrofluorímetro Fluorog-3 (Yvon-Jobert, França) na combinação de diferentes períodos de oclusão com as formulações gel ou emulsão tópica da FC-Zn tetra-alkilada (Sigma-Aldrich Inc., EUA), concentração de 1mg/dl. Dezesesseis camundongos, divididos igualmente nos grupos A, B, C e D, receberam aplicação oclusiva de FC-Zn em gel, e 12 camundongos, divididos nos grupos E, F, G e H, receberam a aplicação oclusiva de FC-Zn em emulsão no dorso à direita. Imediatamente antes da quantificação da intensidade de emissão de fluorescência pela FC-Zn absorvida pela pele do animal, procedeu-se retirada do curativo e da formulação utilizada com solução fisiológica 0,9%. O ensaio fluorimétrico foi efetuado após uma, duas, quatro e oito horas de oclusão nos grupos A e E; B e F; C e G; D e H, respectivamente. Dois camundongos foram utilizados como controles.

Ensaio FC-laser: Sete camundongos, enumerados de C1 a C7, foram submetidos à exposição à fonte de luz, laser diodo de 670nm (QuantumTech, Brasil) após aplicação oclusiva, por oito horas, da formulação FC-Zn gel ou emulsão, concentração de 1mg/dl, com ou sem a monoleína a 5%, em área do dorso. Durante as oito horas, os animais permaneceram sem exposição a qualquer fonte de luz. Parâmetros empregados: laser de diodo de 670nm, potência de 500mW, dose de 50J/cm², em área de 3,14cm², intensidade de

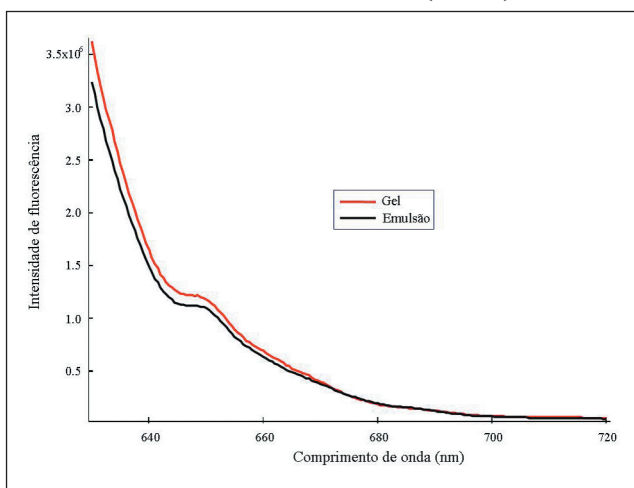
0,16W/cm² por 312 segundos. Decorridas 24 horas da exposição ao laser, os animais foram fotografados para registro das alterações macroscópicas e em seguida sacrificados em câmara de CO₂. A pele dissecada foi acondicionada em formol tamponado para posterior preparação das lâminas. Na avaliação histopatológica, os cortes de fragmentos de pele fixados e parafinados foram corados por hematoxilina e eosina. Para o estudo imuno-histoquímico, os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados com banhos de álcool com concentrações decrescentes. Por meio de reação de imuno-histoquímica, avaliou-se a expressão do Fas (CD95) (Novocastra Laboratories, UK). Após as incubações seqüenciais com os anticorpos primário e secundário, a reação foi identificada através do complexo avidina-biotina e revelada com o DAB (3,3'-diaminobenzidine, Sigma-Aldrich Inc., EUA). A imunorreatividade foi considerada positiva quando detectada coloração marrom na membrana das células.

RESULTADOS

No ensaio fluorimétrico, observou-se pico de emissão de fluorescência na faixa de comprimento de onda de 650nm (Gráfico 1), que foi detectada após todos os intervalos de oclusão. Não houve detecção de fluorescência na pele dos camundongos controles.

Foram registrados valores menores de intensidade de fluorescência nos intervalos de uma, duas e quatro horas comparados ao de oito horas. Nos intervalos de uma a quatro horas, o uso da formulação FC-Zn emulsão mostrou valores de intensidade de fluorescência discretamente superiores comparados à formulação FC-Zn gel (Gráfico 2).

GRÁFICO 1: Curva de intensidade da emissão de fluorescência obtida na pele do camundongo *hairless* com as formulações tópicas, emulsão e gel, da ftalocianina de zinco (FC-Zn)



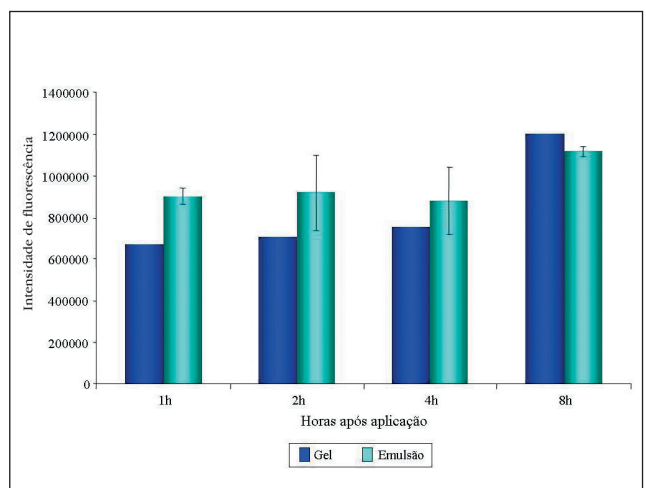
Após exposição ao laser 670nm dos animais que utilizaram as diferentes formulações de FC-Zn, tópicas e oclusivas por oito horas, as principais alterações macroscópicas foram edema e erosão da pele (Quadro 1). Nos cortes histológicos de pele, observou-se a presença de necrose degenerativa em todas as camadas da epiderme, com formação de células anucleadas nas camadas mais superficiais e cromatina extremamente condensada na camada basal (Figura 1). A mais significativa expressão do Fas (Figura 2) foi correspondente às alterações macroscópicas e histopatológicas mais acentuadas (animais C3 e C4), conforme observado no quadro 1. Todas essas alterações foram mais evidentes nos animais que receberam a formulação emulsão da FC-Zn associada à monoleína a 5%.

DISCUSSÃO

Os novos fotossensibilizadores buscam incorporar melhorias das propriedades, entre as quais a curta duração da fotossensibilidade, a possibilidade do uso tópico, maior seletividade e a ativação por comprimentos de ondas mais longos e mais penetrantes em tecidos biológicos.^{1,6,7} O aprimoramento dos fotossensibilizadores e o entendimento das propriedades fotofísicas e dos mecanismos envolvidos na interação corante, luz e tecidos biológicos têm resultado em avanços e ampliação de aplicação da TFD no tratamento oncológico, entre outros propósitos terapêuticos particularmente atraentes para área de dermatologia.

Uma das propriedades físico-químicas do fotossensibilizador ideal é a elevada capacidade de absorção de onda na faixa entre 600 e 850nm, isto é, faixa de comprimento de onda da luz que é dotada de

GRÁFICO 2: Controle de absorção percutânea das formulações tópicas, emulsão e gel, da ftalocianina de zinco (FC-Zn), na pele do camundongo *hairless*



Quadro 1: Correlação das alterações macroscópicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas da pele dos camundongos tratados com terapia fotodinâmica e ftalocianina de zinco (FC-Zn) tópica

Combinação utilizada		Alterações macroscópicas	Necrose epidérmica	Expressão de Fas
C1	Veículo Emulsão	Edema	+	+
C2	Veículo Emulsão + FC	Erosão	++	++
C3	Veículo Emulsão + FC + aditivo	Erosão mais intensa	+++	++++
C4	Veículo Emulsão + FC + aditivo	Erosão mais intensa	++++	++++
C5	Veículo Gel	Edema	+	+
C6	Veículo Gel + FC	Erosão	++	+
C7	Veículo Gel + FC + aditivo	Edema	+	+

FC: ftalocianina-laser; C: camundongo; FC: ftalocianina; Aditivo: monoleína 5%

maior capacidade de penetração nos tecidos biológicos. Essa capacidade, própria da segunda geração de fotossensibilizadores, permitiria o acréscimo de cerca de 30% no alcance da profundidade. Ftalocianinas caracteristicamente exibem forte absorção na faixa de 680-700nm.^{6,7} Em adição, como corante fluorescente possibilitaria o monitoramento de concentração na lesão ou, ainda, o uso como conveniente ferramenta para identificação e mapeamento de lesões tumorais.⁷ No presente estudo, com o uso da FC-Zn foi evidenciado pico de emissão de fluorescência na faixa de comprimento de onda de 650nm, compatível com achados *in vitro* acerca das propriedades da FC-Zn.¹⁴

Há interesse em explorar o potencial terapêutico de fotossensibilizadores para área de dermatologia, particularmente aqueles que possibilitem maior seletividade por tecidos específicos, baixa frequência de efeitos colaterais, baixo custo e facilidade de uso, sobretudo o tópico.^{1,5} Comparada ao uso sistêmico, a administração tópica do fotossensibilizador reduz o risco dos efeitos indesejáveis³ e é extremamente vantajosa para tratamento das afecções da pele.

Fármacos do grupo das FC e suas respectivas propriedades têm sido explorados quanto a seu potencial uso oncológico por meio de estudos com cultivo ou implante nos modelos animais das variadas linhagens de células cancerígenas.^{8,15-18} Há um número limitado de estudos usando TFD com ftalocianinas tópicas, cujos focos foram: o dano vascular na membrana corioalantóide de galinhas¹⁹ e as propriedades fotofísicas e fotossensibilizantes das FC-Zn em pele de camundongos.²⁰⁻²¹ A aplicação tópica de FC-Zn em pele de camundongos Balb/c tem mostrado respostas satisfatórias quanto a sua absorção, capacidade fotossensibilizadora e segurança.²⁰⁻²¹ As espécies *hairless* são freqüentemente recomendadas, por evitar a necessidade da raspagem dos pêlos, que pode danificar o estrato córneo e levar à variação da permeabilidade. Em nossos ensaios, a linhagem *hairless* de

camundongos facilitou o uso das formulações tópicas oclusivas e a visualização dos efeitos na pele da TFD com a FC-Zn. Entretanto, vale considerar que a pele do camundongo, freqüentemente empregado em estudos permeação, parece constituir modelo de maior permeabilidade do que a barreira cutânea humana.²²

A molécula de FC pode ser ligada a várias moléculas e ser substituída por diferentes componentes na periferia. A natureza desse substituinte interfere na captação celular da FC e em sua capacidade de fotossensibilização. A presença de um metal central e o grau de sulfonação, ou outros substituintes periféricos que aumentem a solubilidade da molécula, parecem influenciar a capacidade de fotossensibilização.^{6,7} A substituição periférica do anel da FC (sulfonatação) determina a solubilidade do corante, a hidro ou lipofilicidade, a quantidade de cargas periféricas, o tamanho da molécula e, conseqüentemente, a captação e a retenção celular.^{6,7} Como regra, quanto menor o número de grupos sulfonados, mais lipofílica fica a molécula, permitindo maior penetração celular e maior poder fotossensibilizador. No entanto, a lipofilicidade não é o único fator determinante de otimização da captação celular e ação fotodinâmica. Além da capacidade de captação do corante, o grau de agregação e a localização intracelular dessas moléculas também influenciam a fototoxicidade. O acúmulo preferencial de FC na membrana plasmática, nos microsomos e nas mitocôndrias tem sido considerado vantajoso para ação fotodinâmica.^{6,7}

A propriedade lipofílica da FC-Zn parece corroborar os resultados sugestivos de que o uso da formulação emulsão seria discretamente mais vantajoso comparado ao da formulação gel. Em adição, o acréscimo da monoleína, como promotor de absorção, incrementaria a absorção da FC-Zn. Novos sistemas de liberação de fármaco têm sido propostos para otimização da absorção e da seletividade de biodistribuição.

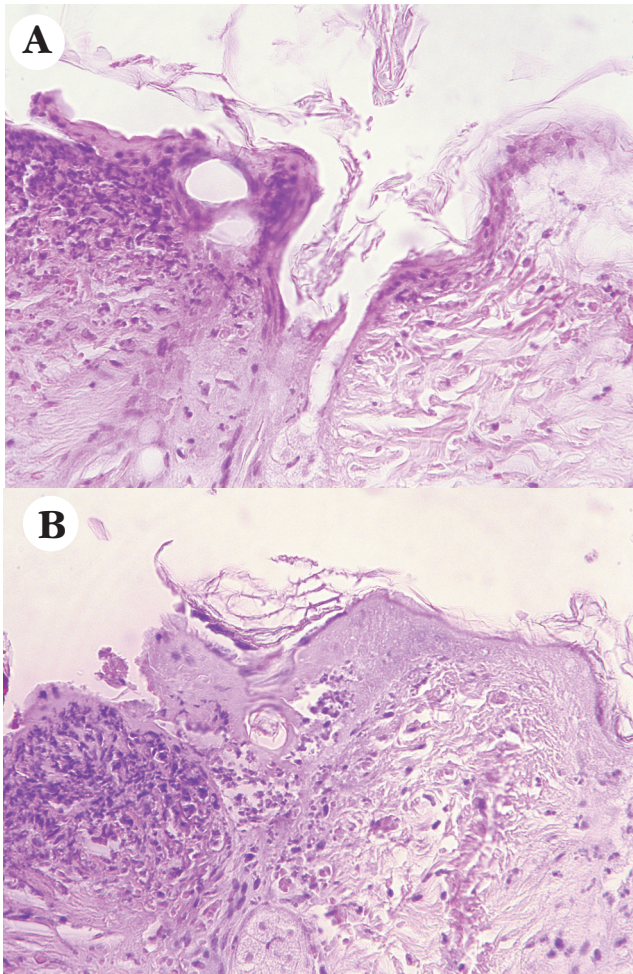


FIGURA 1: Necrose degenerativa da epiderme na pele do camundongo após terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco (FC-Zn) (HE; aumento original 200x)

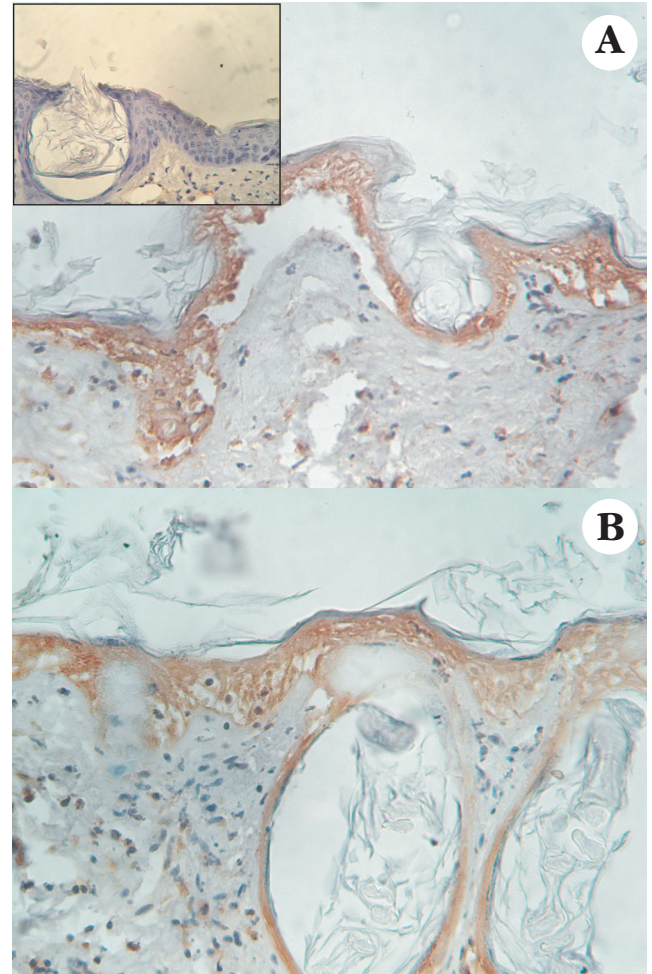


FIGURA 2: Imunoexpressão de Fas na pele do camundongo. Detalhe: ausência de expressão de Fas no animal controle (Fas-CD95; aumento original 200x)

ção dos agentes fotossensibilizadores.^{9,10,14,23}

Nos cortes histológicos de pele, o edema e a erosão associados à presença de necrose degenerativa da epiderme indicam o resultado da ação fotodinâmica e interação do composto FC-Zn e fonte de luz de 670nm. O edema e as alterações histopatológicas discretas com o uso apenas da formulação controle, emulsão ou gel, e fonte de luz poderiam ser decorrentes da sensibilidade, da dose e/ou intensidade de luz empregadas na pele do camundongo *hairless*. As alterações macroscópicas e histopatológicas foram correspondentes e mais acentuadas nos animais que receberam a emulsão da FC-Zn associada à monoleína, sugerindo a otimização da ação fotodinâmica com o uso dessa formulação.

O sistema Fas-Fas ligante (FasL) tem papel crucial na produção de sinal para apoptose, ou morte celular programada. O receptor Fas é proteína de superfície celular, pertencente à família do fator de necrose tumoral. A ligação do Fas-ligante (FasL) a seu

receptor Fas expresso nas células induz a apoptose. Várias células expressam ou passam a expressar o Fas, enquanto o FasL é expresso predominantemente em células T ativadas. O envolvimento da apoptose tem sido demonstrado como resposta inicial na TFD, e múltiplas vias parecem estar envolvidas na morte celular mediada pela TFD. Há consistentes evidências de que o uso da TFD com FC em ensaios de cultura de diferentes linhagens de células promove apoptose.^{11,21,24} Na avaliação imuno-histoquímica dos cortes de pele, a TFD com a emulsão FC-Zn-monoleína promoveu marcante imunoexpressão de Fas, o que corrobora o envolvimento da apoptose como mecanismo de morte celular mediada pela TFD com FC-Zn.

CONCLUSÃO

A fotoativação da FC em 670nm coincide com comprimentos de onda de maior capacidade de penetração nos tecidos biológicos e é considerada vantajosa para fotossensibilizador com uso potencial na TFD. A presença de edema e erosão da pele no exame clí-

nico e a necrose degenerativa em todas as camadas da epiderme nos cortes histológicos de pele indicam o resultado da ação fotodinâmica e interação do composto FC-Zn e fonte de luz de 670nm. As alterações macroscópicas e histopatológicas foram correspondentes e mais acentuadas nos animais que receberam a emulsão da FC-Zn associada ao promotor de absorção monoleína 5%. Tais resultados demonstram os efeitos e a potencialidade clínica da FC-Zn tópica para uso em TFD e sugerem a otimização da ação fotodinâmica com emprego dessa formulação. A imunopressão de Fas e as alterações histológicas sugerem o

envolvimento da apoptose como mecanismo de morte celular induzida pela TFD com FC-Zn. Os resultados são indicativos de que a FC-Zn é promissora como fotossensibilizador tópico para uso na TFD nas afecções dermatológicas. □

AGRADECIMENTOS

A Rosângela Orlandim Lopes, funcionária do Departamento de Patologia da FMRP-USP, pelo valioso apoio técnico ao trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:443-56.
2. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 1978;38:2628-35.
3. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrins IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B.* 1990;6:143-8.
4. Wiedmann MW, Caca K. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004;5:1-12.
5. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2004;5:497-508.
6. Spikes JD. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol.* 1986;43:691-9.
7. Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol.* 1991;53:859-70.
8. Anholt H, Moan J. Fractionated treatment of CaD2 tumors in mice sensitized with aluminumphthalocyanine tetrasulfonate. *Cancer Lett.* 1992;61:263-7.
9. Sibata MN, Tedesco AC, Marchetti JM. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. *Eur J Pharm Sci.* 2004;23:131-8.
10. Oliveira DM, Lacava ZG, Lima EC, Morais PC, Tedesco AC. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006;6:2432-7.
11. Ahmad N, Gupta S, Feyes DK, Mukhtar H. Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol.* 2000;115:1041-6.
12. Takahashi H, Itoh Y, Miyauchi Y, Nakajima S, Sakata I, Ishida-yamamoto A, et al. Activation of two caspase cascades, caspase 8/3/6 and caspase 9/3/6, during photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-S10 (Na), in normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2003;295:242-8.
13. Nakaseko H, Kobayashi M, Akita Y, Tamada Y, Matsumoto Y. Histological changes and involvement of apoptosis after photodynamic therapy for actinic keratoses. *Br J Dermatol.* 2003;148:122-7.
14. Pelisson MM, Delega AD, Beltrame M, Simioni AR, Tedesco AC. Synthesis and photochemical properties of a bis (n-Hexanoyl)silicon tribenzonaphthoporphyrinate. *Photomed Laser Surg.* 2006;24:581-7.
15. Reddi E, Castro GL, Biolo R, Jori G. Pharmacokinetic studies with zinc (II) – phthalocyanine in tumor bearing mice. *Br J Cancer.* 1987;56:597-600.
16. Bachor R, Flotte TJ, Scholz M, Dretler S, Hasan T. Comparison of intravenous and intravesical administration of chloro-aluminium sulfonated phthalocyanines for photodynamic therapy in a rat bladder cancer model. *J Urol.* 1992;147:1404-10.
17. Van Bruggen N, Chan WS, Syha J, Marshall JF, Proctor E, Williams SR, et al. Cell and tissue responses of a murine tumour to phthalocyanine-mediated photodynamic therapy. *Eur J Cancer.* 1992;28:42-6.
18. Wöhrle D, Iskander N, Grasczew G, Sinn H, Friedrich EA, Maierborst W, et al. Synthesis of positively charged phthalocyanines and their activity in the photodynamic therapy of cancer cells. *Photochem Photobiol.* 1990; 51:351-6.
19. Hammer-Wilson MJ, Akian L, Espinoza J, Kimel S, Berns MW. Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for topically applied photosensitizers. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 53:44-52.
20. Kassab K, Fabris C, Defilippis MP, Dei D, Fantetti L, Roncucci G, et al. Skin-photosensitizing properties of Zn(II)-2(3), 9(10), 16(17), 23(24)-tetrakis - (4-oxy-N-methylpiperidiny) phthalocyanine topically administered to mice. *J Photochem Photobiol B.* 2000;55:128-37.

21. Kaestner L, Cesson M, Kassab K, Christensen T, Edminson PD, Cook MJ, et al. Zinc octa-n-alkyl phthalocyanines in photodynamic therapy: photophysical properties, accumulation and apoptosis in cell cultures, studies in erythrocytes and topical application to Balb/c mice skin. *Photochem Photobiol Sci.* 2003;2:660-7.
22. Benfeldt E. In vivo microdialysis for the investigation of drug levels in the dermis and the effect of barrier perturbation on cutaneous drug penetration. *Studies in hairless rats and human subjects. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 1999;206:1-59.
23. Gomes AJ, Lunardi LO, Marchetti JM, Lunardi CN, Tedesco AC. Photobiological and ultrastructural studies of nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid)-containing bacteriochlorophyll-a as a photosensitizer useful for PDT treatment. *Drug Deliv.* 2005;12:159-64.
24. Ketabchi A, MacRobert A, Speight PM, Bennett JH. Induction of apoptotic cell death by photodynamic therapy in human keratinocytes. *Arch Oral Biol.* 1998;43:143-9.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Cacilda da Silva Souza
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto - USP
Av: Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre
14048 900 Ribeirão Preto - SP
Tel.: (16) 36022716 - Fax: (16) 36330236
E-mail: cssouza@fmrp.usp.br

Como citar este artigo / How to cite this article: Tomazini MV, Souza CS, Garcia SB, Tedesco AC. Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutânea, alterações histológicas e imuno-histoquímicas na pele do modelo animal. *An Bras Dermatol.* 2007;82(6):535-41.