

ALGUNOS DATOS IMPORTANTES
EN EL DESARROLLO DE LA
FOTOQUIMIOTERAPIA PUVA

Las bases para la fotoquimioterapia PUVA establecida por investigadores clínicos y en ciencias básicas son variadas y su exposición, amplísima. Creo útil exponer muy brevemente algunas de ellas.

La historia del desarrollo de la fotoquimioterapia PUVA comenzó con la primera identificación, en 1938, de los psoralenes como la base de la fotosensibilización en ciertas plantas y subsecuentemente por el aislamiento de tres psoralenes en 1947. Un año más tarde se estableció el primer uso clínico de (8-Metoxipsoralen) como una sustancia química fotoactiva para el tratamiento del vitíligo. Ocho años después, se realizaron estudios de dosis-respuesta que demostraron fotosensibilización en humanos por psoralenes administrados oralmente seguida de exposición a la luz solar.

La fotosensibilización de la piel con plantas relacionadas por la presencia de furocumarinas fue descrita por primera vez por Kuske ¹ en 1938. Identificó furocumarinas naturales en plantas como fotosensibilizantes y aisló el bergapten (5-MOP) del aceite de bergamota. Este estudio es quizá la primera indicación de que las furocumarinas son agentes fotoactivos.

En 1947, Fahmy et al.² informaron el aislamiento de 8-MOP del *Ammi majus*. En 1948 El MOft³ inicia el tratamiento del vitíligo con 8-MOP. En 1955 Fitzpatrick et al.⁴ realizan estudios de dosis respuesta con la administración de 8-MOP. Sigue a esto los estudios en 1955⁵ de Musajo sobre las propiedades mutagénicas de cinco furocumarinas encontradas en raíces de cebollas.

Otro gran paso fue el informe de Pathak⁶ sobre el mecanismo de fotosensibilización de la piel basado en la producción de estado excitado "singlet" y estado "triplet" metaestable de los psoralenes. Este autor demostró la existencia de estados reactivos "singlet" y "triplet" de psoralenes. Con evidencia experimental, Pathak propuso que el mecanismo de fotosensibilización biológica producido por los psoralenes involucra excitación de la molécula a un estado "singlet" excitado, Se demostró que los psoralenes en el estado "triplet" generan radicales libres y se cree que éstos evocan fotosensibilización biológica.

La primera evidencia de la unión de moléculas de furocumarina al DNA fue proporcionada por Mu-

sajo et al.⁷ Examinando la modificación del espectro fluorescente del psoralen durante la irradiación U.V. en presencia de DNA, RNA, nucleósidos y las bases purina y pirimidina, los autores concluyeron que la molécula furocumarina fue fotounida covalentemente al DNA.

El mismo Musajo,⁸ y otros en 1967 han realizado trabajos que indican que PUVA inhibe la capacidad tumor-transmisora de células tumorales en la ascitis. Demostraron la inactivación de estas células irradiándolas en presencia de psoralen, 8-MOP, 5-MOP.

En 1968 se hizo evidente que los psoralenes foto-reaccionaron con DNA. Dall'Acqua et al.⁹ mostraron que los psoralenes forman dos tipos de foto-adducts en las posiciones 3,4, y 4',5' en la molécula de psoralen. Esto se realizó en una solución acuosa fría. En 1968 Pathak y Krámer¹⁰ establecen la fotoreacción in vivo de psoralen con DNA. La aplicación de trioxsalen tritiado a la piel e irradiado con UV-A 365 nm, y la subsecuente extracción de DNA, RNA y proteínas de la piel irradiada mostró in vivo fotoconjugación de psoralen con DNA y RNA. Sin embargo la fotoconjugación de psoralen con proteína epidérmica fue mínima. "Adducts" fluorescentes y no fluorescentes se formaron. No se ha establecido hasta dónde la inhibición de la síntesis del DNA es la única base para el efecto terapéutico de PUVA en psoriasis.

El primer estudio controlado 8-MOP oral y UV—A de alta intensidad en el tratamiento de la psoriasis fue informado en 1974 por el grupo de Harvard¹¹. Este informe introdujo una cuidadosa dosimetría monitorada con una fuente de UV—A de alta intensidad e introdujo también el término "fotoquimioterapia". Figs. 22-23.

Los resultados que establecen la eficacia de PUVA en la limpieza y remisión de psoriasis fueron informados en 1977 por Melski et al.¹² Este informe de trabajo cooperativo conducido en 16 departamentos dermatológicos de los Estados Unidos probó que la efectividad de la fotoquimioterapia PUVA requiere mucha atención a los detalles y cuidadoso monitoreo.

La eficacia de PUVA en el mantenimiento de la remisión en psoriasis fue investigada por Wolff et al., quienes demostraron que un período de



Figura 22. Paciente con psoriasis (a) antes y (b) después de tratamiento PUVA.

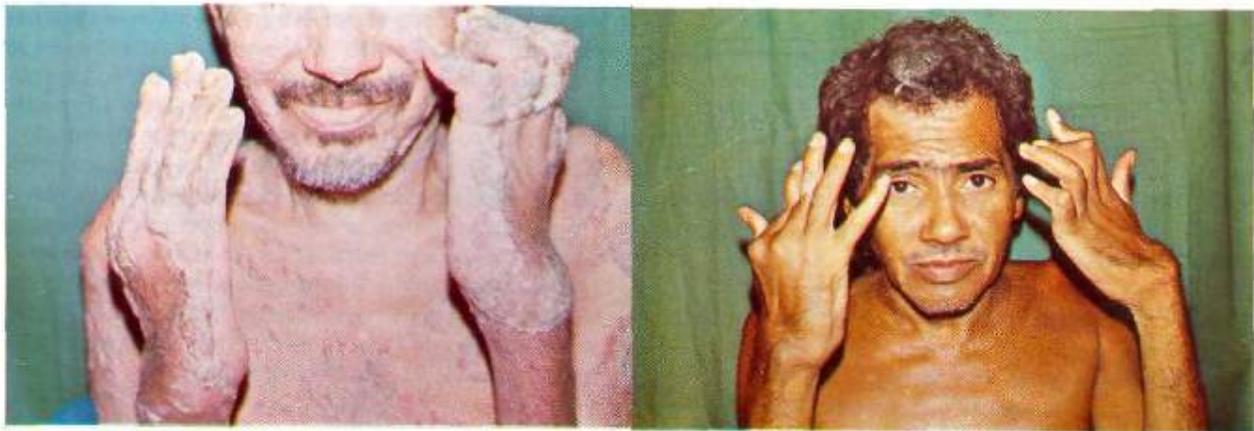


Figura 23. Paciente con psoriasis y artritis psoriática en manos (a) antes y (b) después de tratamiento PUVA.

mantenimiento por sesenta días provee una remisión prolongada de más de un año. Las recidivas gradualmente bajan en función del tiempo pero ocurren durante los primeros dos meses de tratamiento. Wolff y asociados determinan que sin tratamiento, 110/o de sus pacientes se mantuvieron libres de la enfermedad después de 56 semanas; si dicha terapéutica se les proporcionó a los pacientes durante dos o tres meses después de haberse limpiado, más del 660/0 permanecieron en remisión después de 33 semanas.

Concluyeron que por la discontinuación del tratamiento después de dos meses, uno sería capaz de escoger el sub-grupo de pacientes que tienen tendencia a la recidiva.

Un informe del estudio cooperativo entre 18 centros europeos sobre la eficacia del PUVA en la remisión de la psoriasis fue publicado en 1981. Este tratamiento multicéntrico europeo confirmó los resultados de los estudios conducidos en E.U.A. El mantenimiento con PUVA tiene poco o ningún efecto en la duración de la remisión.

Los derivados furocumarínicos 8-MOP y TMP han sido usados por años en la fotoquimioterapia del vitíligo, psoriasis y otras enfermedades hiperproliferativas de la piel. Más recientemente el bergapten¹⁴ (5-MOP), usado ampliamente en preparaciones cosméticas como un agente bronceador, se ha investigado por su potencial efecto terapéutico.

Todas estas furocumarinas son derivados psoralénicos bifuncionales; realizan una fotounión con el DNA, formando "monoadducts" y "diadducts" o uniones cruzadas.¹⁵⁻¹⁷ Recientemente, han sido preparados y estudiados algunos compuestos que se unen con DNA y forman solamente "monoadducts", por tanto comportándose como reactivos monofuncionales. Entre éstos, el 3-carbetoipsoralen¹⁸ (3-CP) y varias metilangelicinas, por ejemplo, 4,5'-DMA (4, 5'-Dimetilangeiicina).¹⁹⁻²¹ son particularmente relevantes por su posible uso en pacientes con psoriasis. Se está estudiando aún las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de estos compuestos y sus fotoreacciones e interacciones con el DNA, RNA y con proteínas, como una contribución básica para la mejor comprensión de sus propiedades fotobiológicas y fotoquimioterapéuticas. Se está en el camino de conocer la relevancia de estas propiedades.

Rodighiero y Dall'Acqua²² han encontrado que el rendimiento de formación de estado "triplet" es mucho más alto en 3-CP que en 8-MOP y tiene también más larga vida. Este hecho ha facultado

a los autores a predecir que 3-CP es un mejor productor de oxígeno "singlet" que 8-MOP.

Sabemos que generalmente las furocumarinas son altamente fluorescentes cuando son expuestas a radiación UV—A. Entre los compuestos que aquellos mismos autores testificaron, 8-MOP tiene un bajo quantum de rendimiento de fluorescencia; pues bien, bajo las mismas condiciones experimentales la intensidad de una fluorescencia es veinte veces más baja que la del psoralen.

MECANISMO DE LAS REACCIONES DE FOTSENSIBILIZACION DEL PSORALEN

Las furocumarinas son compuestos heterocíclicos aromáticos derivados de la condensación de un anillo furano con un anillo cumarínico. Aunque esta fusión puede ocurrir en varias direcciones (por ejemplo en 12 formas lineales y no lineales o angulares), solamente dos formas de fusión de furano y cumarina se observan generalmente: 1) Una estructura lineal tricíclica que remeda al psoralen y 2) Una estructura no lineal, angular llamada angelicina o isopsoralen Figura 24.

ESTRUCTURA MOLECULAR DE

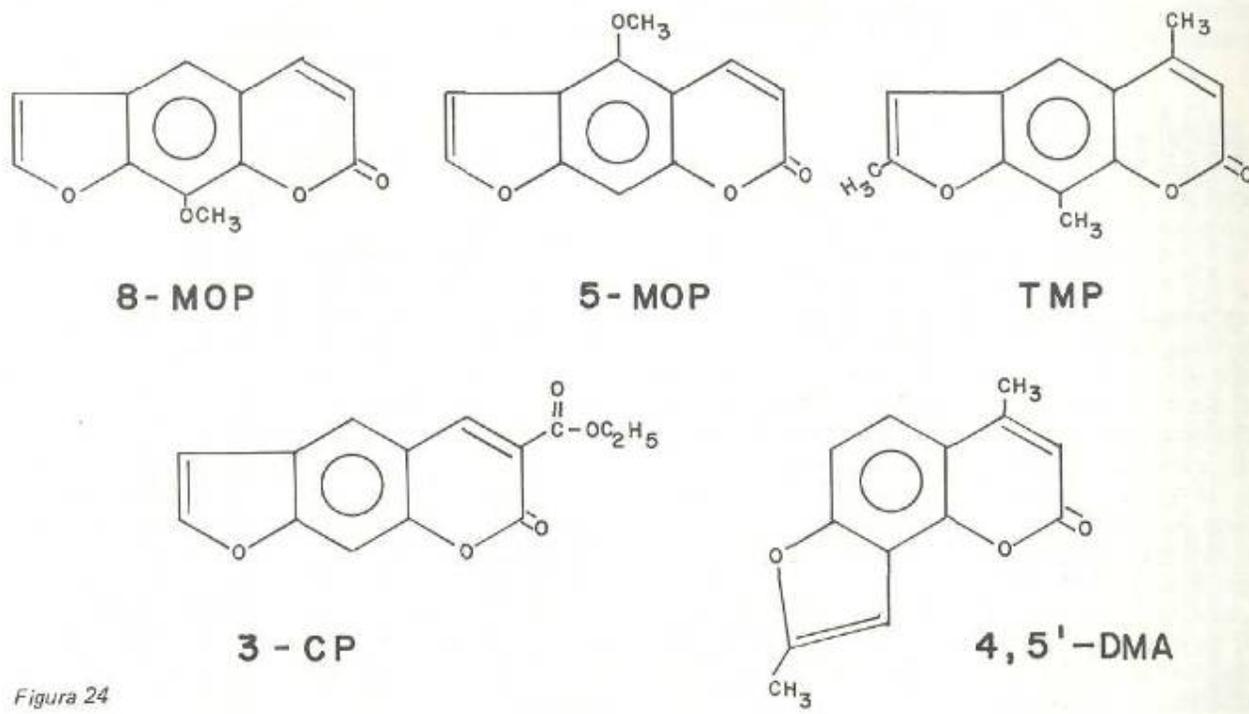
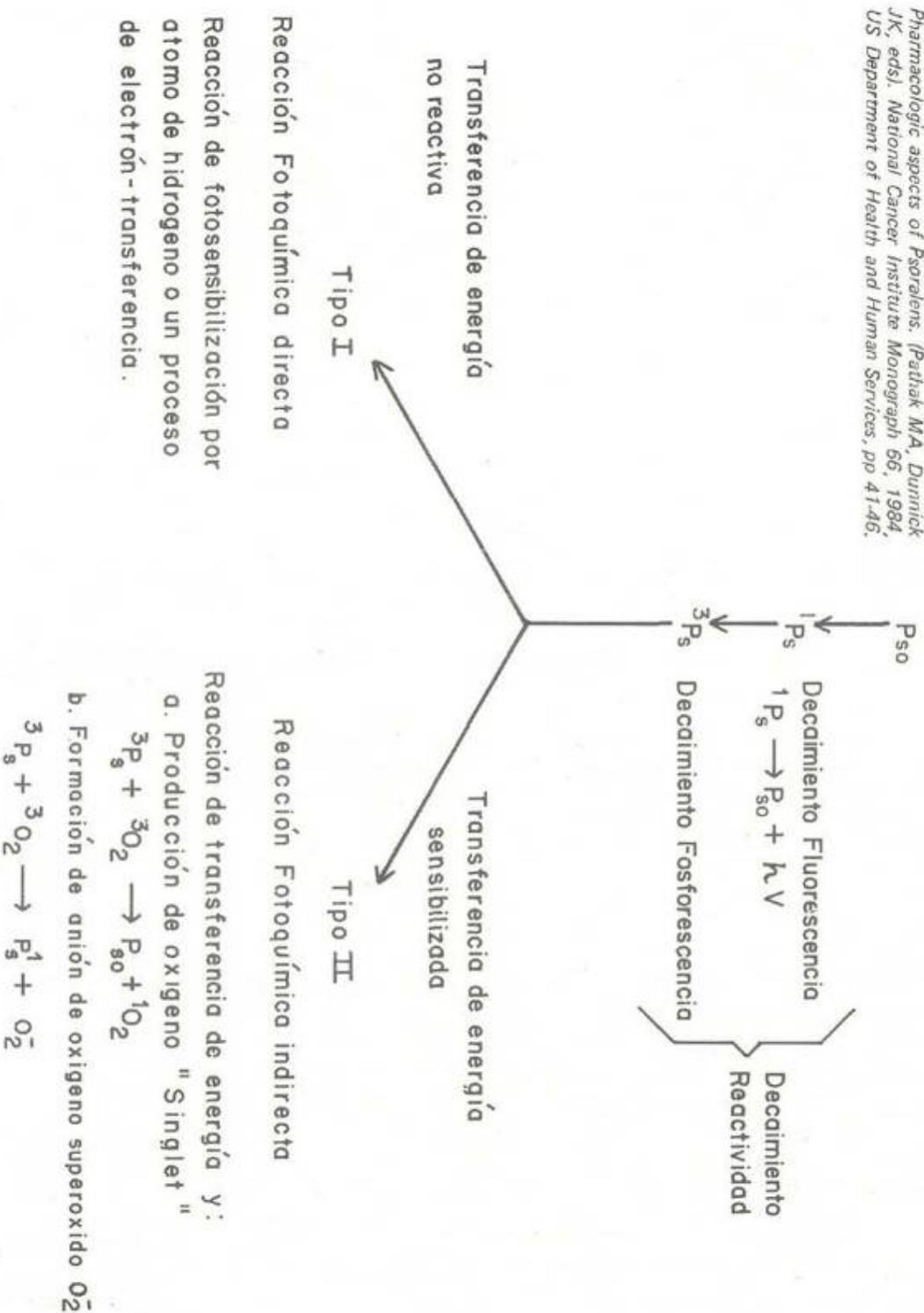


Figura 24

Figura 25. Estados de fotoexcitación de Psoralén y sus reacciones fotoquímicas. Se observan dos tipos de reacciones: tipo I es anóxica e involucra transferencia de energía no radiactiva, y tipo II dependiente de oxígeno involucra transferencia sensibilizada de energía a oxígeno molecular.

Tomado de Pathak MA: Mechanisms of Psoralen Photo-sensitization Reactions. in Photobiologic, Toxicologic and Pharmacologic aspects of Psoralens. (Pathak MA, Durnick JK, eds). National Cancer Institute Monograph 56, 1984. US Department of Health and Human Services, pp 41-46.



Los psoralenes lineales capaces de formar uniones cruzadas entre cadenas con el DNA y también capaces de producir 1O_2 , OJ, o radicales libres son generalmente potentes fotosensibilizantes de la piel que producen eritema, edema, aumento de pigmentación y reacciones vesiculares.²³ Los psoralenes no lineales o angulares usualmente no forman uniones cruzadas entre cadenas con DNA; son menos reactivos para formar 1O_2 o radicales libres y son considerados como agentes no fotosensibilizantes.

Hasta recientemente sólo psoralenes lineales, tales como 8-MOP, TMP, psoralen y 5-MOP fueron empleados en fotoquimioterapia de vitiligo y psoriasis. Los psoralenes angulares (angelicinas o isopsoralenes), fueron considerados como sin valor terapéutico, pero están ahora siendo objeto de estudio en cuanto su valor biológico y terapéutico.

La fotosensibilización de la piel inducida por psoralen, así como la acción terapéutica de éste involucra dos distintos tipos de reacciones que ocurren independientemente una de otra y concurrentemente cuando la piel tratada por psoralen, vía oral o tópica es expuesta a radiación UV en 320-400 nm. El primer tipo, tipo I, ocurre en ausencia de oxígeno (reacción anóxica) y primariamente involucra fotoreacciones con DNA; el segundo tipo, tipo II es una reacción sensibilizada dependiente de oxígeno e involucra la formación de oxígeno "singlet" (1O_2), anión de superóxido (OJ)_# e hidroxiradicales. Figura 25.

La forma fotoreactiva de psoralen es su estado "triplet" y los sitios de reacción son 1) la membrana celular de la epidermis, la dermis y las células endoteliales; 2) los constituyentes citoplasmáticos tales como enzimas, RNA, lisosomas etc; 3) el núcleo celular (DNA y cromatina) y 4) producción por psoralen-sensibilizado de 1O_2 , OJ_t e hidroxiradicales, que se cree son responsables del daño de la membrana celular y de la vasodilatación. En efecto, estas formas reactivas podrían inducir la oxidación de los lípidos presentes en la membrana lipoproteica de la célula. El daño causado por el psoralen foto excitado presente en la membrana celular podría manifestarse en forma de edema celular que frecuentemente se observa en la reacción de fotosensibilización por psoralen.

El daño mayor sería iniciado por la reacción tipo I y podría ser visto en forma de daño nuclear al DNA resultante de la interacción de psoralen con DNA y en menor extensión con RNA. La respuesta de sensibilización de la piel (eritema, edema, daño de membrana, etc.) resultaría de una reacción tipo II que involucra generación de 1O_2 .

El uso de 8-MOP en terapia PUVA ha inducido a una intensa investigación de las propiedades bioquímicas y farmacológicas de los psoralenes. Es importante saber que la respuesta fototóxica depende de la vía de administración. Esta investigación ha sido motivada en parte por la necesidad de desarrollar compuestos para ser usados en PUVA terapéuticamente efectivos y sin la toxicidad aguda y crónica observada en la terapia con 8-MOP. Aunque se saben importantes hechos sobre el mecanismo de acción en PUVA, este mecanismo sigue siendo activamente investigado. La fotoadición covalente de psoralenes al DNA es considerado como el evento básico para explicar los efectos terapéuticos y toxicológicos de la fotobiología de la furocumarina.

Un nuevo abordaje se está considerando en los eventos inmunológicos. Sabemos que el tratamiento PUVA suprime la hipersensibilidad de contacto en animales de experimentación.²⁴

Clínicamente, pacientes tratados con PUVA revelan una disminución de la reactividad inmune y también algunas alteraciones en la función inmune.²⁵ Hay que dilucidar el rol de estos eventos en el mecanismo de PUVA-terapia.

Sin embargo hay mucha evidencia que sugiere que, como lo hemos consignado, la forma molecular por la cual los psoralenes inician una respuesta fototóxica o terapéutica; involucra intercalación de psoralen dentro del DNA, seguida de la formación de un "monoadduct" (por la absorción de un fotón) o un "diadduct" (por la absorción de dos fotones). La presencia y estructura de esta unión cruzada, propuesta primero por Colé²⁶ y por Dalí' Acqua et al²⁷ ha sido largamente basada en evidencia indirecta. Esto último conduce a unión cruzada complementaria de cadenas del DNA. Recientemente psoralenes "monoadducts" y "diadducts" han sido aislados y caracterizados

por alta resolución espectroscopia y resonancia magnética nuclear.

Tanto en humanos como en animales se ha demostrado que los compuestos estructuralmente similares 5-MOP y TMP producen fototoxicidad tóxica similar a 8-MOP.^{28,29} Recientemente este hecho ha sido aplicado por dos equipos europeos que han introducido el 5-MOP como una alternativa al 8-MOP en tratamiento PUVA de la psoriasis.²⁸⁻³⁰ Aunque 5-MOP y 8-MOP fueron comparables en cuanto a capacidad de limpiar lesiones de psoriasis, los efectos colaterales agudos (incluyendo fototoxicidad), fueron significativamente menos intensos con 5-MOP.

BASES QUÍMICAS DE LA ACTIVIDAD FOTSENSIBILIZANTE DE LAS ANGELICINAS

Recientemente algunos investigadores^{31,34} han preparado varias metilangelicinas. El objeto ha sido obtener nuevos agentes para la quimioterapia de la psoriasis con actividad antiproliferativa debido a su capacidad para inducir solamente lesiones monofuncionales al DNA de las células de la piel.

Las drogas comúnmente usadas para la fotoquimioterapia para las enfermedades de la piel caracterizadas por hiperproliferación celular son furocumarinas bifuncionales, por ejemplo psoralenes,^{35,36} este tratamiento es beneficioso, lo sabemos, pero tiene efectos colaterales. Por tanto, el uso de metilangelicinas, que actúan como compuestos monofuncionales podrán eliminar o minimizar algunos efectos colaterales de los psoralenes bifuncionales. Se está estudiando en la actualidad el riesgo de cáncer cutáneo ya que el problema de la fototoxicidad de la piel no se tiene con las metilangelicinas.^{31,34}

Generalmente la actividad antiproliferativa de las furocumarinas monofuncionales y bifuncionales es debida principalmente a su capacidad para inducir fotolesiones al DNA. Sin embargo en relación a la psoriasis, varios otros mecanismos pueden ser involucrados, tales como un mecanismo fotodinámico por formación de oxígeno "singlet", su fotoión a proteína, la fotoinactivación de enzimas y otros.^{37,40}

Hastamente los estudios realizados con angelicinas, parecen dar soporte a la idea de que, para estas furocumarinas angulares, el principal mecanismo responsable para su actividad fotosensibilizante está relacionado con su capacidad para fotoinducir lesiones monofuncionales al DNA.

Dall'Acqua et al⁴¹ consideran a las angelicinas como agentes potenciales para la fotoquimioterapia de enfermedades de la piel. No se produce vesiculación, no hay fototoxicidad. Sin embargo la recurrencia de la psoriasis se produce más rápidamente.

Con objeto de estudiar la naturaleza química de estas fotolesiones, los citados autores aislaron de los productos de hidrólisis de las fotocombinaciones entre cinco angelicinas y DNA, los correspondientes nuevos¹¹ monoadducts fluorescentes entre la doble unión 4', 5' de las furocumarinas y la doble unión 5, 6 de timina.

DIFERENCIA EN LA REACTIVIDAD TÓPICA Y SISTEMICA DE LOS PSORALENES

La aplicación tóxica de 8-MOP y 5-MOP, psoralen y TMP a la piel del dorso depilado de cobayos albinos seguida por irradiación UV a 320400 nm produjo fototoxicidad similar en un experimento conducido por Kornhauser et al.⁴² Estos mismos autores encontraron que la fototoxicidad sistémica determinada después de la administración oral de estos derivados psoralénicos, difirió significativamente. Los niveles sérico y epidérmico de 8-MOP, 5-MOP y TMP fueron determinados dos horas después de la administración. Los autores encontraron una relación lineal entre los niveles sérico y epidérmico de 8-MOP, pero el nivel de los otros derivados psoralénicos fue muy bajo. Los investigadores creen que la fototoxicidad oral reducida de 5-MOP y TMP con relación a la fototoxicidad de 8-MOP en cobayos, se debe a sus niveles reducidos en la epidermis. Con TMP tóxico hay fotoreactividad alta (mayor fotosensibilización). Menor fotoreacción con TMP oral (Biotransformación de TMP en metabolitos no fotosensibilizantes).

Sólo parcialmente se ha estudiado la mutagenicidad y la carcinogenicidad de varios derivados psoralénicos. Natarajan et al⁴³ han encontrado que in vitro 8-MOP y 5-MOP tienen la misma actividad inductora de daño cromosómico en células humanas.

Más aún, tópicamente 5-MOP y UV—A induce carcinogénesis en ratones, comparable a la inducida por 8-MOP⁴⁴. Estos dos estudios sugieren que 5- y 8-MOP tienen potencial oncogénico similar. Los datos correspondientes a TMP y psoralen son menos completos. La fotoreactividad de TMP hacia DNA excede altamente aquella de otros psoralenes naturales. La experiencia europea con 5-MOP muestra que la fototoxicidad no es necesaria para un efecto terapéutico. Sería importante que se continuaran estudios con 5-MOP y de otros derivados psoralénicos como una alternativa a 8-MOP en PUVA.

REFERENCIAS

- 1.- KISKE H. Experimentelle Untersuchungen zur Photosensibilisierung der Haut durch pflanzliche Wirkstoffe. Lichtsensibilisierung durch Furocoumarine als Ursache verschiedener phytogener Dermatosen. Arch Dermatol Syph. 1938, 178:112-123.
2. FAHMY IR, ABU-SHADY H. Ammi majus Linn: Pharmacological study and isolation of a crystalline constituent, ammoidin. QJ Pharm Pharmacol, 1947,20: 281-291.
3. EL MOFTY AM. A preliminary clinical report on the treatment of Leukoderma With Ammi majus Linn: J R Egypt Med Assoc. 1948,31: 651-665.
4. FITZPATRICK TB, HOPKINS CE, BUCKENSTAFF DD, et al. Augmented pigmentation and other responses of normal human skin to solar radiation following oral administration of 8-methoxypsoralen. J Invest Dermatol. 1955,25: 187-190.
5. MUSAJO L. Interessanti proprietà delle furocoumarine naturali. Fármaco (Sci). 1955, 101/4 539-558.
6. PATHAK MA. Mechanism of psoralen photosensitization and in vivo biological action spectrum of 8-methoxypsoralen. 1961, 37: 397-406.
7. MUSAJO L, RODIGHIERO G, DALL'ACQUA F. Evidences of a photoreaction of the photosensitizing furocoumarins with DNA and with pyrimidine nucleosides and nucleotides. 1965,21: 24-25.
8. MUSAJO L, VISENTINI P, BACCICHETTI F, et al. Photoinactivation of Ehrlich Ascites tumor cells obtained with Skin-Photosensitizing furocoumarins. Esperientia. 1967, 23: 335-336.
9. DALL'ACQUA F, MARCIANI S, BORDIN F, et al. Studies on the photoreaction (465 nm) between psoralen and thymine. Ric Sci (Rome). 1968,38: 1094, 1099.
10. PATHAK MA, KRAMER DM: Photosensitization of skin in vivo by furocoumarins (Psoralens). Bioclim Biophys Acta. 1969, 195: 197-206.
11. PARRISH JA, FITZPATRICK TB, TANENBAUM L, et al. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. N Engl J Med. 1974, 291: 1207-1211.
12. MELSKI JW, TANENBAUM L, PARRISH JA, et al. Oral methoxsalen photochemotherapy for the treatment of psoriasis: A cooperative clinical trial. J. Invest Dermatol. 1977,68: 328-335.
13. WOLFF K: PUVA 1979, Klinik und Praxis. In Fortschritte der Praktischen Dermatologie und Venerologie (Braun-Falco O, Wolff HH, eds), Vol 9. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1979, pp 129-138.
14. HONIGSMANN H, JASHKE E, GSCHNITZ F, et al. 5-Methoxypsoralen (bergapten) in photochemotherapy of psoriasis. Br J Dermatol. 1979, 101:369-377.
15. MUSAJO L, RODIGHIERO G, Mode of photosensitizing action of furocoumarins. In Photophysiology (Giese AC, ed), Vol. VII. York: Academic Press. 1972, pp 115-147.

16. PATHAKMA, KRAMER DM, FITZPATRICK TB. Photobiology and photochemistry of furocoumarins (psoralen). In *Sunlight and Man: Normal and abnormal photobiologic Responses* (Fitzpatrick TB, PATHAK MA, Harber LC, et al, eds). Tokyo: Univ. Tokyo Press. 1974, pp 335-368.
17. SONG P—S, GAPLEY KJ. Photochemistry and photobiology of psoralen *Photochem Photobiol.* 1979;29: 1177-1197.
18. DUBERTRET L. AVERBECK D, ZAJDELA F, et al. Photochemotherapy (PUVA) of psoriasis using 3-carbethoxypsoralen, a non-carcinogenic compound in mice. *Br J Dermatol.* 1979, 101: 379-389.
19. BORDIN F, CARLASSRE F, BACCICHETTI F, et al. 4,5'-Dimethylangelicin, A new DNA-photobinding monofunctional agent. *Photochem Photobiol.* 1979;29: 1063-1070.
20. DALL'ACQUA F, VEDALDI D, GUIOTTO A, et al. Methylangelicins: New potencial agents for the photochemotherapy of psoriasis. Structure activity studies on the dark and photochemical interactions with DNA. *J Med Chem.* 1981, 24: 806-811.
21. PATHAK MA, FITZPATRICK TB. Certain biological and therapeutic properties of linear and angular furocoumarins (Psoralens and isopsoralens). Presented at the Ninth Annual Meeting of the American Society for Photobiology. Williamsburg, Va. 1981, (ABSTRACT TAM E-1).
22. RODIGHIERO G, DALL'ACQUA F. In vitro photoreactions of selected psoralens and methylangelicins with DNA, RNA, and proteins. *Nati Cáncer Inst mongr.* 1984, 66:3140.
23. PATHAK MA, JOSHI PC: The nature and molecular basis of cutaneous photosensitivity reactions to psoralens and coal tar. *J Invest Dermatol.* 1983, 80 (suppl): 66s-74s.
24. MORISSON WL, WOEHLE ME, PARRISH J A. PUVA and systemic immuno-suppression in guinea pigs. *J Invest Dermatol.* 1979, 72: 273.
25. MORISON WL, PARRISH JA, BLOCK KJ, et al: Transient impairment of peripheral blood lymphocyte function during PUVA therapy. *Dr. J Dermatol.* 1979, 101:391-397.
26. COLÉ RS: Light-induced cross-linking of DNA in the presence of a furocoumarin (psoralen). *Biochim Biophys Acta.* 1970, 217: 30-39.
27. DALL'ACQUA F, MARCIANI S, CIAVATTA L, et al. Formation of inter-strand cross-linkings in the photoreactions between furocoumarins and DNA. *Z Naturforsch (C).* 1971, 266: 561-569.
28. HONIGSMANN H, JASCHKE E, GSCHNAIT F, et al 5-Methoxy psoralen (bergapten) in photochemotherapy of psoriasis. *Br J Dermatol.* 1979, 101:369-378.
29. MANDULA BB, PATHAK MA. Photochemotherapy: Identification of a metabolite of 4, 5', 8-trimethylpsoralen. *Science.* 1976, 193: 1131-1134.
30. GRUPPER C, BERRETT B, 5-MOP in PUVA and Re-PUVA a monocentric study: 250 Patients with a follow-up three years. Presented at the Third international Symposium on Psoriasis, Stanford, Calif, 1981.
31. BORDIN F, CARLASSARE F, BACCICHE—TTI F, et al. 4,5'-Dimethyl-angelicin: a new DNA-photobinding monofunctional agent. *Photochem Photobiol.* 1979;29: 1063-1079.
32. BACCICHETTI F. BORDIN F, CARLASSARE R, F, et al. Furocoumarine Pour la photochimiotherapie du psoriasis et d'autres maladies de la peau qui sont lui sensibles. Belgian Patent N-888413, August, 1980.
33. DALL'ACQUA F, VEDALDI D, CAFFIERI S, et al. New monofunctional Reagents for DNA as possible agents for the photochemotherapy of psoriasis: Derivatives of 4,5'-dimethylangelicin. *J Med. Chem.* 1981, 24: 178-184.

34. GUIOTTO A, RODICHIRO P, PASTORINI G, et al. Synthesis of some photosensitizing methylangeticins, as monofunctional reagents for DNA. *Eur J Med Chem.* 1981, 16: 489-494.
35. PARRISH JA, FITZPATRICK TB, TANENBAUM L. et al. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N Engl J Med.* 1974, 291: 1207-1211.
36. WOLFF K, FITZPATRICK TB, PARRISH JA, et al. Photochemotherapy for psoriasis with orally administered methoxsalen. *Arch Dermatol.* 1976, 112: 943-950.
37. POPPE W, GROSSWEINER LI. Photodynamic sensitization by 8-methoxypsoralen via the singlet oxygen mechanism. *Photochem Photobiol.* 1975, 22: 217-219.
38. DE MOL NJ, BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUVEN GM. Relation between some photobiological properties of furocoumarins and their extent of singlet oxygen production. *Photochem Photobiol.* 1981, 33: 815-819.
39. VERONESE FM, SCHIAVON O, BEVILACQUA R, et al. Drug-protein interaction: 8-Methoxypsoralen as photosensitizer of enzymes and amino acids. *A Naturforsch (C).* 1979,34: 392-396.
40. VERONESE FM, SCHIAVON O, BEVILACQUA R, et al. The effect of psoralens and angelicins on proteins in the presence of UV—A irradiation. *Photochem Photobiol.* 1981,34: 351-354.
41. DALL'ACQUA F, VEDALDI D, Caffien S, Guiotto A, et al. Chemical basis of the photosensitizing activity of angelicins. *Nati Cáncer Inst Monogr.* 1984, 66: 55-60.
42. KORNHAUSER A, WAMER W G, Giles AL jr, Difference in topical and systemic reactivity of psoralens: Determination of epidermal and serum levels. *Nati Cáncer Inst Monogr.* 1984,66: 97-101.
43. NATARAJAN AT, VERDEGAAL-1NMERZEEL EA, ASHWOOD-SMITH MU, et al, Chromosomal damage induced by furocoumarins and UVA in hamster and human cells including cells from patients with ataxia telangiectasia and xeroderma pigmentosum. *Mutat Res.* 1981,84; 113-124.
44. ZAJDELA F, BISAGNI E. 5-Methoxypsoralen, and melanogenic additive in sun-tan preparations, is tumorigenic in mice exposed to 365 nm UV radiation. *Carcinogenesis.* 1981,2: 121-127.