

3.4 SENSIBILIZACIÓN

A nivel macroscópico se observó un moderado eritema y edema. Las lecturas obtenidas con la última administración de la sustancia fueron mayores comparadas con aquellas de las primeras administraciones (Figuras 20 y 21).

A nivel histopatológico las áreas control no mostraron cambios en la epidermis. En cambio, en la dermis se identificó un infiltrado de predominio perivascular compuesto de eosinófilos y linfocitos. Además, se manifestó edema y dilatación vascular (Figura 22).

Las áreas tratadas con la Peroxisomicina A_1 presentaron espongiosis a nivel de la epidermis, mientras que en la dermis superficial media se observó necrosis, así como formación de microabscesos compuestos de eosinófilos, polimorfonucleares y escasas células plasmáticas (Figura 23). El infiltrado se dispuso alrededor de arteriolas de pequeño calibre y anexos cutáneos (Figura 24). Además, se denotó una disminución importante del glucógeno en las fibras musculares de la piel. Por otra parte, no se observaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en los órganos blanco.



Figura 20

Fotografía de la piel de conejo con administración ID del vehículo 24 horas después.



Figura 21

Fotografía de la piel de conejo con administración ID de Peroxisomicina A₁
24 horas después.

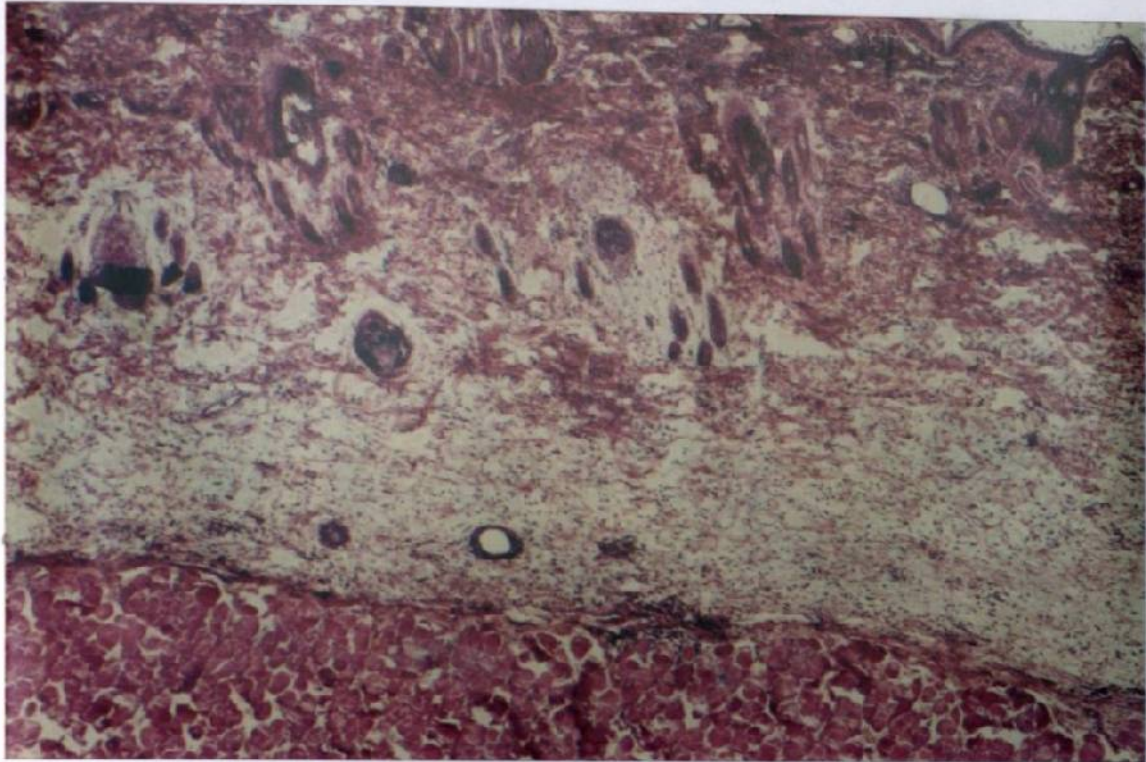


Figura 22

Corte de piel control con administración ID del vehículo.

Se observa un discreto edema. H y E 20X.

H y E 40X.

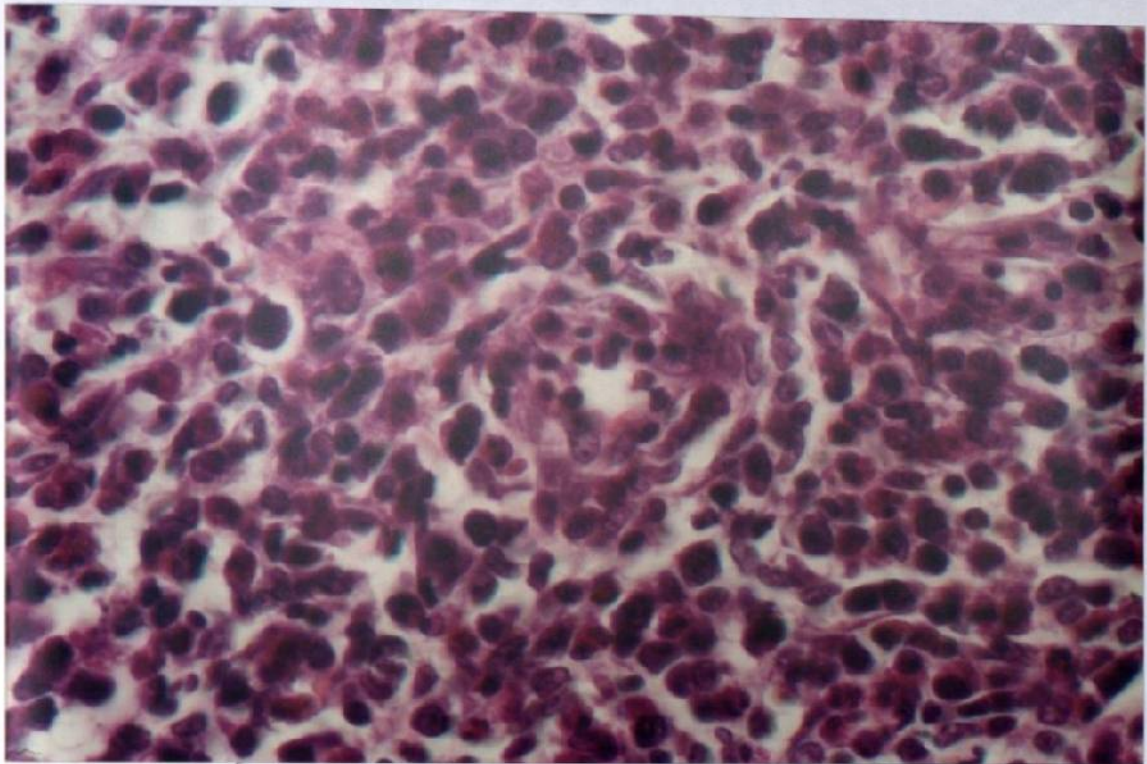


Figura 23

Corte de piel con administración ID de Peroxisomicina A₁ al 1/1000. Se observa formación de microabscesos con PMN, eosinófilos y daño vascular.

H y E 40 X.

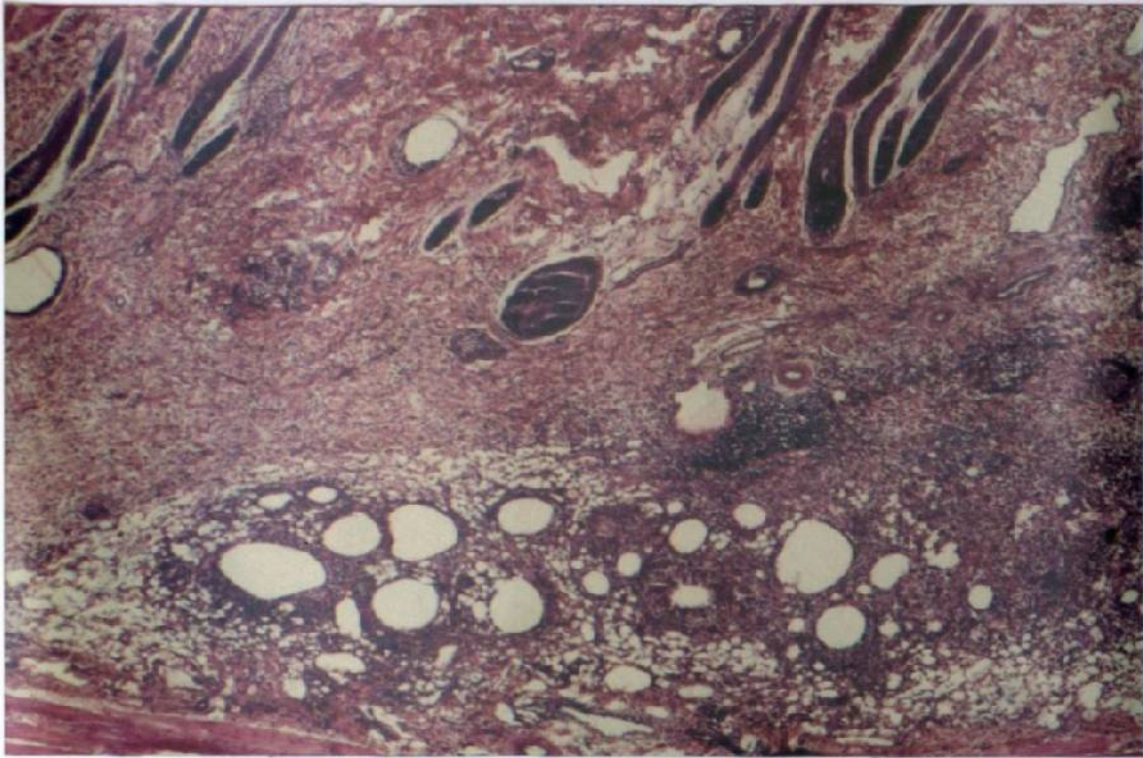


Figura 24

Corte de piel con administración ID de Peroxisomicina A_1 al 1/1000. Se observa infiltrado inflamatorio agudo perivascular y perianexial. H y E 20X.

3.5 FOTOTOXICIDAD

A nivel macroscópico, la exposición a luz ultravioleta no ocasionó eritema en la piel no tratada del conejo, 24 horas después de la irradiación. Las áreas de la piel tratadas con las soluciones de la Peroxisomicina A_1 expuestas o no a la radiación no desarrollaron reacciones de irritación,

y fueron cualitativamente similares a las áreas control, tanto en el área radiada como en la no radiada que sólo recibieron el vehículo. En las áreas tratadas con 8-MOP con exposición a la luz ultravioleta se manifestó un intenso eritema y edema (Figuras 25 y 26).

Los hallazgos histopatológicos en las áreas de piel tratadas con la Peroxisomicina A₁ al 1 y 3%, tanto radiadas como no radiadas, mostraron cambios similares a los controles negativos, caracterizados por una discreta espongirosis y edema de la dermis superficial y media (Figuras 27 y 28). Con la solución al 9%, tanto radiada como no radiada, se observó un moderado infiltrado mononuclear perivascular, activación de fibroblastos y fibras musculares con disminución importante del glucógeno. Por otro lado, las áreas tratadas con 8-MOP con exposición a luz ultravioleta mostraron cambios significativos a las 72 horas, caracterizados por espongirosis, eritema, exfoliación de la capa superficial de la epidermis, regeneración en el epitelio con pseudoestratificación e infiltrado inflamatorio agudo (Figura 29). No se observaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en los órganos blanco.



Figura 25

Fotografía de la piel de conejo expuesto a la administración vía tópica de las diferentes soluciones de la Peroxisomicina A₁, vehículo y 8-MOP 24 horas después de la exposición a la luz UV.



Figura 26

Fotografía de la piel de conejo expuesto a la administración vía tópica de la Peroxisomicina A_1 al 9%, vehículo y 8-MOP 24 horas después de la exposición a la luz UV.

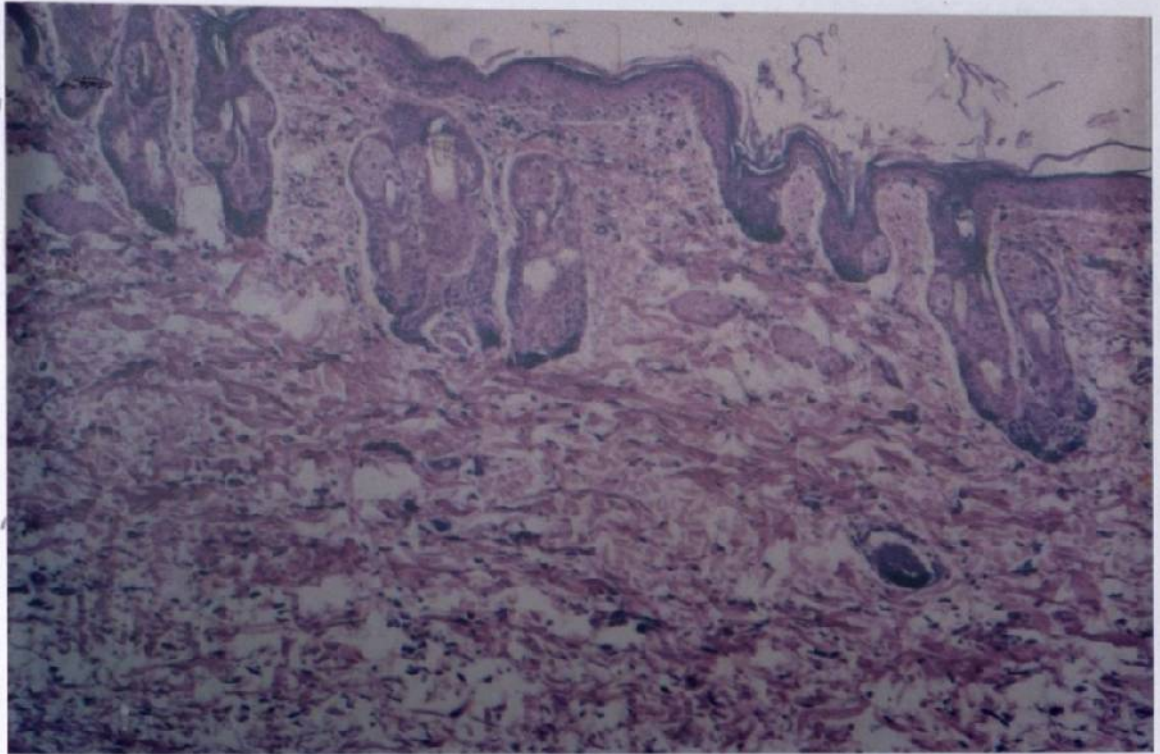


Figura 27

Corte de piel control sin exposición a la luz UV y con administración vía tópica del vehículo. Se observa discreto edema y espongiosis. H y E 20X.

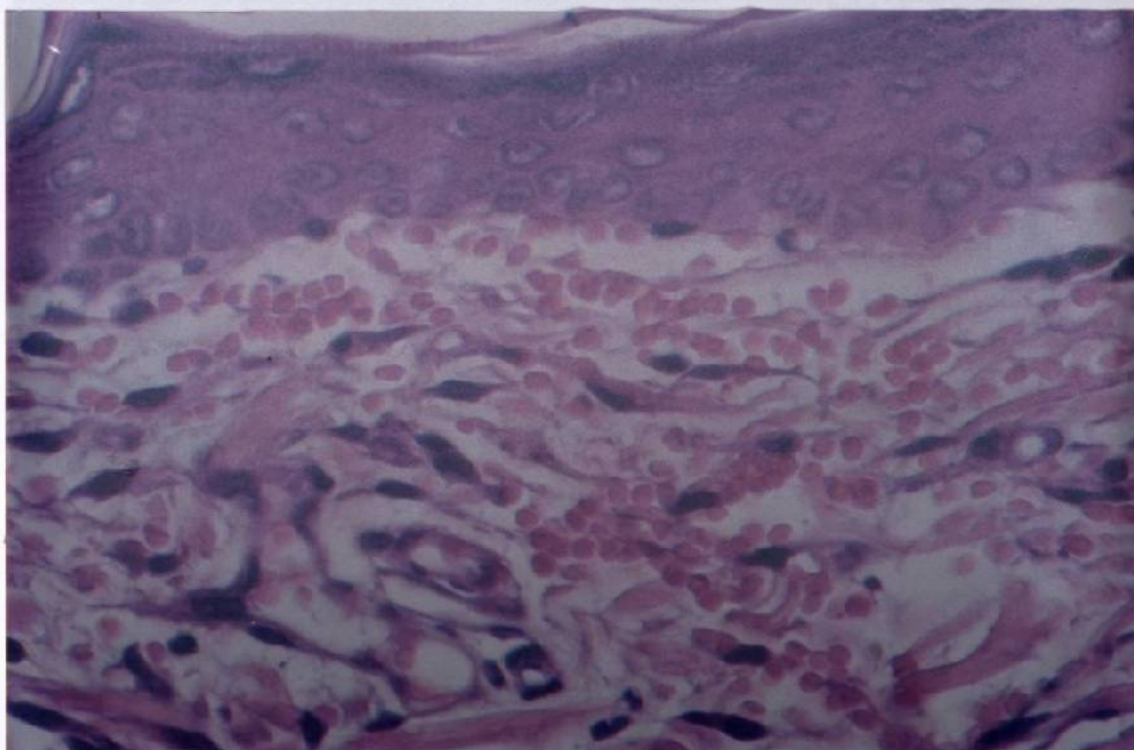


Figura 28

Corte de piel con aplicación vía tópica de Peroxisomicina A₁ al 1%.

Se observa discreto edema y espongiosis. H y E 20 X.

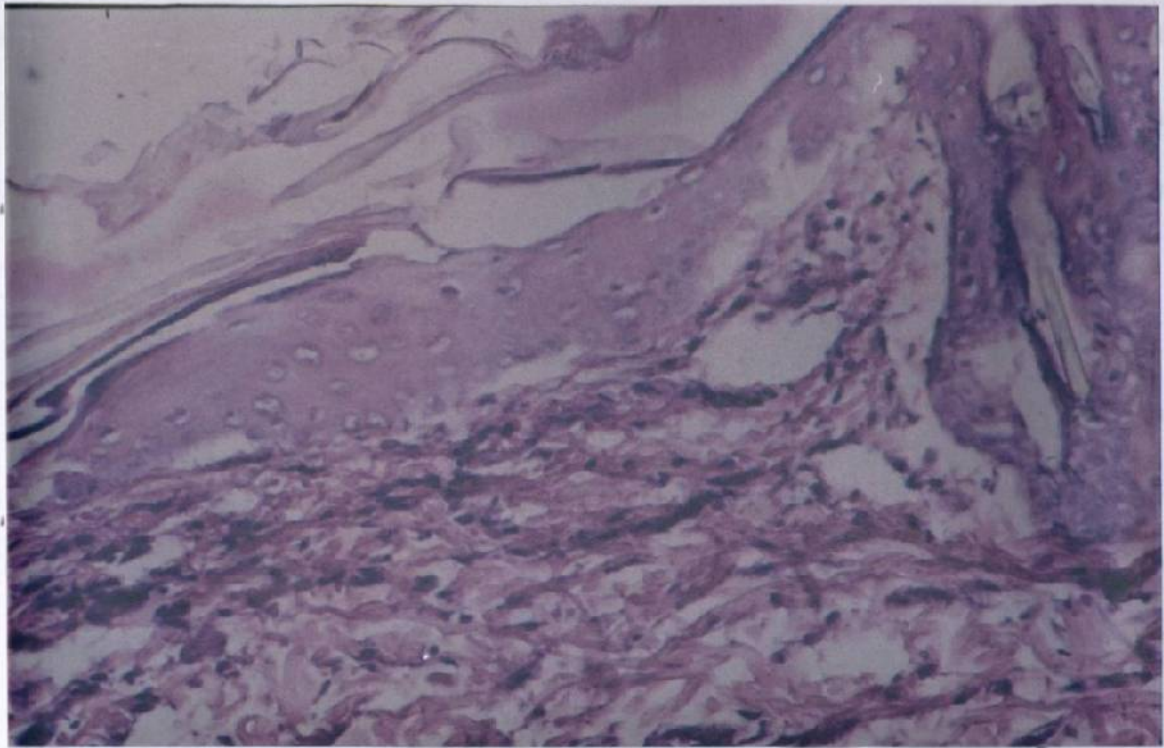


Figura 29

Corte de piel con aplicación vía tópica de 8-MOP al 1%. Se observa reactividad del epitelio con espongiosis, infiltrado inflamatorio agudo y edema de la capa basal. H y E 20X.

3.6 FOTOPIGMENTACIÓN

A nivel macroscópico, las áreas de piel tratadas con las soluciones de la Peroxisomicina A₁ expuestas o no a la radiación no desarrollaron reacciones de fotopigmentación y fueron cualitativamente similares a las áreas control

tanto en el área radiada como en la no radiada, que sólo recibieron el vehículo. En las áreas tratadas con 8-MOP (control positivo) con exposición a la luz UV, se observó un intenso eritema, edema y pigmentación. La reacción de fotopigmentación fue precedida de eritema.

A nivel histopatológico se llevaron a cabo cambios escasos y similares a los controles, caracterizados por discreta espongirosis y edema de la dermis (Figura 30). Con la solución al 9% tanto radiada como no radiada, se manifestó un moderado infiltrado mononuclear perivascular, activación de fibroblastos y fibras musculares con disminución importante del glucógeno.

Las áreas con 8-MOP mostraron daño en la epidermis caracterizado por edema, fibrosis perianexial y necrosis individual de células. Además, se observó un incremento en la capa granular, hiperplasia discreta de melanocitos, detritus celulares subcorneales y fibrosis (Figuras 31 y 32). Tampoco se produjeron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en los órganos blanco.

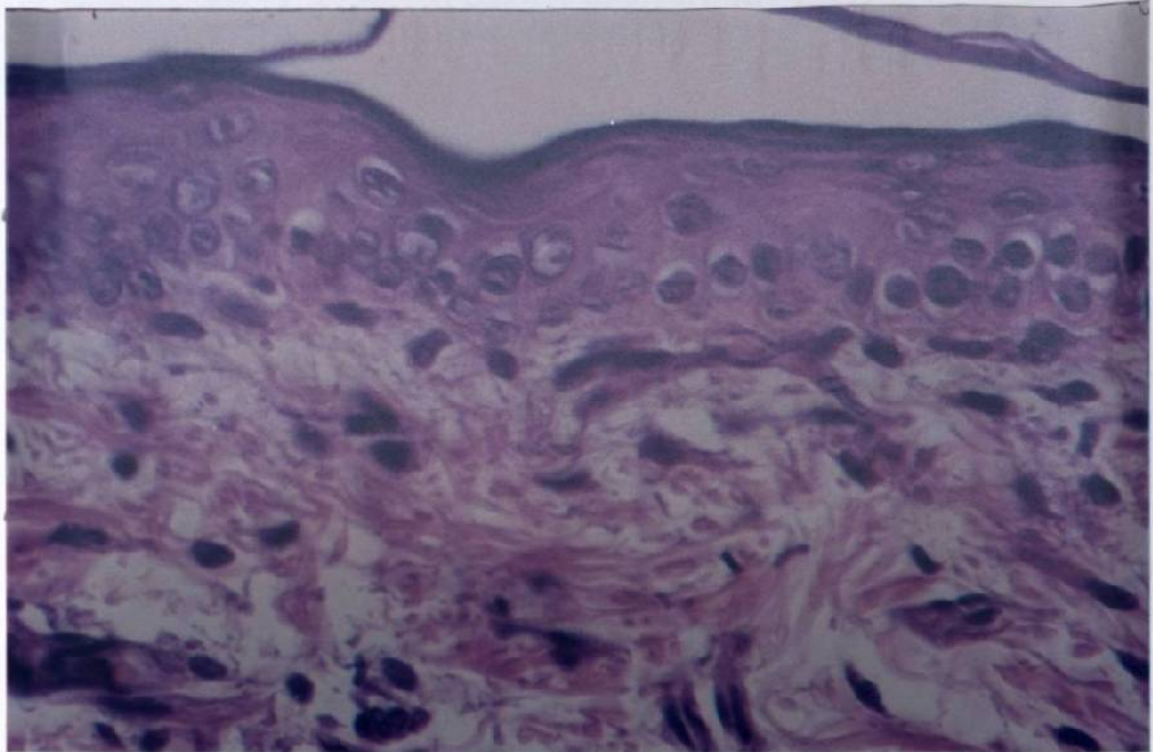


Figura 30

Corte de piel control con administración vía tópica de la Peroxisomicina A₁ al 9%. Se observa discreto edema y espongiosis. H y E 20X.

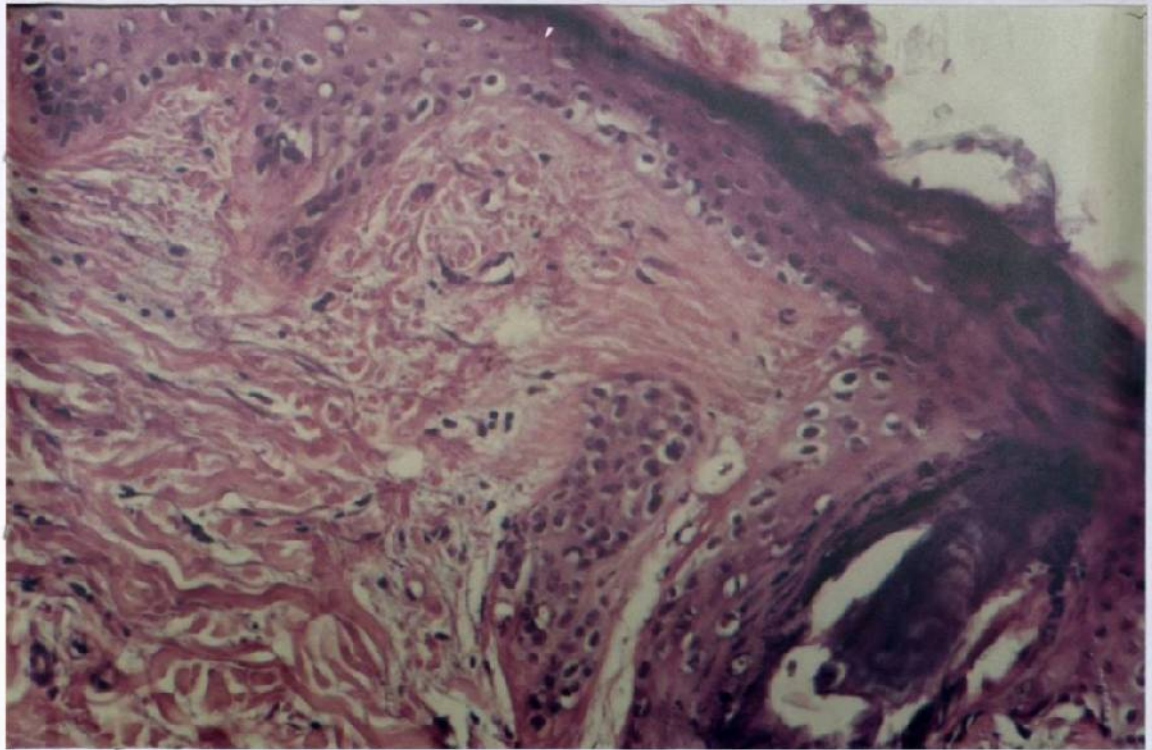


Figura 31

Corte de piel con aplicación vía tópica de 8-MOP al 1%. Se observa hiperplasia melanocítica. H y E 20 X.

En todos los estudios de toxicidad aguda no se encontró diferencia significativa entre el área control con administración del vehículo y las áreas de aplicación de la Peroxisomicina A₁ con una p < 0.001.

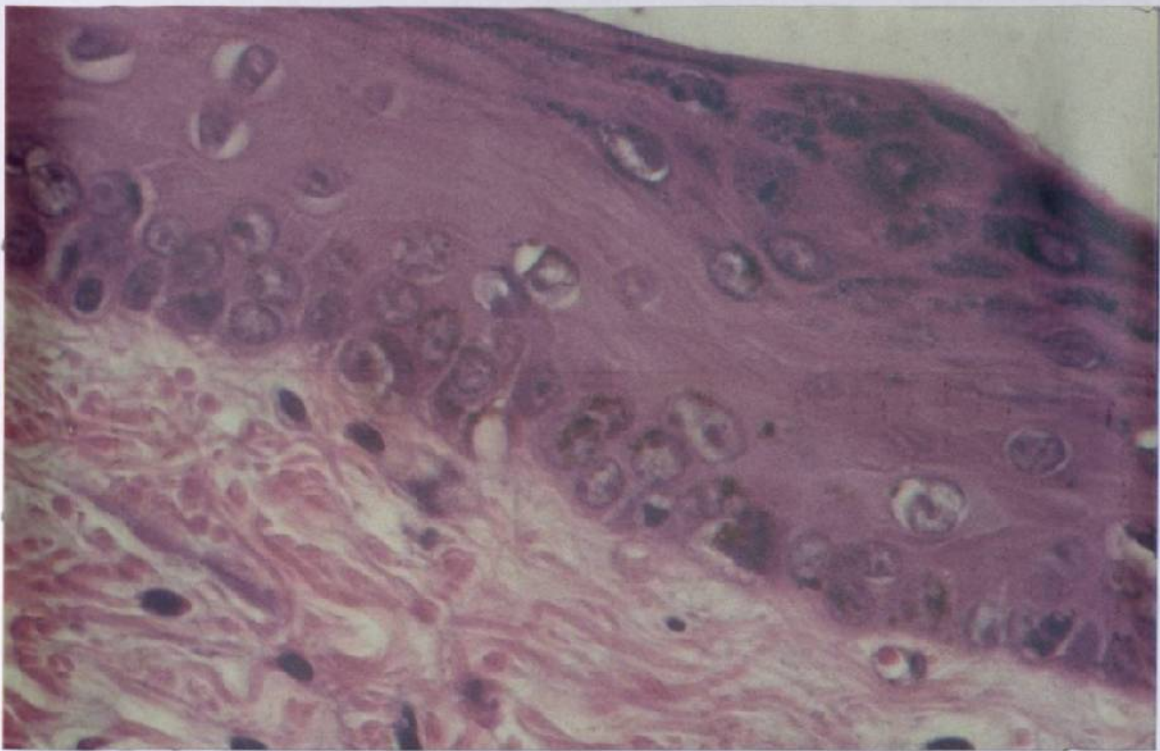


Figura 32

Corte de piel con aplicación vía tópica de 8-MOP al 1%. Se observa incremento en la producción de melanina y queratinocitos pigmentados.

H y E 40X.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los estudios de toxicidad dérmica no se encontró diferencia significativa entre el área control con administración del vehículo y las áreas de aplicación de la Peroxisomicina A₁ con una $p > 0.001$.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

El presente trabajo representa una investigación sistemática *in vivo* de la irritación en la piel y del potencial tóxico de la Peroxisomicina A₁ administrado por vía tópica.

En los últimos 20 años, se han empleado diversos agentes quimioterapéuticos aplicados tópicamente en la piel, ya sea sólo o en combinación con otras formas de terapia. Por ejemplo, la mostaza nitrogenada se utilizó tópicamente en el tratamiento de la micosis fungoide por Haserick y cols⁽⁷¹⁾. Así mismo, el 5-Fluorouracilo (5-FU) ha demostrado su efectividad administrado vía tópica en pacientes con lesiones precancerosas ⁽⁷²⁾. Este hecho ha sido confirmado por Dillaha y cols.⁽⁷³⁾. Además, la aplicación tópica de agentes antineoplásicos como la Lomustina ⁽⁷⁴⁾, Mecloretamina ⁽⁷⁵⁾ y 5-FU ⁽⁷²⁾ han sido empleados satisfactoriamente en el tratamiento de la psoriasis.

Por tal razón, nos pareció importante conocer la respuesta tóxica cutánea en piel por aplicación tópica de la Peroxisomicina A₁ y se utilizó para ello pruebas convencionales de toxicidad cutánea.

En este trabajo se utilizó la Peroxisomicina A₁ que cumplió con los parámetros de calidad establecidos por el Departamento de Farmacología y Toxicología (Tabla 4) que consideran el valor de la pureza química y la actividad biológica.

4.1 TOXICIDAD TÓPICA

El método modificado de Draize⁽²⁵⁾ que se utilizó en este trabajo es útil gracias a que permite distinguir entre sustancias químicas que son consideradas irritantes severos o moderados de aquellas que representan poco o ningún potencial irritante para el hombre. Así mismo, la técnica de dilución que se empleó, resultó adecuada para determinar la concentración no irritante de la Peroxisomicina A₁ y de esta manera reducir el riesgo de irritación de futuros estudios en el humano.

En relación al valor encontrado del Índice de Irritación Primaria (IIP) de 0.3 ± 0.1 , la Peroxisomicina A₁ resultó ser una sustancia no irritante. En la Tabla 9 se muestra el Índice de Irritación Primaria de la sustancia en cuestión y de otras sustancias antineoplásicas que han sido estudiadas por diversos autores bajo este mismo método ⁽²⁵⁾. Así mismo, la Ley Federal de Sustancias Peligrosas de los Estados Unidos de Norteamérica (FHSA) especifica que un compuesto es considerado no irritante peligroso si su IIP en el conejo es menor de 5 y potencialmente irritante peligroso si su IIP es mayor de 5. Por lo tanto, de acuerdo a este criterio la Peroxisomicina A₁ sería considerada una sustancia no irritante. Pero cabe destacar que otras sustancias, como los blanqueadores a base de hipoclorito de calcio,

que podría juzgarse como seguras a los ojos de varios autores (3,4), resultan como irritantes severos al observar los resultados en el hombre. Por otra parte, la FHSA define a una sustancia como corrosiva si causa una destrucción visible o irreversible en el tejido en el sitio de contacto. Aunque el significado del término "destrucción visible" no esté claro, en términos generales, la destrucción visible podría significar la muerte de células que se traducen en un esfacelamiento de la superficie de la epidermis.

Una de las diferencias más importantes en los estudios de irritación es que en las pruebas realizadas en animales se utilizan sitios con abrasión, lo cual no pueden ser realizados en el hombre. El uso de los sitios de abrasión se basa en el procedimiento original del método de Draize (18), que fue diseñado originalmente para evaluar medicamentos de uso tópico y cosméticos sobre piel dañada.

En este trabajo no se observó irritación en las áreas control de la piel del conejo con la aplicación del vehículo, lo que nos indica una adecuada técnica y rotación de los sitios de aplicación. A nivel histopatológico el daño epidérmico y dérmico se clasificó como leve a las concentraciones de 1 y 3% y como moderado al 9%. Por otra parte, en estudios realizados por Bermúdez y cols (76) en monos *Cynomolgus (Macaca fascicularis)* encontraron depleción

del glucógeno en las fibras musculares del corazón. Es importante mencionar, que esta depleción del glucógeno también fue observada en las fibras musculares de la fascia superficial de la piel en todas las pruebas realizadas en este estudio.

TABLA 9

Comparación del índice de irritación primaria (IIP) de varias sustancias antineoplásicas y la Peroxisomicina A₁

Compuesto	Conc.	IIP	Compuesto	Conc.	IIP
Cicloheximida	9%	4.1	Vincristina	9%	3.1
	3%	3.8		3%	1.9
	1%	4.3		1%	0.7
	0a	0.0		0b	0.2
	X = 4.1 ± 0.2			X = 1.9 ± 1.2	
Adriamicina	9%	1.5	5 - Fluorouracilo	9%	0.7
	3%	1.2		3%	0.9
	1%	0.9		1%	0.5
	0b	0.0		0a	0.1
	X = 1.2 ± 0.3			X = 0.7 ± 0.2	
Ciclofosfamida	9%	0.7	Peroxisomicina A ₁	9%	0.5
	3%	0.2		3%	0.3
	1%	0.4		1%	0.2
	0a	0.2		0c	0.0
	X = 0.4 ± 0.2			X = 0.3 ± 0.1	
6 - Tioguanina	9%	0.3	6 - Mercaptopurina	9%	0.0
	3%	0.2		3%	0.0
	1%	0.2		1%	0.0
	0d	0.1		0a	0.0
	X = 0.3 ± 0.1			X = 0.0	

a: Metil celulosa al 2%
b: Agua destilada
c: Etanol 96%
d: Metil celulosa al 1%

(24)

Phillips, L., y cols., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 21, 369-382. (1972).

Con la Peroxisomicina A₁ el infiltrado inflamatorio sólo se observó con la concentración del 9% y fue de predominio mononuclear. Murphy y cols (25) han observado alteraciones macroscópicas y microscópicas en órganos potencialmente considerados como órganos blanco como el hígado, las que han sido atribuídas a la presencia de agentes patógenos como *Coccidia* hepática (*Ermeria stiedae*) y/o a céstodos (*Taenia sp.*). En este estudio no se encontró alteración de ninguna especie.

4.2 TOXICIDAD SUBCUTÁNEA

En los ensayos clínicos en el momento actual, se han llevado a cabo con dosis de 40 mg/m² por vía IV, lo cual nos da una dosis de 4 µg/cm² de superficie corporal. Sin embargo, en esta prueba se aplicaron dosis desde 5 hasta 100 µg/cm² y no se observó toxicidad sistémica.

Con la administración subcutánea el daño fue proporcional a la dosis. Con dosis superiores a 50 µg/cm², se observaron alteraciones en los vasos sanguíneos los que presentaron trombosis y necrosis de los anexos epidérmicos, seguido de una reactividad vascular con lesión a la musculatura y anexos. Con las concentraciones de 80 a 100 µg/cm² se observó trombosis

vascular en la dermis superficial, media y profunda, con moderado daño muscular y necrosis epidérmica de tipo isquémico. Así pues, los daños se clasificaron como leves con la dosis de 5 a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, como moderados con la dosis de 60 a 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y como severos con la dosis de 80 a 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

4.3 SENSIBILIZACIÓN

La mayoría de las sustancias químicas de uso común tienen la capacidad de causar sensibilización en la piel. Consecuentemente, es importante conducir una evaluación completa y precisa del riesgo cuando se anticipa que alguna sustancia química entrará en contacto con la piel humana. Tal evaluación de riesgo debe relacionar la naturaleza y el grado de la exposición dérmica con la potencia sensibilizante de la sustancia química.

Los resultados en esta prueba mostraron un infiltrado alrededor de arteriolas de pequeño calibre y anexos cutáneos, compuesto por eosinófilos, polimorfonucleares y escasas células plasmáticas. Por otro lado, no se encontraron macrófagos dérmicos, que comunmente se manifiestan durante la sensibilización tipo retardada (77, 78, 79).

Hasta el momento, no existen reportes en la literatura acerca de la presencia de mastocitos y linfocitos con la administración de la Peroxisomicina A₁, y sólo hay algunos donde se menciona la presencia de infiltrado linfocitario y fagocitos en nervios periféricos y músculo esquelético de cabras (41).

4.4 FOTOTOXICIDAD Y FOTOPIGMENTACIÓN

La interacción de la luz y sustancias químicas para provocar reacciones en la piel, es un proceso muy complejo que da como resultado cambios fisiológicos tanto en la capa dérmica como la epidérmica. Así pues, la radiación ultravioleta es conocida por ser el agente causal que genera la mayor parte de los cambios crónicos en la piel, sin embargo, el grado y naturaleza de las reacciones fototóxicas que contribuyen en este proceso no están totalmente dilucidadas.

El procedimiento descrito en este trabajo fue empleado satisfactoriamente para la detección de fototoxicidad de la Peroxisomicina A₁ en conejos Nueva Zelanda.

Con la administración de la Peroxisomicina A_1 a concentraciones al 1, 3 y 9% no se observaron efectos de fototoxicidad ni de fotopigmentación. En esta prueba se utilizó el 8-MOP en uno de los lugares de prueba disponibles, ya que prácticamente todas las investigaciones biológicas de este tipo lo utilizan como control positivo (13,14, 15, 16). Este produjo una evidente reacción fototóxica que nos sirvió para establecer la capacidad de la fuente luminosa de generar respuestas fototóxicas.

Por otra parte, el vehículo puede influenciar de alguna forma la intensidad de la reacción, como ha sido demostrado por Marzully y Maibach (80), y por Kaidbey y Kligman (81) en el caso del 5-metoxipsoraleno. Cabe mencionar que el vehículo que se usó en este trabajo no ocasionó problemas en la diferenciación entre un compuesto fototóxico y no fototóxico. Así mismo, el método que se utilizó para remover el pelo (rebajar y después rasurar) de la región dorsal de los conejos, no afectó los resultados. Además, no se emplearon cremas depiladoras o algún otro producto que pudiera interferir con la evaluación de éstas.

Con el fin de asegurar la reproducibilidad de este estudio, se tomó en cuenta las características completas de la luz con las que se trabajó, así como también las condiciones de irradiación, entre ellas la duración de la

exposición, la distancia entre la lámpara y la piel y la energía liberada. En este punto cabe destacar la importancia del tiempo de irradiación, ya que existe una estrecha correlación entre la severidad de la fototoxicidad y el incremento de la duración de la irradiación ultravioleta (82, 83).

Los resultados obtenidos en este estudio con el 8-MOP a nivel histopatológico fueron similares a aquellos previamente reportados por Weil y cols⁽¹²⁾ y Forbes y cols⁽¹³⁾ los que consistieron en eritema, exfoliación de la capa superficial de la epidermis e infiltración de neutrófilos.

Por otro lado, resulta interesante mencionar que no se detectó la Peroxisomicina A₁ en la sangre de los conejos en ninguna de las pruebas realizadas. Además, debido a que no se encontraron alteraciones hepáticas, pulmonares y renales, considerados como órganos blanco, se puede afirmar que por esta vía y a las dosis administradas no se produce daño sistémico. Cabe mencionar que si bien la Peroxisomicina A₁ es una sustancia fotosensible, la ausencia de actividad fototóxica no puede explicarse aún hasta el momento de la elaboración de este trabajo, debido a que todavía no se han identificado los posibles metabolitos o fotoproductos de dicha sustancia. Sin embargo, la seguridad de que el fotoproducto se encuentre libre de características fototóxicas en la piel, será una importante consideración en el

total de las evaluaciones de la seguridad de esta sustancia en particular. El esclarecimiento de este problema, pudiera ser la base de estudios subsecuentes en la terapia fotodinámica del cáncer de la piel.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En todas las pruebas realizadas de toxicidad dérmica con la Peroxisomicina A₁, se observó que la respuesta fue dosis-dependiente.

En todas las pruebas realizadas a nivel histológico se demostró una disminución importante del glucógeno en las fibras musculares de la piel.

La Peroxisomicina A₁ no produjo daño sistémico en los órganos blanco como hígado, pulmón y riñón tanto a nivel macroscópico como microscópico.

En todas las pruebas realizadas no se detectó la Peroxisomicina A₁ en sangre. Esto podría indicar que esta sustancia no se absorbe por piel a las dosis administradas.

La Peroxisomicina A₁ administrada vía tópica no produjo efectos de fototoxicidad ni de fotopigmentación.

De acuerdo al Índice de Irritación Primaria (IIP) que se obtuvo, se consideró a la Peroxisomicina A₁ como una sustancia no irritante.

La Peroxisomicina A₁ administrada vía intradérmica produjo ligera sensibilización.

Debido a la alta toxicidad selectiva encontrada en el cultivo de células de melanoma ⁽⁵⁴⁾ y a la baja toxicidad que mostró en su aplicación tópica, así como su falta de absorción por piel, ha despertado un gran interés por sus posibilidades terapéuticas en el tratamiento del cáncer de piel al utilizarse sólo o con otras formas de tratamiento.

REFERENCIAS

- 1.- Abreu, L.M. Introducción a la medicina interna. 1a. Edición. Ed. Méndez Cervantes. 151-158. (1989).
- 2.- Brown, V.K.H. A comparison of predictive irritation tests with surfactants on human and animal skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 22, 411-420. (1971).
- 3.- Rieger, M.M. and Batista, G.W. Some experiences in the safety testing of cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 15, 161-172. (1964).
- 4.- Kligman, A.M. and Wooding, W.M. A method for the measurement and evaluation of irritants on human skin. *J. Invest. dermatol.* 49, 78-80. (1967).
- 5.- Clark, W.G., Brater, D.C. and Johnson, A.R. Farmacología clínica. 6a. Edición. Ed. Médica Panamericana. 22 - 33. (1991).
- 6.- Goodman Gilman, A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9a. Edición. Ed. Interamericana. 1697 - 1702. (1996).

- 7.- Weil, C.S. Guidelines for experiments to predict the degree of safety of a material for man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 21, 194 - 199. (1972).
- 8.- Weil, C.S. Abnormal values in control groups during repeated-dose toxicologic studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 14, 335 - 339. (1969).
- 9.- Kinmont, P.C. Skin reactions to cosmetics preparations. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 15, 3-32. (1964).
- 10.- Skog, E. Incidence of cosmetic dermatitis. *Contact Dermatitis.* 6, 449-451. (1980).
- 11.- Menkart, J. An analysis of adverse reactions to cosmetics. *Cutis.* 24, 599-662. (1979).
- 12.- Weil, C.S. and Scala, R.A. Study of intra and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 19, 276 - 360. (1971).

- 13- Forbes, P.D., Davies, R.E. and Urbach, F. Phototoxicity and photocarcinogenesis: comparative effects of anthracene and 8-methoxypsoralen in the skin of mice. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 1,: 303-306. (1976).
- 14.- Katzung, B.G. *Farmacología básica y clínica*. 5a. Edición. Ed. Manual modemo. 1095-1114. (1994).
- 15.- Nilsson, R., Maurer, T. and Redmond, N. A standard protocol for phototoxicity testing. Results from an interlaboratory study. *Contact dermatitis.* 28, 285-290. (1993).
- 16.- Marzulli, F.N. and Maibach, H.I. Phototoxicity (photoirritation) of topical and systemic agents. *Dermatotoxicology.* 1, 431-440. (1987).
- 17.- Maguire, H.C. The bioassay of contact allergens in the guinea pig. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 24, 151-162. (1973).
- 18- Draize, J.H., Woodard, G. and Calvery, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377-390. (1944).

- 19 Landsteiner, K. and Jacobs, J. Studies on sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* 61, 643-656. (1935).
- 20.- Buehler, E.U. A new method for detecting potential sensitizers using the guinea pig. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6, 341 - 352. (1964).
- 21.- Carter, R.O. and Griffith, J.F. Experimental bases for the realistic assessment of safety of topical agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2, 60-73. (1965).
- 22.- Davies, R.E., Harper, K.H. and Kynoch, S.R. Interspecies variation in dermal reactivity. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 23, 371 - 381. (1972).
- 23- Marzulli, F. and Maguire, H.C. Usefulness and limitations of various guinea pig test methods in detecting human skin sensitizers - validation of guinea pig tests for skin hypersensitivity. *Fd. Chem. Toxic.* 20, 67-74. (1982).
- 24- Philips, L., Steinberg, M., Maibach, H.I. and Akers, W.A. A comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 21, 369-382. (1972).

- 25- Murphy, J.C., Watson, E.S., Wirth, P.W., Skierkowski, P., Folk, R.M. and Peck, G. Cutaneous irritation in the topical application of 30 antineoplastic agents to new zealand white rabbits. *Toxicology*. 14, 117-130. (1979).
- 26.- Wolven, A. and Levenstein, I. Techniques for evaluating dermal irritation. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 18, 199 - 203. (1967).
- 27.- Csaky T.Z. Introducción a la farmacología general. 1a. Edición. Ed. Salvat. 205 - 212. (1969).
- 28.- Gilman, M.R., Evans, R.A. and DeSalva, S.J. The influence of concentration, exposure, duration and patch occlusivity upon rabbit primary dermal irritation indices. *Drug Chem. Toxicity*. 1, 391 - 400. (1978).
- 29.- Roudabush, R.A., Terhaar, C.J., Fassett, D.W. and Dziuba, S.P. Comparative acute effects of some chemicals on the skin of rabbits and guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7, 559 - 565. (1965).
- 30- Shah, V.P. and Maibach, H.I. Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration. Plenum Press New York and London 333-349. (1993).

- 31- Bartek, M.J., La Budde, J.A. and Maibach, H.I. Skin permeability *in vivo*: Comparison in rat, rabbit, guinea pig and man. *J. Invest. Dermatol.* 58, 114-123. (1972).
- 32.- Nixon, G.A., Tyson, C.A. and Wertz, W.C. Interspecies comparisons of skin irritancy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31, 481 - 490. (1975).
- 33- Fernández Nava, R. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* 63, 1-23. (1992).
- 34- Arrellano, E., Mendoza, J.F. y Domínguez, F.J. Intoxicación por *Karwinskia johnstonii* Fernández: Estudio de 12 pacientes. *Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx.* 51, 105-112. (1994).
- 35- Martínez, M. Tullidora. In: *Las plantas medicinales de México*. 1a. Edición. Ed. Botas. 501-504. (1944).
- 36- Del Pozo, E.C. Los efectos paralizantes de la tullidora. Estudios clínicos y experimentales. *Gac. Méd. Méx.* 95, 179-182. (1965).

- 37- Escobar, A. y Nieto, D. Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac. Méd. Méx.* 95, 163-177. (1965).
- 38- Puértolas, M.A., Nava, O., Medina, H.A., López, F.X. y Oyervides, J.F. Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Informe de seis casos. *Rev. Méd. I.M.S.S.* 22, 25-27. (1984).
- 39- Clavijero, F.X. Historia de la Antigua o Baja California. 1a. Edición. Ed. Porrúa México. 31-36. (1982).
- 40- Castillo-Nájera, F. Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenamiento colectivo con tullidora. Memoria del V Congreso Médico Mexicano, México, D.F. Dirección de Talleres Gráficos. 1, 240-244. (1920).
- 41- Charlton, K. and Pierce, K.A. Neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. *Path. Vet.* 7, 435-447. (1970).

- 42- Escobar, A. y Nieto, D. Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac. Méd. Méx.* 95, 163-177. (1965).
- 43- Bustamente, J., Olvera, J. y Nieto, L. Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Comunicación de un caso. *Gac. Méd. Méx.* 114, 241-244. (1978).
- 44- Weller, R., Mitchel, J. and Daves, D. Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) toxins. En: Spencer P. Schaumburg H. Ed. Experimental and clinical neurotoxicology. Baltimore: Williams and Wilkins, 336-340. (1980).
- 45- Dreyer, D.L., Arai, I., Bashman, C.D., Anderson, W.R., Smith, R.G. and Daves, G.O. Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4985-4990. (1975).
- 46- Waksman, N. and Ramírez, R. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoam. Quím.* 23/1 and 22/4, 25-27. (1992).

- 47- Rivas G., Verónica. Estudio químico de los extractos semipolares de frutos de *K. parvifolia* y *K. johnstonii*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey N.L. (1995).
- 48- Sepúlveda, J., Van Der Klei, I., Kaiser, I., Piñeyro, A., Harder, W. and Veenhuis, M. Studies on the effect of T-514 on the integrity of peroxisomes in methyltrophic yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 91, 207-212. (1992).
- 49- Salazar, M.L., Piñeyro, A. and Waksman, N. A reverse phase HPLC method for quantification of peroxisomicine and other anthracenonic compounds. *J. Liq. Chrom. and Rel. Technol.* 19, 1391-1403. (1996).
- 50- Martínez V., Laura. Estudio de las propiedades físico-químicas de toxinas aisladas de *Karwinskia humboldtiana*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey N.L. (1990).
- 51- Bermúdez, M.V., Martínez, F.J., Salazar, M.E., Waksman, N. and Piñeyro, A. Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in rat, guinea pig, hamster and dog. *Toxicon.* 30, 1493-1496. (1992).

- 52- Bermúdez, M.V. Comunicación Personal.
- 53- Loomis, T. Numbers in Toxicology. In: T. Loomis, *Essentials of Toxicology*, Lea and Febiger, Philadelphia. 2, 13-28. (1978).
- 54- Piñeyro, A., Martínez, L.E. and González, R. *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology*. 92, 217-227. (1994).
- 55- Piñeyro López, A. Pharmazeutisch brauchbare Naphthalin und Anthracenderivate. Pharmaceutically applicable naphthaline and anthracene derivatives. Derivés de naphthaline et d'anthracene utiles comme medicamenta. *Europäisches Patenblatt*. 48/1995, 29.11. (1995).
- 56- Moreno, M., Vargas, R., Esquivel, D., Waksman, N. and Piñeyro, A. Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Med.* 61, 337-340. (1995).
- 57- Garza, L., Torres, O. and Piñeyro, A. Effect of toxin 514 of *Karwinskia humboldtiana* on liver microsomal lipid peroxidation stimulated by Fe⁺² -ADP complexes and NADPH *in vitro*. *European Journal of Pharmacology*. 183, 1550-1551. (1990).

- 58- Kampschmidt, R.F. Mechanism of liver catalase depression in tumor bearing animals. A Review. *Cancer Res.* 25, 34-45. (1965).
- 59- Ohnuma, T., Maldiá, G. and Holland, J.F. Hepatic catalase activity in advanced human cancer. *Cancer Research.* 26, 1806-1818. (1991).
- 60- Yasmineh, W., Parkin, J.L., Casper, J.I. and Theologides, A. Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of rat liver. *Cancer Research.* 51, 3990-3995. (1991).
- 61- Garza, L., Gin, H., Acosta, D., Torres, O. and Piñeyro, A. Toxicity assessment of toxins T-514 and T-544 of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. *Toxicology.* 73, 191-201. (1992).
- 62- Clark, W.H. Current concepts of the biology of human cutaneous malignant melanoma. *Adv. Cancer Res.* 24, 267-275. (1977).
- 63- Aebi, H., Bergmeyer, U. In methods of enzymatic analysis. Academic Press, London, New York. 673-678. (1974).

- 64- Ekwall, B. and Johanson, A. Preliminary studies on the validity of *in vitro* measurement of drug toxicity using hela cells. Comparative *in vitro* cytotoxicity of 27 drugs. *Toxicology Letters*. 5, 199-210. (1980).
- 65- Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Toxicon* 25, 565-568. (1987).
- 66.- Feldman, R. and Maibach, H.I. Percutaneous penetration of ¹⁴C hydrocortisone in man. *Arch. Dermatol.* 94, 649-651. (1966).
- 67- Baccichetti, F., Rodighiero, P., Vedaldi, D., Tamaro, M., Guiotto, A., Capozzi, A., Conconi, M.T. and Bordin, F. Photobiological activity of certain pyranocoumarin derivatives: Potential agents for the photochemotherapy of psoriasis. *Photodermatology*. 3, 261-270. (1986).
- 68.- Lynch, M.J., Raphael S.S., Mellor, L.D., Spare, P.D. and Inwood, M.J. *Métodos de laboratorio*. 2a. Edición. Ed. Interamericana. México. 1145-1167. (1984).

- 69- Spiegel, M.R. Teoría y problemas de bioestadística. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 188-198. (1989).
- 70- Leach, C. Introduction to statistics. A nonparametric approach for the social sciences. Ed. John Wiley & Sons. New York. 77-125. (1979).
- 71- Haserick, J.R., Richardson, J.H. and Grant, D.J. Percutaneous absorption of nicotinic acid and derivatives. *J. Invest. Dermatol.* 35, 337-341. (1960).
- 72- Faulkson, G. and Schulz E.J. Evaluation of the toxicity of 5-fluorouracil. *Br. J. Dermatol.* 74, 229-235. (1962).
- 73- Dillaha, C.J., Jensen, G.T. and Honeycutt, W.M. Skin reactions to cosmetics preparations. *J. Dermatol.* 1, 1-10. (1966).
- 74- Peck, G.L., Guss, S.B. and Douglas, J.K. Lomustine in dermatology. *Arch. Dermatol.* 106, 106-114. (1972).
- 75- Epstein, E. and Ugel, A.R. Response of the skin to mechlorethamine. *Arch. Dermatol.* 102, 504-512. (1970).

- 76- Bermúdez, M.V., Tamez, V.A., Lozano, F.E., Salazar, M.E., Ancer, J., Waksman, N. and Piñeyro, A. Acute, subacute and chronic toxicity of T-514 (peroxisomycin) isolated from *Karwinskia humboldtiana* in different animal species. 34th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. San Diego, California. Julio (1993).
- 77- Laskin, J.D. Cellular and molecular mechanisms in photochemical sensitization: studies on the mechanism of action of psoralens. *Food Chem. Toxicol.* 32, 119-127. (1994).
- 78- Cumberbatch, M. and Kimber, I. Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans cell migration. *Immunology.* 75, 257-263. (1992).
- 79- Yoshida, H. and Take, M. Kinetics of eosinophils and basophils in the allergic reactions. *J. Dermatol.* 36, 496-502. (1974).
- 80- Marzulli, F.N. and Maibach, H.I. Perfume phototoxicity. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 21, 685-715. (1970).

- 81- Kaidbey, K. and Kligman, A. Topical photosensitizers: Influence of vehicles on penetration. *Arch. Dermatol.* 110, 868-870. (1974).
- 82- Allman, R., Cowburn, P. and Mason, M. Effect of photodynamic therapy in combination with ionizing radiation on human squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Br. J. Cancer* 83, 655-661. (2000).
- 83- Tan, W.C., Fulljames, C., Stone, N., Dix, A.J., Sheperd, N., Roberts, D.J., Brown, S.B., Krasner, N. and Barr, H. Photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for oesophageal adenocarcinoma associated with Barret's metaplasia. *J. Photochem. Photobiol.* 53, 75-80. (1999).



DONATIVO

