

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA

ESTUDIO METABOLICO COMPARATIVO DEL PENTACLOROFENOL Y LA TIROXINA

TESIS

PRESENTADA A LA

FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA POR EL BACHILLER

JUAN A. ALMENDARES BONILLA

EN EL ACTO PREVIO DE SU

INVESTIDURA DE

DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA

TEGUCIGALPA, D. C, JUNIO 1966

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA

ESTUDIO METABOLICO COMPARATIVO DEL PENTACLOROFENOL Y LA TIROXINA

TESIS

PRESENTADA A LA

FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA POR EL BACHILLER

JUAN A. ALMENDARES BONILLA

EN EL ACTO PREVIO DE SU INVESTIDURA DE

DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA

TEGUCIGALPA, D. C, JUNIO 1966

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

RECTOR: ING. ARTURO QUESADA

SECRETARIO: LIC. ADOLFO LEÓN GÓMEZ

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

DECANO: DR. ENRIQUE AGUILAR PAZ

VICE-DECANO: DR. JESÚS RIVERA h.

SECRETARIO: DR. JORGE HADDAD Q.

PRO-SECRETARIO: DR. CANDIDO MEJIA

VOCAL: DR. IGNACIO MIDENCE

VOCAL: DR. ASDRUBAL RAUDALES

VOCAL: Br. JOSÉ DE LA CRUZ GARCÍA

VOCAL: Br. ELMER RUBÍ

VOCAL: Br. MOISÉS CHANG

VOCAL: Br. GABINO CORDOVA

TRIBUNAL EXAMINADOR:

DR. SILVIO ZUÑIGA

DR. CARLOS SIERRA ANDINO

DR. ALFREDO ZAMBRANA

SUSTENTANTE:

Br. JUAN ÁNGEL ALMENDARES BONILLA

PADRINOS DE TESIS:

DR. MANUEL SOSA h.

DR. FRANCISCO ALVARADO S. DR.

JESÚS RIVERA H.

DR. ARMANDO FLORES FIALLOS DR.

RAMÓN CUSTODIO L.

DR. ENRIQUE AGUILAR PAZ

DEDICATORIA

A mí querida madre:

ANTONIA v. DE ALMENDARES con amor infinito A la memoria

de mí querido padre:

JUAN ALMENDARES. A mis

hermanos

Yolanda, Gladys, Arnaldo, Mario, Antonieta y Artagnán

A mis cuñados y sobrinos

A mis apreciables tíos

A la. Señorita Rosario Flores, con aprecio y cariño

A Manuel Bonilla C. y señora.

A -todos mis familiares A mis compañeros y amigos

Al Dr. ANTONIO HORVATH, agradeciéndole sinceramente la orientación dada para el desarrollo, de este Trabajo.

A los Doctores; Jorge Haddad Q., Osear Raudales, Virgilio Banegas M., Raúl Durón, Ignacio Midence y César A, Zúniga.

Al Ing. Julio Pineda, con afecto.

Se agradece altamente la cooperación brindada a

Doctora Zoila Ney de Alvarado

Doctor Gilberto Padilla

Doctor Francisco Alvarado S.

Doctor Virgilio Paredes

Br. Ciro Hernández

Srita. Reyna Quezada

Srita. Angelina Olivares

Srita. Isaura Montoya

Sra. Lidia M. Gálvez

Sra. María Antonia Andino E.

y al Departamento de Patología del Hospital General San Felipe.

SUMARIO

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes Históricos
Motivación del Desarrollo de nuestra Tesis
Caracteres Generales del Pentaclorofenol y Tiroxina,

CAPITULO II

MECANISMO DESACOPLADOR DEL PENTACLOROFENOL Y LA TIROXINA

Efectos del Pentaclorofenol sobre la contracción muscular
Transporte de electrones inhibido en la cadena respiratoria

CAPITULO III APARATO DE WARBURG

Introducción
Métodos y Manejo
Cálculo del consumo de oxígeno

CAPITULO IV

EXPOSICIÓN DETALLADA DE LOS EXPERIMENTOS

Análisis estadístico de los resultados de la investigación

CAPITULO V

RESUMEN GENERAL. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

HONORABLE SEÑOR RECTOR

HONORABLE SEÑOR DECANO

HONORABLE SEÑOR SECRETARIO

HONORABLES MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

DISTINGUIDA CONCURRENCIA:

Antes de exponer mi tesis, quiero rendir tributo a todos los Maestros que poseen esa cualidad de motivar, despertar inquietud, curiosidad, para hallar la explicación de los fenómenos naturales, encendiendo la antorcha de la verdad, cultivando el amor a las ciencias y contribuyendo a la formación de profesionales con un sentido más humano y social.

En el curso de nuestro trabajo hemos tratado de investigar las alteraciones metabólicas en animales de experimentación, tratando de correlacionar el estudio de dos drogas: Pentaclorofenol, - insecticida altamente tóxico que ha ocasionado varias muertes en nuestro país -, y la Tiroxina, sustancia sintetizada en el organismo, que produce similares efectos metabólicos.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes Históricos

En 1841 Erdmann y Laurent obtuvieron mediante la acción del cloro sobre el fenol, preparado en presencia de catalizadores llamándolo Pentaclorofenol (18). En 1906, Bechold y Erlich experimentando en ratas demostraron que la dosis mínima letal de Pentaclorofenato de sodio era de 56 miligramos por vía intravenosa. En 1924 Bayle observó que una concentración de 80 miligramos por litro de Pentaclorofenol era capaz de inhibir la fermentación de la glucosa cuando era sometida a la influencia de la levadura de cerveza, este --mismo autor investigó la toxicología en peces, ranas y caballos, demostrando que el efecto tóxico era muy superior a la del Fenol; en 1938 se comenzó la difusión de su empleo utilizándose en la cura de madera, en esta misma fecha se inician las investigaciones en los Estados Unidos principalmente por Deichman V., W. Mackle K. O. Titmiller y G. Thomas (12) tratando de hacer estudios en diferentes animales, especialmente en la rata y estableciendo Deichman que la dosis letal (DL50) en ratas por vía subcutánea, es de 100 miligramos por kilo, por vía oral es de 27 a 211 por kilogramo de peso; para los conejos de 70 a 300 miligramos por kilo, la dosis letal por vía intravenosa fue de 22 a 23 miligramos por kilo cuando el material era introducido en una solución acuosa salina de sodio. En 1952, **Truhaut, L'BPée et Bousse Mart**, estos investigadores describen los efectos del tóxico sobre la piel, mediante la aplicación de soluciones.

Oleosas de manera que la dosis mínima mortal de Pentaclorofenato de sodio en solución salina era de 250 miligramos por kilo de peso, mientras que por vía oral era de 218 miligramos y por vía intravenosa de 22 miligramos por kilo de peso (18). En 1959 G. E. Lynn describe los efectos de toxicidad oral del Pentaclorofenol en las diferentes especies de animales, principalmente en ratas y conejos. En 1959-1960 se comienza a emplear el Pentaclorofenol en los Aserraderos de nuestro país; por esa misma fecha se describe el primer caso en el Hospital General "San Felipe", atendido por el Dr. Jesús Rivera h. De 1960 a 1964 se describen una serie de fallecimientos en diferentes lugares del país enfocando así la atención las autoridades de Salud Pública, acerca del uso del Pentaclorofenol, en noviembre y diciembre de 1964 los Dres. Alfredo León Gómez, César L. Caballero, publican sus observaciones clínicas acerca de la intoxicación con Pentaclorofenato de sodio, llamando la atención en *este* agudo problema para que se tomen las medidas profilácticas acerca del uso de este insecticida. Han existido informes de intoxicaciones acaecidas en diferentes países: en Japón, Francia, Puerto Rico, Australia (12), Inglaterra. En febrero de 1966, el Dr. Osear Leonel Rivera publica su trabajo de Tesis titulado "Intoxicación con Pentaclorofenato de Sodio", indicando las medidas de protección que deben de tomarse (31).

En el campo experimental el estudio del Pentaclorofenol ha despertado gran interés desde el punto de vista de su mecanismo de acción, permitiendo estudiar en forma más objetiva los cambios metabólicos que suceden en la mitocondria Lester Packer (47), en un artículo acerca del metabolismo y los estados estructurales de la mitocondria describe los efectos del Pentaclorofenol sobre

La membrana mitocondrial.

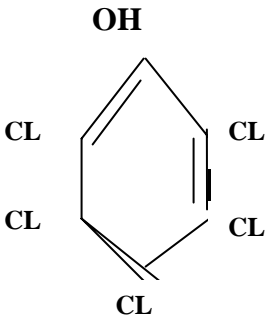
El uso del Pentaclorofenol ha despertado en estos últimos años gran interés en diversos campos, en el sector industrial su empleo ha venido a sustituir a la creosota, en algunos países para combatir los hongos y termites (comején) que atacan a la madera dificultando de esta manera su utilización en el aspecto agrícola su empleo se ha difundido para atacar a las plantas adventicias en los campos de gramíneas (cultivos de cereales). En el punto de vista de salud pública ha sido usado por los países donde existe la esquistosomiasis como un poderoso molusco-sida, además el hecho de ser un tóxico altamente poderoso ha constituido su empleo un grave problema puesto que la capacidad de penetración por mucosas, piel y tracto respiratorio es alta y su exposición aguda o crónica es capaz de producir la muerte o un proceso febril metabólico crónico causando pérdida de peso, debilidad general. Es significativo el hecho de que algunas investigaciones Deichmann (12) no han informado alteraciones con la ingestión de seis veces por semana durante quince semanas de un miligramo de Pentaclorofenato de Sodio en animales.

Motivación del Desarrollo de nuestra Tesis

El motivo principal del desarrollo de nuestro estudio acerca del Pentaclorofenol, ha sido estimulado por el hecho de que los pacientes que han presentado intoxicación aguda o crónica recuerdan a los animales de experimentación intoxicados con tiroxina y algunas de sus manifestaciones clínicas como metabolismo basal elevado hiperemia, pérdida de peso, taquicardia, son similares a la de los enfermos hipertiroideos; y el hecho de que los humanos que manipulan

esta sustancia estén expuestos a concentraciones pequeñas, atmosféricas, por contacto, cuando no se toman medidas escrupulosas, accidentales por contaminación de aguas, plantas, alimentos, por potencialización con el uso de otros insecticidas, es sumamente importante señalar que las personas deben encontrarse en condiciones fisiológicas normales puesto que un organismo deficiente en determinados nutrientes o alterado en el funcionamiento de algunos de sus órganos (hígado y riñón), es capaz de responder en forma inadecuada al ponerse en contacto con el Pentaclorofenol. Cabe preguntarse: 1. Tienen el mismo efecto sobre el consumo de oxígeno en Pentaclorofenol y la Tiroxina? 2°. Existe alguna modificación metabólica cuando el organismo recibe pequeñas dosis de Pentaclorofenol? y 3. - Es posible correlacionar las manifestaciones clínicas con las alteraciones metabólicas en la intoxicación con Pentaclorofenol? Para responder a estas preguntas nuestro estudio se ha realizado en ratas, comprendiendo dos fases: Fase 1. La eliminación de carbono 14 en ratas tratadas con Pentaclorofenol y Tiroxina (Tema que no será expuesto en el desarrollo de nuestra tesis por dificultades técnicas, pero será publicado este año) y la fase experimental 2, comprende la determinación del consumo de oxígeno en hígado de rata tratados con PCL y T4,

Caracteres Generales del Pentaclorofenol
y la Tiroxina



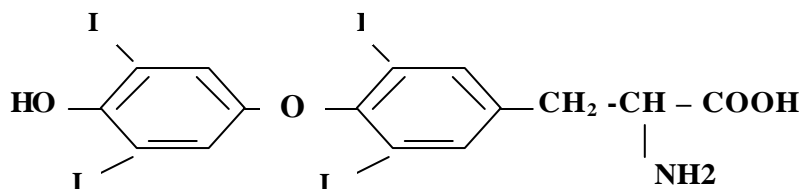
Pentaclorofenol

Es una sustancia cristalina, insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos como alcohol, éter, benceno; se descompone a altas temperaturas y se prepara clorinando el fenol en presencia de catalizadores, su toxicidad es mayor que la del fenol, debiéndose su reactividad química a los átomos de cloro que posee.

Su capacidad de penetración es alta y difunde por todas las vías administradas (piel, mucosas, tracto respiratorio, aparato digestivo y sangre). Su vía principal de eliminación es el riñón, eliminándose prácticamente el 96% y un 4% por el tracto digestivo (12), este dato es sumamente importante, porque debe vigilarse cuidadosamente en funcionamiento renal en los individuos intoxicados, los estudios han demostrado que el Pentaclorofenol no sufre modificación metabólica en los tejidos, por lo tanto los mecanismos de toxicación hepática no contrarrestan los efectos del Pentaclorofenol puesto que se no forman gluconatos ni sulfatos (40).

Los métodos de investigación del Pentaclorofenol y los tejidos se han podido demostrar mediante el ácido nítrico fumante con el que desarrolla un color rojo naranja, con un máximo de absorción de 5,400 A.mstrong (18)

Para mejores detalles véase esquema comparativo con la T4.



Datos Generales Acerca de la Tiroxina

La Tiroxina fue aislada por Kendall en el año de 1915; es un producto natural

sintetizado en la glándula tiroides, su forma como compuesto activo es la L-Tiroxina; tiene caracteres de ser Atalina insoluble en agua, soluble en soluciones alcalinas; ha sido producida artificialmente, lo que ha permitido su uso en forma racémica (compuesto menos activo). Setenta y dos a 92 microgramos de T₄ son secretados durante el día; al ser liberada a la sangre existe en forma unida a las proteínas plasmáticas (T₄ unida al Pre-albúmina), T₄ unida a la globulina y T₄ albúmina sérica.

La dosis terapéutica es de 0.3 mg, existe un periodo de latencia de horas, días para que se aprecie su efecto metabólico, posiblemente existe la conversión a otros productos y éstos sean la forma verdaderamente activa; los productos conocidos son la T₃ TETRAC, TRIAC (5, 7, 9, 27, 51, 54)

La desintegración metabólica que sufre la T₄ ocurre principalmente en el hígado y su vía de excreción principal es la bilis.

Las conversiones intracelulares que puede sufrir son las siguientes:

1. En la cadena lateral:
 - a) Deaminación con conversión a ácido Pirúvico
 - b) Deaminación con conversión a ácido Propiónico
 - c) Deaminación con conversión a ácido acético por descarboxilación
2. En los grupos iódicos
Deionización en las diferentes posiciones
3. En el grupo fenólico

Conjugación con los sulfatos y glucoronatos en el Hígado. Las acciones de la T₄ son generales, su acción calorígena no explica por si sola todos sus efectos metabólicos, por ejemplo su efecto sobre el crecimiento

en el renacuajo, no es producido por el Dinitrofenol que es una sustancia fenólica que aumenta el metabolismo basal, en forma similar al Pentaclorofenol, teniendo por lo tanto una acción calorígena grande. (7, 50, 63). Las modificaciones acerca del consumo de oxígeno no son en toda la economía orgánica, para el caso, el consumo de oxígeno a ¿es modificado en el cerebro, testículo, bazo, útero y lóbulo anterior de la hipófisis. Hay otras acciones metabólicas, aumenta la peristalsis intestinal debido al incremento del gradiente metabólico (lo mismo ocurre con el Pentaclorofenol), produce aumento de la eliminación de creatina, lo que significa una menor conversión en creatinina. (Todas las otras acciones metabólicas no son tratadas en este estudio puede consultarse en las obras respectivas).

Los individuos que reciben por vía intravenosa 10 mg. se sienten bien durante las primeras 12 horas, posteriormente, fiebre, fatiga, temblor, dolor en los músculos, aumento de la eliminación de creatina en dos o tres días desaparecen los trastornos, una dosis múltiplo de 10 mg. es mortal por colapso cardiovascular (51).

Para mejor detalle véase en el cuadro siguiente los efectos comparativos entre la T₄ y PCL.

CUADRO COMPARATIVO T4 PCL

Caracteres

Nombre	T4	PCL
Descubridor	Kendall (1915)	Erman y Laurent (1842)
Estado	Cristalino 776,93	Cristalino
Peso Molecular	Aminoácido fenólico yodado	266.35
Composición	235-236°C	Compuesto fenólico
Solubilidad	Insoluble en agua, soluble en álcalis	Insoluble en agua, soluble solventes orgánicos
Descomposición:	A nivel celular	clorinado
Desintegración metabólica	Efecto aparece de 7 a 12 horas, máximo 4 a 8 días, desaparece a las 4 a 8 semanas	309-310°C
Período de Acción		No sufre ningún cambio metabólico celular
		Eliminación mayor a las 6 horas.
Vía de eliminación'	Principalmente la bilis	Riñón (principalmente), y tracto digestivo
Mecanismo de acción hinchamiento mitocondrial	Desacoplador por hinchamiento mitocondrial	Forma "compuesto altamente hidrolizable con el factor acoplante
		+ +
Glicemia:	+ +	
Aumento del metabolismo basal	+ + + +	+ + + +
Creatinuria	+ + + +	+ + +
Crecimiento	Indispensable	Nulo
Hipertermia	+ + + +	+ + +
Taquicardia	+ + + +	+ + + +

Continuación Cuadro Comparativo T4 PCL

Nombre	T ₄	PCL
Sudoración	T ₄	PCL
Pérdida de peso	+ + +	+ + + +
Apetito	+ + +	0 +
Hiperperistaltismo Intestinal	+ + + +	+ + +

CAPITULO II

MECANISMO DESACOPLADOR DEL PENTAFLUOROFENOL Y LA TIROXINA

La materia es un estado de energía y ésta se define como la capacidad de realizar un trabajo; para el funcionamiento de la materia viviente, existen mecanismos altamente precisos que trabajan en forma tal que la energía es debidamente utilizada; las drogas, tóxicos, alteran parcial o totalmente la producción, utilización y la transformación de la energía en trabajo.

Es necesario destacar la existencia de una estructura adecuada, mantenida por los sustratos (alimentos), activados por las enzimas, el producto de estos reactantes es energía química que puede ser: liberada en forma de calor, transformada en trabajo o almacenada en compuestos altamente energéticos: ATP y el fosfato de creatina. Existen tres sitios en que la energía potencial calórica de los alimentos es almacenada en forma de ATP: la glicólisis anaeróbica, ciclo de Krebs y la cadena respiratoria.

El organismo humano funciona en un equilibrio entre la producción y la liberación de energía, si los sustratos no son metabolizados adecuadamente, tendremos menor aporte calórico, pérdida de peso, desnutrición; pero si la cantidad de sustratos es grande, el aporte calórico es mayor y éste o es liberado, o transformado; si no suceden estos fenómenos, la energía puede ser potencialmente almacenada en compuestos grasos, produciendo aumento de peso y por lo tanto obesidad. La comprensión de estas fases es significativa porque las drogas, tóxicos, pueden interferir los procesos anteriormente señalados.

Esquematisando (53):



Es interesante señalar que casi todos estos ciclos metabólicos se efectúan en las diferentes estructuras vivientes: bacterias, hongos, protozoarios, parásitos, plantas y finalmente el hombre (los virus por no poseer sistemas enzimáticos, son incapaces de reproducirse por si solos y por lo tanto necesitan de la materia viviente).

Los medios de lucha con los cuales el hombre ha combatido los seres que dificultan su existencia, han sido empleados empíricamente; el conocimiento cada vez más claro de los metabolismos celulares y la comprensión de las relaciones que existen entre la estructura y la función celular, han enfocado la atención hacia las sustancias que actúan por antagonismo metabólico, ya sea inhibiendo las enzimas o formando productos falsos.

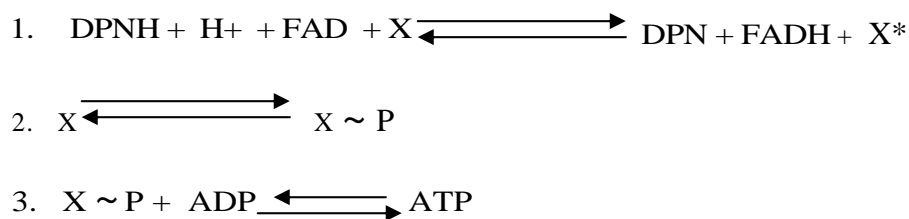
Mencionaremos brevemente algunas sustancias que bloquean los fenómenos de producción de energía, para el caso el ácido monoyodoacético inhibe la glicólisis anaeróbica, el flúoracetato, malonato bloquean el ciclo de Krebs, y en la cadena respiratoria - de la cual hablaremos más en detalle -, hay drogas que bloquean el funcionamiento de la cadena respiratoria, las clasificaremos: inhibidoras de la fosforilización oxidativa (desacopladores), bloqueadoras del flujo de electrones de la cadena respiratoria y bloqueadoras de ambos mecanismos. En pocas líneas explicaré la cadena respiratoria, enumerando primero los elementos que la forman y a continuación los procesos que ocurren en la formación del agua metabólica y el fundamento de la generación del ATP durante la fosforilización oxidativa.

Esquemáticamente expondré la forma como está constituida dicha cadena
(Ver figuras 6, 7).

Sistema	Nombre	Relación estructural
Sistema transportador de H y Electrones		Nicotinamida
	FAD	Riboflavina
Citocromos	b c a1 - a3	Hemoporftrinas
	Coenzima Q	Vitamina K
Factores acopladores		Posiblemente proteica

La cadena respiratoria es un fenómeno en el cual se verifica el transporte H y electrones mediante compuestos oxidables y reducibles; puesto que el transporte y la fosforilización oxidativa se suceden simultáneamente, es lógico suponer que exista un mecanismo entre la oxidación y la generación de ATP (acoplamiento). (63, 66, 67).

El Acoplamiento de la fosforilación oxidativa se ha pretendido explicar mediante intermediarios; se ha postulado la teoría de que existen sustancias acopladoras que intervienen en la fosforilación oxidativa, esquematizando:



El factor X se acopla por decirlo así, con la energía de la oxidación del DPNH 4- H, la naturaleza de este factor es desconocida, posiblemente se te de una proteína, sintetizando las reacciones:

1. La oxidación del DPNH +H no conduce a la liberación de energía fosforada, se forma un compuesto intermediario X^* o sea, un factor acoplador.
2. El paso de X^* conduce a la formación de una fosforilación intermedia $X \rightarrow P$
3. Existe la formación de ATP mediante transferencia de energía fosfatada.

La existencia de estas reacciones, ha sido estudiada mediante sustancias bloqueadoras de manera que cuando la fosforilación oxidativa no se efectúa, producimos un desacoplamiento y las sustancias que lo hacen reciben de desacopladores; esto generalmente no inhibe el transporte de electrones, lo aceleran de manera que los potenciales generados no son utilizados debidamente en la formación de ATP y la energía es liberada disipándose en forma de calor; estos desacopladores tienen diferentes estructuras químicas, por ejemplo los derivados fenólicos: Dinitrofenol, Pentaclorofenol, la Tiroxina (aminoácido fenólico yodado) y otros como el Calcio, el Dicumarol (antagonista metabólico de la Vitamina K), Gramicidina, etc.

Cómo desacoplan la fosforilización oxidativa el Pentaclorofenol y la Tiroxina? Son mecanismos similares? Brevemente trataré de explicar las teorías actuales que ilustran acerca del desacoplamiento.

La tiroxina su mecanismo desacoplante se ha postulado (3, 9, 19, 20; 22 24, 26, 46) en base a modificaciones estructurales en la membrana de la mitocondria, se ha demostrado que el aumento de la concentración de la tiroxina arriba de los límites fisiológicos produce hinchamiento de la membrana mitocondrial simultáneamente este fenómeno es acompañado de incremento de la oxidación mitocondrial y del citocromo C reducido; pero también de disminución

del cociente P:O que normalmente es de tres moles de ATP por molécula de oxígeno consumida, el hinchamiento mitocondrial aumenta el área de las crestas y esto conduce a un incremento de la permeabilidad de sustratos y a una mayor exposición de sitios enzimáticos que normalmente eran funcionales por los dobleces de las crestas; por otra parte se ha demostrado que destruyendo la membrana mitocondrial no se ha producido desacoplamiento con la tiroxina, sin embargo sustancias como el ATP y el Magnesio revierten la acción de la tiroxina en la mitocondria, se ha creído que la acción calorígena de la hormona tiroidea sea debido a este fenómeno pero estos estudios no se han comprobado en condiciones normales; como actualmente se cree que la acción calorígena pueda ser debida a la incorporación de aminoácidos en la síntesis proteica en estado fisiológico (54).

Se ha postulado que el mecanismo desacoplador del Pentaclorofenol (20, 63) es formar un compuesto inestable con el factor acoplador dificultándose de esta manera la generación de ATP, se han hecho estudios en los cuales se ha demostrado que es importante una concentración adecuada de ADP, es fundamental para mantener la integridad de la membrana mitocondrial. Las bajas concentraciones de Pentaclorofenol causan fácilmente encogimiento de la mitocondria cuando existen concentraciones muy bajas de ADP. El incremento de la concentración de Pentaclorofenol, es capaz de producir hinchamiento de la mitocondria; en presencia de sustrato con ATP el hinchamiento no aparece. En resumen podemos decir que existen agentes desacoplantes que actúan inhibiendo, promoviendo o no afectando el hinchamiento de la membrana mitocondrial.

Efectos del Pentaclorofenol sobre la contracción muscular

La contracción muscular es la transformación de la energía química en mecánica, para que se efectúe es necesario que exista una energía disponible, almacenada en ATP y fosfato de creatina. La chispa que gatilla la contracción muscular es el influjo nervioso. Se ha postulado que el ATP en su desdoblamiento enzimático, se encuentra inhibido hasta que llega el potencial de acción a la fibra muscular. En este momento el ATP comenzará a desdoblarse mediante un sistema ATPasa; este factor inhibidor ha recibido el nombre de factor de relajación o factor de Marsh Bendall, que necesita ATP y magnesio para activarse; su estructura química es desconocida y en su presencia la fibra muscular no se contrae aun añadiendo ATP, pero en presencia del calcio iónico es capaz de producir contracción muscular; por lo tanto el potencial de acción generado por el estímulo nervioso, libera calcio que penetra en las bandas Z y que este efecto suprime la influencia inhibidora del factor de relajación. El sistema ATPasa inhibe el factor de relajación, por lo tanto, favoreciendo la hidrólisis de ATP. (21)

Es curioso observar que los individuos expuestos al Pentaclorofenol, presentan rigidez temprana pre y post mortem, puesto que el PCL «es un desacoplador de la fosforilación oxidativa, la generación de ATP y el almacén energético de fosfato de creatina se encuentran profundamente menoscabados, sumado a esto produce un aumento de la actividad ATPasa, inhibiendo el factor de relajación. Por otra parte, los individuos intoxicados presentan eliminación de grandes cantidades de creatina en la orina (los individuos hipertiroides tienen esta misma alteración metabólica).

Transporte de Electrones Inhibido en la Cadena Respiratoria

Para que se efectúe normalmente los fenómenos de transporte de n y electrones en la cadena respiratoria, es necesario que exista en forma adecuada los elementos que la forman; mencionaré algunos estudios actuales que demuestran cómo el déficit dietético en determinadas sustancias es capaz de producir alteraciones metabólicas en la cadena respiratoria. Estos trabajos bastante interesantes, han permitido demostrar que en hígado de rata alimentada en una dieta deficiente en riboflavina presenta cambios evidentes mitocondriales.

El consumo de oxígeno era más bajo que lo normal en presencia de succinato el FAD se encontraba disminuido en un 25%, la proporción P: O se encontraba más bajo que lo normal, lo que significa que la generación de ATP estaba disminuida. Podemos, en base a lo anteriormente mencionado, postular la hipótesis de que los individuos desnutridos que manipulan Pentaclorofenol, sean más susceptibles a la acción desacoplante puesto que tienen un almacén energético disminuido; es de tomar en consideración estos puntos señalados anteriormente, dado que las condiciones de subdesarrollo en nuestro país, la incidencia de desnutrición es alta, y los individuos en tal estado no deben por ningún motivo someterse a exposiciones agudas o crónicas del Pentaclorofenol. (6).

Existen sustancias que alteran el sistema citocromo oxidasa, por ejemplo, el cianuro y el monóxido de carbono produciendo anoxia a nivel celular, estas sustancias no son de sacopadoras de la fosforilación oxidativa, puesto que ésta continúa realizándose; las drogas desacopladoras aceleran el transporte de electrones en la cadena respiratoria por ejemplo: La Tiroxina y el Pentaclorofenol

Colorofenol significado con esto que la formación de energía es rápidamente liberada en forma de calor que no es almacenado en ATP, existe una correlación entre la manifestación clínica llamando a estas sustancias calorígenas, los individuos intoxicados con Pentaclorofenol presentan hipertemias severas de 40 a 42°C. Los hipertiroideos y los que presentan "crisis hipertiroidea" manifiestan también grandes elevaciones térmicas; el significado de esas alteraciones clínicas es extraordinario puesto que la hipertemia en este caso es la expresión de una modificación profunda en la máquina termoquímica mitocondrial, la producción calórica aumentada tiene que ser eliminada para mantener el equilibrio térmico, las vías principales de eliminación en este caso, son la irradiación y la sudoración, esta última es profusa de manera que la pérdida de líquidos y electrolíticos es alta en los individuos intoxicados con Pentaclorofenol; existen otras alteraciones metabólicas tales como aumento de creatina, concentraciones de ácido láctico, acidosis. Las modificaciones finales en un individuo es difícil correlacionarlas, puesto que el efecto primario hipertérmico es capaz de producir cambios variables. (Ver figura 6)

Se ha descrito la existencia de hiperglicemia que puede ser explicada a la disminución del ATP necesarios para la utilización de la glucosa. Existen además, trastornos respiratorios que pueden ser explicados por el incremento del metabolismo basal, la hiperperistalsis intestinal también se ha descrito posiblemente debida a un aumento del gradiente metabólico del intestino (los hipertiroideos presentan períodos diarreicos).

La acción local sobre las mucosas y la piel, se ha descrito en humanos y en animales, presentando congestión de mucosas y grave irritación de la

Piel. Nuestro conocimiento desde el punto de vista mitocondrial, es imposible en nuestro medio por falta de microscopio electrónico; las alteraciones histológicas en humanos no han sido descritas en Honduras por dificultades de practicar la autopsia en las personas fallecidas (31). En los trabajos realizados en otros países, el estudio anátomo-patológico no informa alteraciones específicas en los diferentes tejidos. Los cambios principales descritos son daño extenso en el sistema vascular con edema y proliferación del endotelio vascular con dilatación de las arteriolas y hemorragia (12)

En base a estos conocimientos la relación entre la estructura y función es importante conocerla puesto que el conocimiento básico de estos fenómenos permite llegar a entender lo que está sucediendo en los intoxicados con Pentaclorofenol, y así tener en cuenta las medidas pertinentes para la prevención y tratamiento.

CAPITULO III

APARATO DE WARBURG

Introducción

Al revisar los estudios metabólicos y al obtener conclusiones importantes acerca de los fenómenos enzimáticos ha transcurrido más de una centuria. Tal estudio es sumamente interesante puesto que han sido los animales de experimentación los que han permitido comprender los fenómenos que suceden en la intimidad celular. Es curioso observar que la interpretación de estos fenómenos se ha realizado en base a fragmentaciones de una unidad estructural altamente organizada como es la materia viviente.

Así los primitivos estudios fueron disecando al animal completo, ya -sea estudiando los órganos o tejidos aisladamente, o produciéndoles enfermedades por medio de drogas, estudiando la perfusión de Órganos, la intimidad de sus tejidos, en síntesis, la célula. En la actualidad el uso del microscopio electrónico ha permitido comprender más a cabalidad algunos fenómenos que suceden en — las fracciones celulares, mitocondrias, etc.

Esto nos permite comprender cómo el hombre ha estudiado en forma -analítica las diferentes estructuras de la materia viviente, de manera que la comprensión de la unidad biológica tiene que estudiarse como una estructura influida por diversos factores del medio interno (hormonas, sistema nervioso, enzimas, etc.), y que está también relacionada con los diversos estímulos del medio externo. En síntesis, podemos expresar que los fenómenos metabólicos en tejidos o células aisladas, no significan exactamente lo que sucede en el organismo, ya --

que no representan las condiciones fisiológicas adecuadas en que éstos se efectúan, por lo tanto, podemos decir lo siguiente:

- a) Que el mayor aporte al conocimiento de la materia viviente han sido los animales de experimentación;
- b) Que los resultados obtenidos en el estudio de aquéllos, no son - aplicables totalmente al hombre, pero si han permitido conocer más a fondo los hechos que ocurren en seres humanos;
- c) Que el ideal de investigar el funcionamiento del organismo, es tratar de llegar a conocer, en una forma evidente, la estructura, la función y los factores que influyen en el organismo como unidad biológica y social.

Esta breve introducción nos permite entender la importancia que reviste el Aparato de Warburg en los fenómenos metabólicos que suceden en la — respiración celular como producción de CO₂ y consumo de oxígeno en tejidos -aislados, normales y patológicos.

Descripción del Aparato

El Aparato de Warburg comprende;

1. El vaso
2. Manómetros
3. Baño termorregulador
4. Sistema agitador

1. - El Vaso: comprende

- a) Compartimiento central, que puede usarse con o sin solución de KOH (en nuestro caso particular, en el cual determinamos el - consumo de oxígeno, usamos dicha solución).
- b) Compartimiento principal o lateral, en el cual se introduce el - homogenizado del tejido que se estudia.
- c) Brazo lateral con una tapadera cilíndrica, en el cual se puede — colocar sustrato (succinato), o cualquier otra sustancia que se - decida estudiar.

2.- Manómetros:

Los manómetros están calibrados con los vasos respectivos, de manera que para cada vaso existe una constante designada con la sigla kO₂. El líquido que contienen los manómetros, generalmente es la solución descrita por Brodie y tiene una gravedad específica de 1,033, de tal manera que 10,000 mm. son iguales a una atmósfera. Este líquido está regulado por un sistema valvular.

3.- Baño Termoregulado:

El aparato posee un termostato que le permite mantener la temperatura constante (nuestro experimento se realizó a 38°C).

4. - Sistema Agitador:

Este sistema trabaja para mantener la fase líquida y gaseosa en equilibrio, mediante oscilaciones en los manómetros. (Para ilustración véanse figuras 1 y 2)

Método y Manejo del aparato de Warburg

En nuestras experiencias hemos utilizado homogenizados de hígado de rata, preparándolo de la siguiente manera:

1. Se sacrifica el animal con un golpe en la cabeza y se cortan las carótidas para sangrarlo, inmediatamente se extrae el hígado, pesándolo sobre un papel filtro; colocándolo en un recipiente se le añade buffer 0.1 M. K₂HPO₄ con pH 7,5, de manera que resulte una dilución de 1:4 (4 ml. de buffer por un gramo de hígado). Una vez hecha la dilución se practica la homogenización en un aparato de — Waron Blendor. Por ejemplo: si el hígado pesara tres gramos, este peso se multiplica por cuatro, que serían los ml. de buffer usados; el total es 12 ml. de K₂HPO₄.

De este homogenizado se toma 1 ml. para colocarlo en el compar-

timiento principal o lateral del vaso y otro mi, se utiliza para determinar el peso seco de tejido.

2. Puesto que el CO₂ producido por el metabolismo del tejido puede interferir en el consumo de oxígeno, se utiliza 0.1 mi, de una solución de KOH al 20% y se coloca en el compartimiento central del vaso. -Inmediatamente después, se introduce un papel filtro doblado en forma de acordeón, con el objeto de que se empape del KOH que se ha -colocado anteriormente; de tal forma que el líquido no se derrame -en el compartimiento principal aun con cualquier inclinación de los manómetros que se realizara, evitándose de este modo que el KOH altere totalmente el consumo de oxígeno que se está verificando.
3. El sustrato utilizado en nuestra experiencia, es el succinato, el -cual está en una proporción de 0.1 mM en 0.5 mi del mismo buffer pH 7.5 (podría Usarse cualquier otro sustrato con la misma proporción). La cantidad utilizada de succinato es de 0,5 mí y es colocado en el brazo lateral del vaso.
4. En vista de que es necesario tener un volumen fluido (Vf) de 2 mi es necesario agregar 0.4 mi del mismo buffer.
5. Resumen de las cantidades:

1.0 mi. de homogenizado
 0.5 mi. del sustrato (succinato)
 0.4 mi, del buffer pH 7.5
0.1 mi. de KOHal20%
 2.0 mi. de volumen fluido total (Vf)

Una vez listos los vasos, se ajustan a los manómetros en forma respectiva y se colocan en el baño termoregulado del aparato de Warburg, a una temperatura de 38°C_f observando cuidadosamente que la llave superior se encuentre abierta. El paso siguiente es colocar la rama derecha a un nivel de 250 mm. y se ponen los barómetros en movimiento durante 5 a 10 minutos, para permitir que se calibren (esto se realiza mediante un sistema de agitación con oscilaciones generalmente de 60 por minuto. Una vez pasados los 10 minutos, se calibra la rama derecha a 250 mm. y se lee la rama izquierda habiendo cerrado previamente la llave superior de todos los manómetros, inclusive el termo-barómetro (éste no lleva homogeniza-do, pero debe tener el mismo volumen fluido total, registra los -cambios barométricos en relación con la temperatura). La lectura de la rama izquierda será la lectura 0, o inicial; obtenido el dato se pone inmediatamente a trabajar el sistema de agitación para poner los manómetros en movimiento.

7. A los diez minutos (no se abra la llave superior), se para el sistema de agitación, se lleva la lectura de la rama derecha a 250 mm. y se lee la rama izquierda. Practicadas todas las lecturas, inclusive la del termo-barómetro, se pone nuevamente el aparato en movimiento. A los 20 y 30 minutos se tomarán las lecturas exactamente en la misma forma descrita para los diez minutos. Parando cada vez el aparato sin abrir la llave superior.
8. Adición de sustrato (succínato). Realizadas las lecturas a los treinta minutos, se abre la llave superior y se sacan cada uno de los manómetros y con una leve inclinación de los mismos se vacían del succinato que se encuentra en el brazo lateral, vertiéndose éste a la cámara principal en donde se encuentra el homogenizado. (Es importante recordar que debe tenerse mucho cuidado en que el compartimiento del vaso central que contiene -KOH no se derrame sobre el compartimiento principal). Practicada la adición de succinato, se vuelven a colocar los manómetros con la llave superior abierta y se lleva la lectura a 250 mm en la rama derecha, poniéndose el aparato en movimiento durante cinco a diez minutos para permitir que se calibren los manómetros. Ya calibrados los manómetros, se pone la rama lateral derecha exactamente a 250 mm, se cierra la llave superior y se toman los datos en la rama izquierda; ésta área la lectura 0, o sea la inicial. Para hacer la lectura siguiente, se hará en la forma indicada con anterioridad. Existen por lo tanto, dos fases de treinta minutos cada una en nuestra experiencia; la fase 1 sin sustrato (basal) y la fase 2 con sustrato. La duración total del experimento es de sesenta minutos, con intervalos de diez minutos.
9. Es necesario que la tapadera cilíndrica del brazo lateral del vaso de Warburg, esté cerrada cuando se trabaje; esto se obtiene colocándola de tal manera que el orificio de ésta y del brazo lateral, estén hacia lados opuestos uno del otro. Una vez finalizado el experimento, se sacan los manómetros cerciorándose previamente que la llave superior de los mismos esté abierta, puesto que de lo contrario el líquido de Brodie, puede caer intempestivamente dentro de los vasos.

Cálculo del Consumo de Oxígeno

Es necesario para determinar el consumo de oxígeno, comprender cómo se registran las variaciones de presión, por lo tanto, vamos a considerar dos procedimientos: determinación de las variaciones de presión y determinación del consumo de oxígeno.

Procedimiento para determinar las variaciones de presión: Las variaciones de presión registradas en el aparato, se realizan en una hora y a intervalos de diez minutos, tabulándose en una gráfica especial (Véase Fig. No. 3), que contiene el tiempo en las ordenadas y las variaciones de presión en las abcisas. Para mejor comprensión vamos a dar un ejemplo: suponiendo que tenemos una lectura inicial de 251 a los diez minutos se obtienen 252, la diferencia es un aumento de 1 mm (el cual se representa como $4-1$), estas dos lecturas que estamos tomando son las del termo-barómetro señalado como TB, (es importante recordar que este vaso no tiene homogenizado). El mismo procedimiento se sigue para obtener las variaciones de presión que se observan en los otros vasos que sí contienen homogenizado. Los procedimientos se han hecho de tal manera que sean simultáneos. En nuestro experimento se ha trabajado con tres animales, uno señalado con la letra "N" que significa "normal" (es decir que no ha recibido ninguna droga). T4 que equivale a la rata que ha recibido tiroxina y PCL que representa al animal que ha recibido Pentaclorofenol. Como los experimentos son simultáneos, realizamos al mismo tiempo 2 N, 2 T4, y 2 PCL, con el objeto de que si existiera alguna falla en uno de ellos nos queda el otro homogenizado.

Para la lectura inicial de uno de los vasos que contienen homogenizado, fue de 249, a los diez minutos, la lectura nos dio 222, existe por lo tanto una disminución de presión en mm de -27; a esta cantidad se le resta algebraicamente la variación del TB (termo-barómetro), $-27 - (4-1)$ es igual a -28, esto es la lectura para diez minutos, para veinte minutos sería:

252 mm. termo-barómetro, lectura anterior para diez minutos
252 mm. termo-barómetro, lectura presente para veinte minutos
 0

Como en este caso no existió variación en el termo-barómetro, la diferencia es de 0.

222 lectura anterior para diez minutos
201 lectura presente para veinte minutos
 21

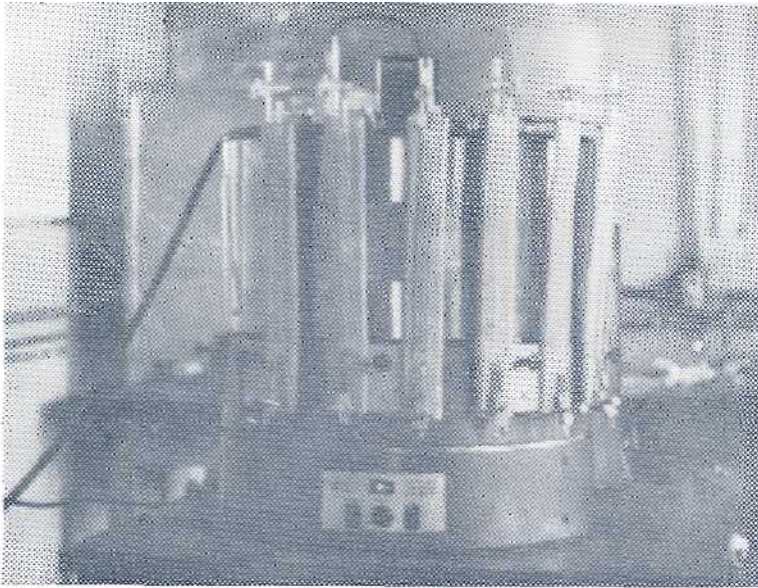
La diferencia es de -21, en este caso no restamos algebraicamente el termo-barómetro, porque la diferencia entre dos lecturas fue de 0. Se sigue este procedimiento hasta completar los treinta minutos iniciales, terminando así la fase 1 (sin sustrato). A partir de este momento, se agrega el sustrato y se registran las variaciones de presión en la forma anteriormente indicada, completándose así la fase 2 (con sustrato).

La suma de las variaciones de presión, registradas se designan con el nombre de h neto; existen por lo tanto dos h neto, el de la fase 1 y el de la fase 2. (Véase la Figura No. 4).

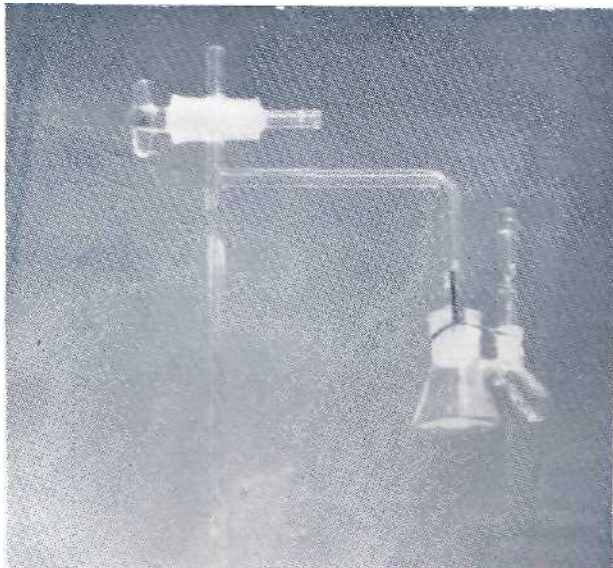
Procedimiento para determinar el consumo de oxígeno: Una vez determinado el h neto, en los cálculos, tenemos que tomar la constante de los vasos, previamente establecida (29). La constante se indica como kO_9 . El producto del h neto y la constante, representa el consumo de oxígeno (XO_2). Para poder expresar el consumo de oxígeno en microlitros por hora y por miligramo de peso seco, se explica por la siguiente fórmula:

$$Q_{O_2} = X_{O_2} \times \frac{60}{t} \times \frac{1}{\text{peso seco}}$$

Q_{O_2} es igual a microlitros de oxígeno consumidos por hora y por miligramo de peso seco; X_{O_2} es el producto del h neto y la constante k_{O_2} . Sesenta es el tiempo en minutos (tiempo total que dura el experimento) y t es el tiempo en intervalos. El peso seco se expresa en miligramos y se determina poniendo a desecar 1 ml. de homogenizado. (Véase figura No. 4).



APARATO DE WARBURG



Manómetro, Vaso y Bulbo Lateral del APARATO DE
WARBURG

DETERMINACIÓN DE Q^o2

Fecha _____ Nuestra _____ Experimentador _____

Temperatura _____ Frecuencia. _____ Gas _____

Manómetros, No•

Tiempo	TB	N	N	T4	T4	PCL	PCL
0							
10							
20							
30							
40							
50							
60							
h neto							
Ko ₂							
Xo ₂							
Peso Húmedo, mg.							
Peso Seco, mg.							
Qo ₂							

$$QO_2 = \frac{XO_2 - X_0 \times \frac{1}{3C}}{\text{peso seco}} \quad (XO_2 = * h \text{ neto } 3C \text{ ko}_2)$$

DETERMINACIÓN DE Q^o2

Fecha 7-IV-66

Muestra: Hígado

Experimentador: Almendarés

Temperatura 38°C

Frecuencia: 60

Gas: Atmosférico

Manómetros No. 7

Tiempo	TB	N	N	T4		PCL	PCL
0	250	250	250	250	252	252	249
10	252	221	221	224	228	219	215
20	253	196	196	200	212	205	197
30	253	180	177	178	200	194	188
40	251	250	250	251	252	252	248
	249	209	201	177	180	190	186
50	242	163	150	103	115	126	122
	245	119	101	37	51	66	67
h neto		73	76	75		61	64
		125	143	198	195	180	175
ko ₂	1.44	1.42	1.46	1.38	1.39	1.55	1.42
Xo ₂		103.66	111.49	106.5	76,78	88,08	91.20
		177.50	208.78	276.90	272.22	259.92	249.37
Peso húmedo, mg.							
Peso seco, mg			90		95		89
Q ^o 2		2.30	2.477	2.24	1.61	1.97	2.04
		3.94	4.65.	5.82	5.73		5.06

$$Q^{\circ}2 = X_{O2} \times \frac{60}{t}$$

$$\frac{I}{\text{Peso seco}}$$

$$(X_{O2} = h \text{ neto} \times k_{O2})$$

Fig. No. 4,

DETERMINACIÓN DE Q°2

Fecha: 20-V-66

Muestra: Hígado

Experimentador: Almendares

Temperatura: 38°C

Frecuencia: 60

Gas: Atmosférico

Manómetros No. 7

Tiempo	TB	N	N	T4	T4	PCL	PCL
0	251	249	250	250	255	254	251
10	251	223	221	226	227	222	220
20	250	197	193	203	202	194	192
30	249	172	168	190	187	168	169
40	251 249	250 203	250 201	250 188	254 190	253 186	252 169
50	249	158	153	132	132	126	130
60	250	117	108	89	85	77	83
-h neto		79 134	84 143	62 172	70 177	88 180	84 170
Ko2	1.44	1.42	1.46	1.38	1.39	1.55	1.42
-Xo2		112.1 190.2	123.32 209.78	88.04 244.24"	97.72 251.28	127.07 155.58	117.7 242,25
Poso húmedo, mg.							
Peso seco, mg«			80		65.5		85
Qo2	4.53	2,93 4,99		³ 7.72	2.98 7.72	6.01	2.8J- 5.7

$$Q^{\circ}2 = X_{O_2} \times \frac{1}{\text{Peso seco}} \quad (X_{O_2} = h_{\text{neto}} \times k_{O_2})$$

BLOQUEADORES QUE ACTÚAN A NIVEL CELULAR

CÉLULA

CITOPLASMA

MITOCONDRIA

GLUCOSA

CADENA RESPIRATORIA

Glicólisis
Anaeróbica

8 ATP

MONOXIDOACETATO

FIRUVATO
6 ATP

CICLO DE KKEBS

24 ATP

FLUORACETAT

OMALONATO

Transporte de H y Electrones..... H₂O
↑
Cianuro

Fosforilación Oxidativa

ATP ATP ATP

DESACOPLADORES (T₄ y PCL)

ALMACÉN DE ENERGÍA

38 ATP

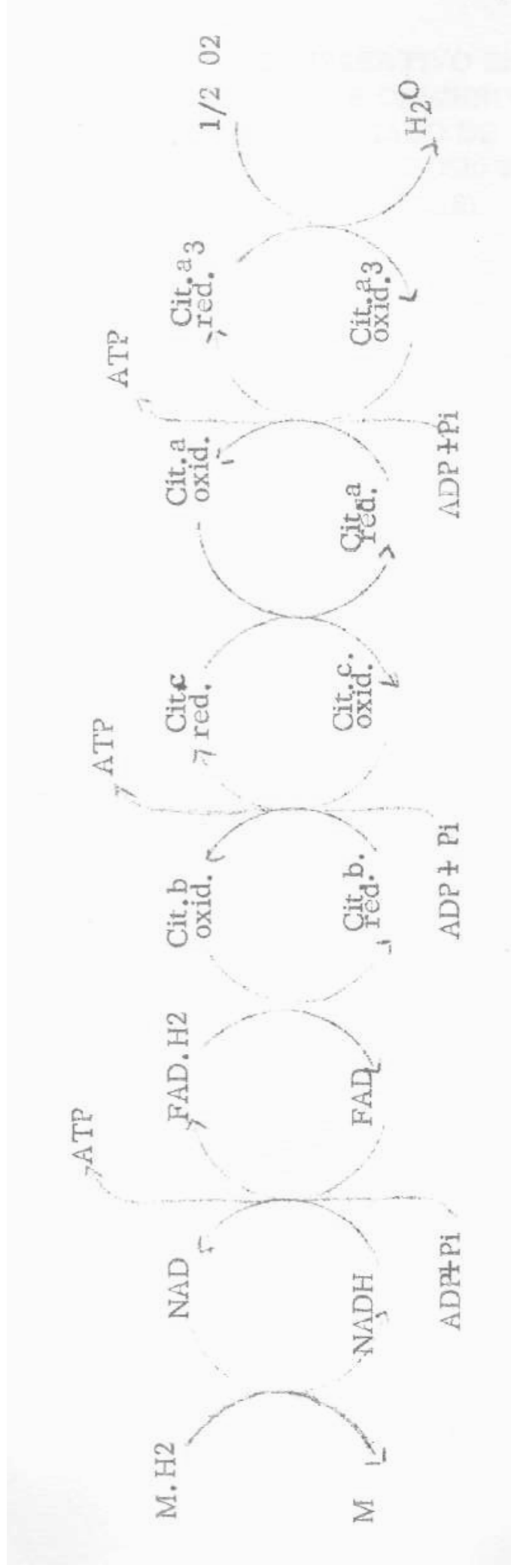
Bloqueador

*Fig., No.
6.*

DESACOPLADORES DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

TIROXINA

PENTACLOROFENOL

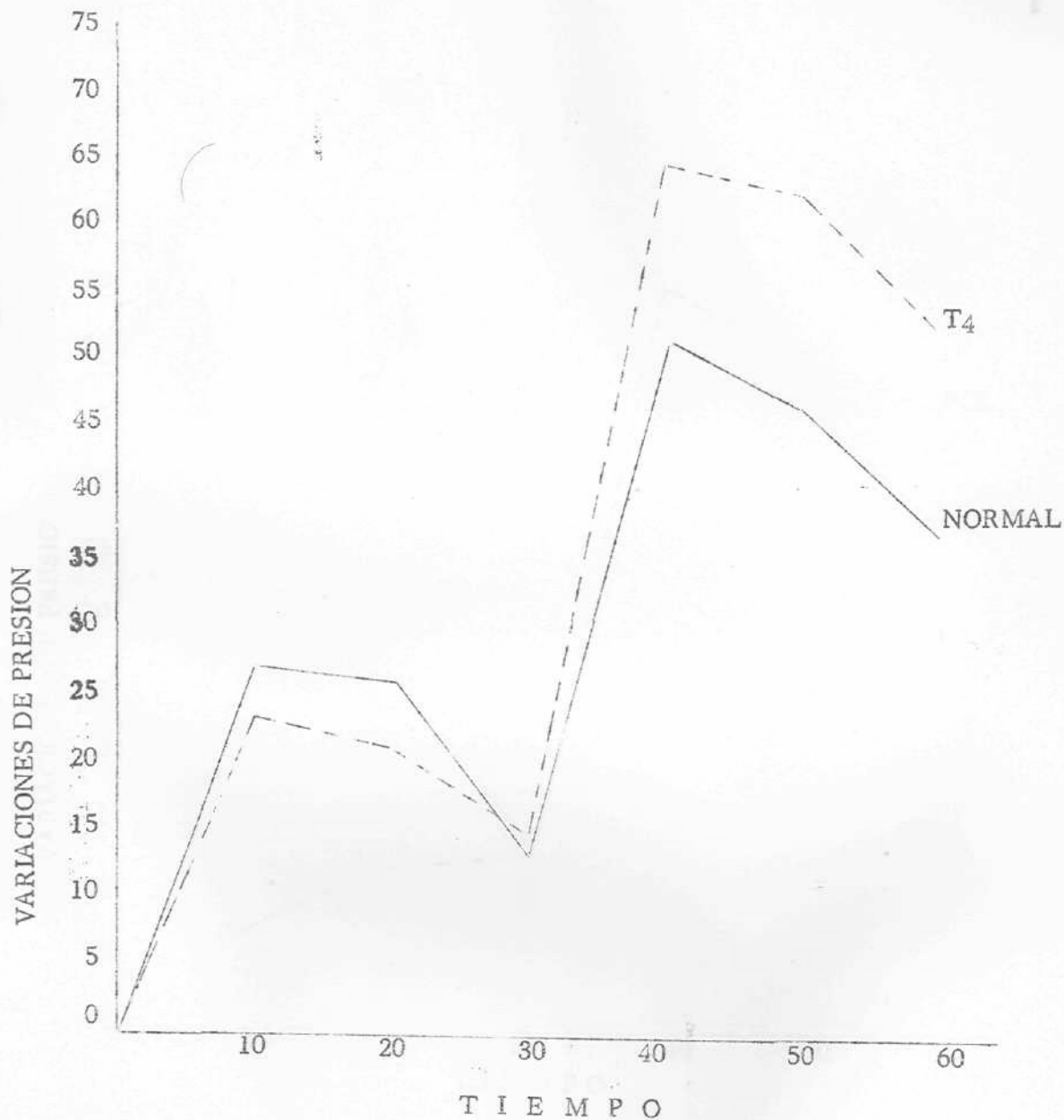


AMITAL

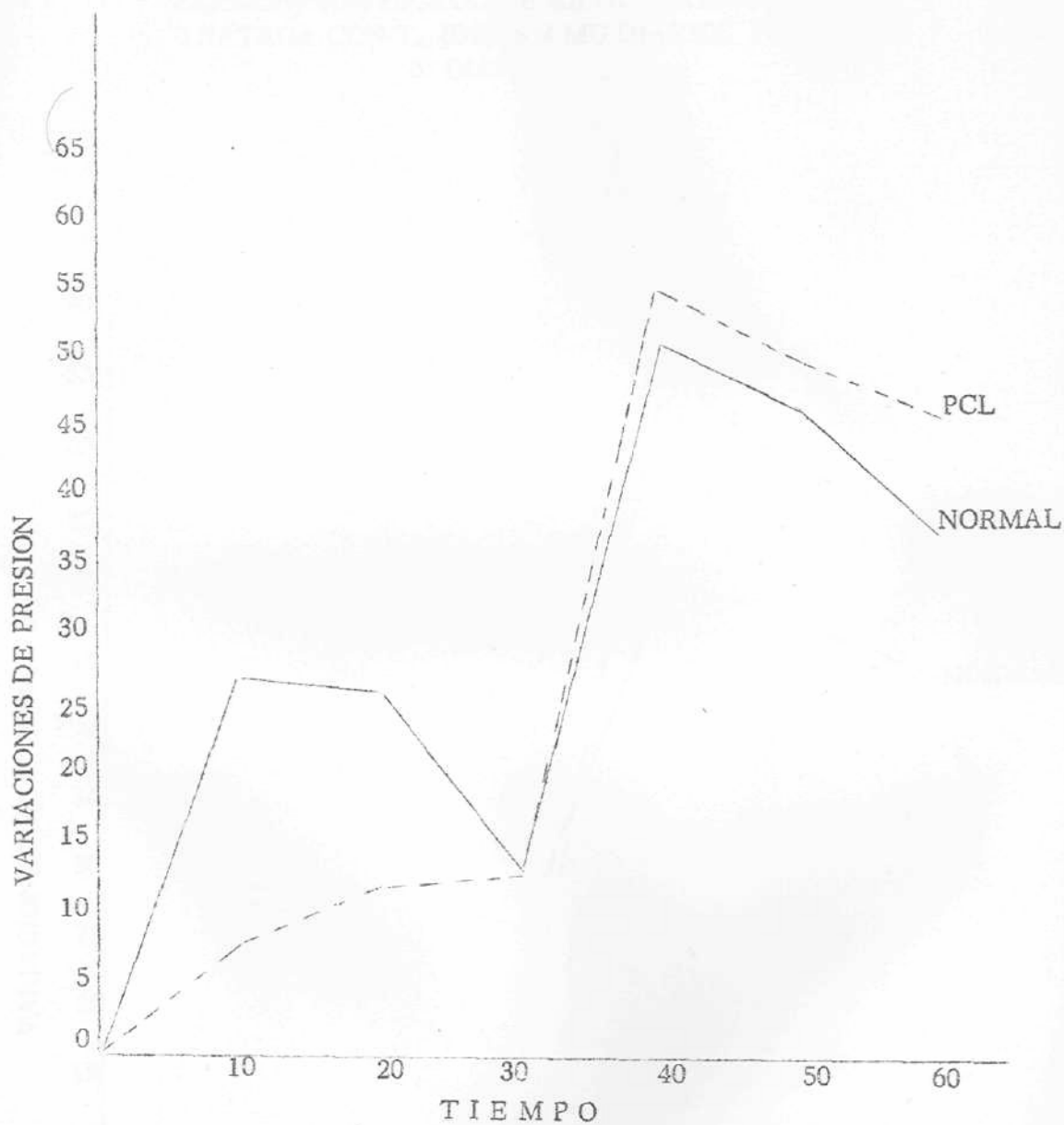
CLANURO

INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES

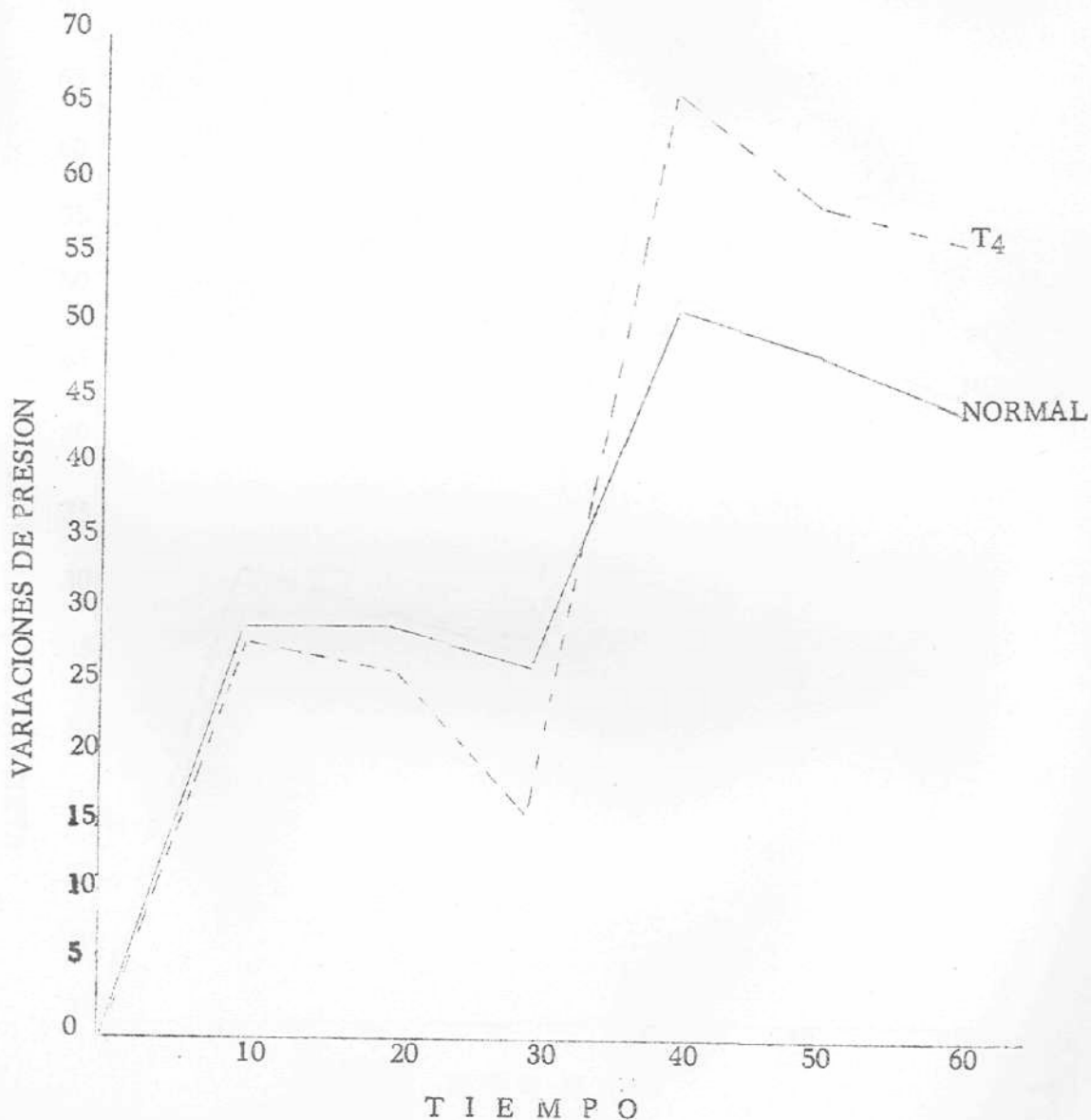
EFFECTO COMPARATIVO EN LAS VARIACIONES DE CONSUMO DE OXIGENO (VARIACIONES DE PRESION) POR HIGADO DE RATA NORMAL Y TRATADA CON T₄ (DOSIS 2 MG DIARIOS POR 6 DIAS)



EFFECTO COMPARATIVO EN LAS VARIACIONES DE CONSUMO DE OXIGENO (VARIACIONES DE PRESION) POR HIGADO DE RATA NORMAL Y -- TRATADA CON PCL (DOSIS 0.7 MG DIARIOS -- POR SEIS DIAS)

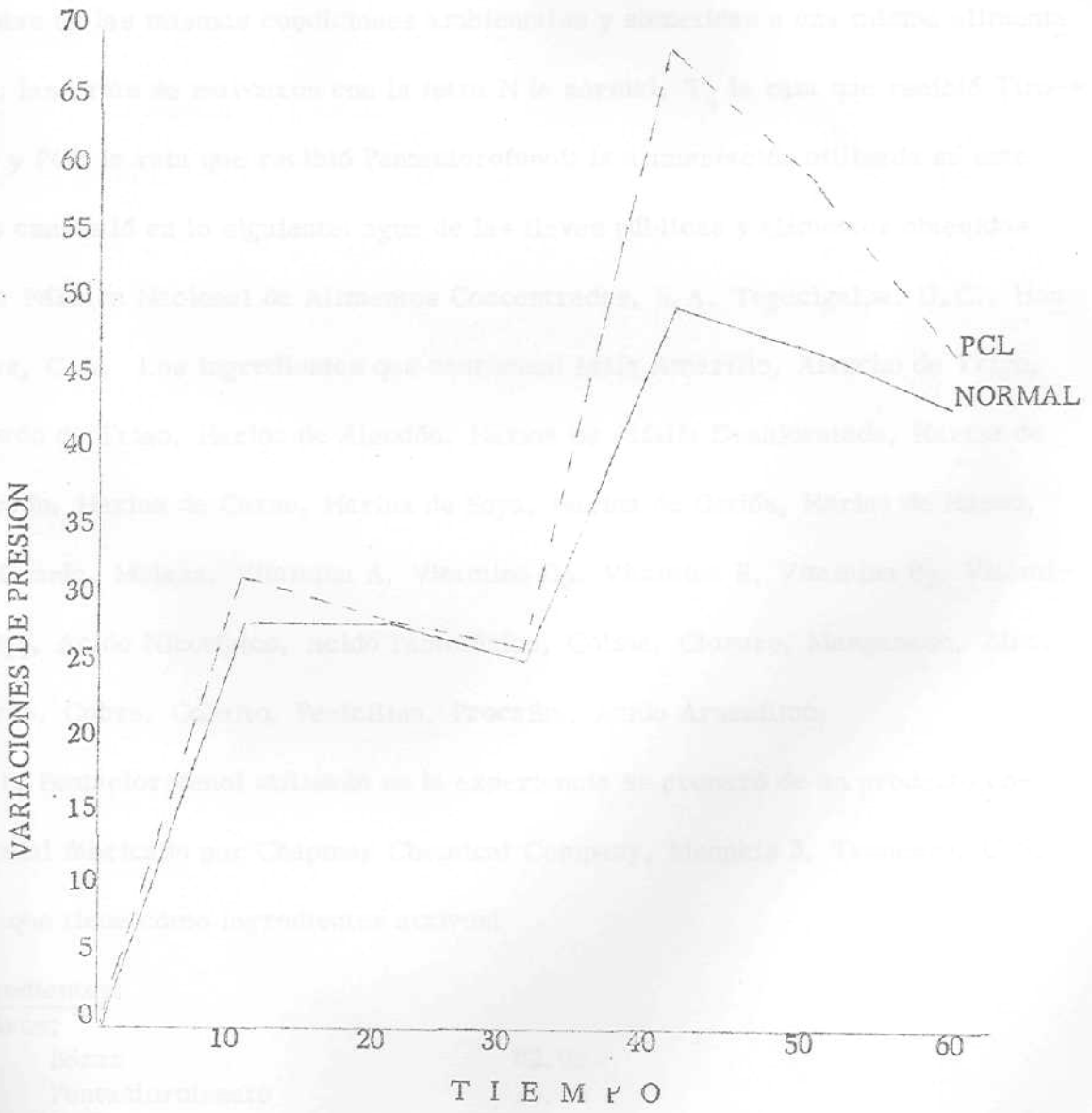


EFFECTO COMPARATIVO EN LAS VARIACIONES DE CONSUMO DE OXIGENO (VARIACIONES DE PRESION) POR HIGADO DE RATA NORMAL Y TRATADA CON T₄ (DOSIS 2 MG DIARIOS POR 6 DIAS)



EFFECTO COMPARATIVO EN LAS VARIACIONES DE CONSUMO DE OXIGENO (VARIACIONES DE PRESION) POR HIGADO DE RATA NORMAL Y -- TRATADA CON PCL (DOSIS 2 MG DIARIOS POR 6 DIAS)

EXPOSICION DETALLADA DE LOS EXPERIMENTOS



CAPITULO IV

EXPOSICIÓN DETALLADA DE LOS EXPERIMENTOS

Se utilizaron ratas albinas, sexo masculino con un peso entre 150-200 gramos, puestas en las mismas condiciones ambientales y sometidas a una misma alimentación; las ratas se marcaron con la letra N la normal, T4 la rata que recibió Tiroxina y PCL la rata que recibió Pentaclorofenol; la alimentación utilizada en este caso consistió en lo siguiente: agua de las llaves públicas y alimentos obtenidos de la Fábrica Nacional de Alimentos Concentrados, 3. A. Tegucigalpa, D.C., Honduras, C.A. Los ingredientes que contienen: Maíz Amarillo, Afrecho de Trigo, Salvado de Trigo, Harina de Algodón, Harina de Alfalfa Deshidratada, Harina de Pescado, Harina de Carne, Harina de Soya, Harina de Ostión, Harina de Hueso, Sal Común, Melaza, Vitamina A, Vitamina D3, Vitamina E, Vitamina 83» Vitamina B2, Ácido Nicotínico, Ácido Pantotémico, Colina, Cloruro, Manganeso, Zinc, Hierro, Cobre, Cobalto, Penicilina, Procaína, Ácido Arsenílico.

El Pentaclorofenol utilizado en la experiencia se preparó de un producto comercial fabricado por Chapman Chemical Company, Memphis 3, Tennessee, U.S. A., que tiene como ingredientes activos:

Ingredientes:

Activos:	
Bórax	62. 0
Pentacl	25. 3
Sal	
el	4. 5

Inertes:

Preventivos para eliminar el esparcimiento del polvo	3.0%
Otro -	4.2%

Equivalente de 35% Pentaclorofenato de sodio técnico.

Conociendo comercial mente con el nombre de Permatox 10-S. En la obtención del Pentaclorofenol se colocó determinada cantidad de Permatox-10 S en un embudo de separación y se extrajo con éter, luego se evaporó en un aparato especial extrayéndose el residuo con una espátula y luego guardándose. Se tomaron 5 mg de Pentaclorofenato de Sodio y se diluyeron a 5 ml. de K₂HPO₄ a 0.1 M. Ph9 y se inyectaron a las ratas 0.7 mm. que contiene 0.7 rns. diarios, durante 6 días, al día siguiente se sacrifica el animal y se determina el consumo de oxígeno en los homogenizados de hígado. La vía utilizada en la administración del Pentaclorofenol fue intraperitoneal.

La Tiroxina que usamos fue L-THYROXINE SODIUM PENTAHIDRATE M. A. de la Casa Mann Research Laboratories Inc., New York ó N. Y. Se pesaron 10 mg. para diluirlos a 5 ml. de K₂HPO₄ 0.1M. Se inyectaron 1 ml. por vía intraperitoneal diarios durante 6 días (que equivalen a una dosis de 2 mg. diarios).

Nuestra investigación comprende de un estudio comparativo utilizando cantidades diferentes: 6 experimentos normales (que no recibieron ninguna droga); ó experimentos en los cuales se utilizaron 2 mgs. Diarios de TA y finalmente ó en los cuales se utilizaron 0.7 mgs. diarios de PCL. Realizándose en las mismas condiciones ambientales y fisiológicas. Con el objeto de estudiar los efectos en dosis iguales se realizaron experiencias en las cuales se administraron 2 mgs. diarios de T₄ y 2 mgs. diarios de PCL en las mismas condiciones anteriores.

Se practicó estudio anátomo-patológico de los animales sacrificados, no encontrándose alteraciones específicas (examinándose principalmente riñón, corazón, cerebro, diafragma; en este último se encontraron **algunos** cambios inflamatorios que fueron atribuidos a artefacto).

Se estudiaron las modificaciones de peso en rata, exponiéndose a continuación los cuadros respectivos:

Ratas que Recibieron 0.7Mg. de PCL y 2 Mg. T4

Experimento	Peso inicial	PesoFinal	Diferencia
A (T4)	150 gramos	130gramos	- 20
Á (PCL)	152 "	149 "	- 3
3 (T4)	150 "	140 "	- 10
B (PCL)	150 "	151 "	+1
C (T4)	180 "	148 "	- 32
C (PCL)	200 "	192 "	- 8
D (T4)	169 "	139 "	- 30
D (PCL)	200 "	190 "	- 10
E (T4)	175 "	138 "	- 37
E (PCL)	150 "	150 "	0
F (T4)	165 "	150 "	- 15
F (PCL)	178 "	159 "	- 19

Ratas que recibieron 2 Mg. de PCL y 2 Mg. de T, x ó
Días Rata Normal

<u>Experiment</u>	Peso inicial	Peso Final	Diferencia
G (T ₄)	170 gramos	132 gramos	- 38
G (PCL)	151 "	140 "	- 11
G (N)	170 "	180 "	+ 10
H (T ₄)	160 "	132 "	- 28
H (PCL)	170 "	157 "	- 13
H (N)	150 "	162 "	+ 12
J (T ₄)	153 "	144 "	- 9
I (PCL)	166 "	160 "	- 6
I (N)	150 "	183 "	+ 33
J (T ₄)	154 "	116 "	- 38
J (PCL)	178 "	146 "	- 32
J (N)	171 "	190 "	+ 19
K (T ₄)	176 "	135 "	- 41
K (PCL)	153 "	156 "	+ 3
K (N)	164 "	178 "	+ 14
L (T ₄)	160 "	121 "	- 39
L (PCL)	150 "	149 "	- 1
L (N)	150 "	160 "	+ 10

Como puede observarse, en el cuadro primero de dosis diferentes, existe una pérdida de peso mayor para la tiroxina, con un promedio de 24 gramos, para el PCL una pérdida menor de 6,83 gramos.

En el segundo cuadro, con dosis equivalentes para la tiroxina un promedio de 32 gm y para PCL una pérdida de 10 gm., notándose que existe un aumento evidente de peso para las ratas normales de 16.3 gramos.

En el Capítulo III de este trabajo, se explica en forma más detallada el manejo del aparato de Warburg y el método de los experimentos; para tener un concepto más claro, acerca de las variaciones de consumo de oxígeno, véase las gráficas respectivas.

Análisis Estadístico de los Resultados de la Investigación

Expongo a continuación los resultados obtenidos durante el trabajo de investigación. Los ensayos experimentales se realizaron en dos fases, en la primera fase se usaron dosis diferentes (T4 2mgrs. y PCL 0. 7mgrs. diarios por seis días) y en la segunda fase se usaron dosis equivalentes de dos miligramos respectivamente. La variación se realiza con el fin de demostrar que dosis menores de 1 mgrs. producen alteraciones en el metabolismo hepático (investigaciones realizadas por algunos autores informan que dosis de 1 mgrs. diario seis veces por semana durante tres meses, en animales de experimentación, no se observan cambios de toxicidad crónica.) (12 y 18). El empleo de dosis iguales es con el objeto de demostrar si el efecto es similar en el consumo de oxígeno.

Resultados de experimentos con dosis no equivalentes (primera fase)

Generales:

Básales.

Normal	Tiroxina	Pentaclorofenol	
2.37	2.97	1.69	DL ₅₀ = 24,5 mgrs.
1.85	1.52	2.63	Dosis = 0.1225 mgrs.
2.11	1.87	1.74	(0.5% de DL ₅₀)
2.39	3.00	2.42	
2.93	1.82	2.19	
<u>2.47</u>	<u>2.24</u>	2.34	
14.12	13.42	12.71	
Promedio X =	2.35	2.13	2.11
Con Sustrato			
5.664	7.92	7.09	
3.760	4,60	3.28	
3.940	<hr style="width: 50%; margin-left: 0;"/>	3.81	
5.170	7.43	6.31	
4.560	7.27	5.86	
<u>4.650</u>	<u>5.82</u>	5.06	27.74
Promedio - X =	4.62	<hr style="width: 50%; margin-left: 0;"/> 38.68	31.41 5.23

Resultados de experimentos con dosis equivalentes (segunda fase)

Especiales Básales

2.22	3.02	2.26	DL ₅₀ = 24.5 mgrs
2.43	1.97	2.30	Dosis = 0,35 mgrs
2.12	2,10	2.57	(1.43% deDL ₅₀)
2.93	3.00	2.98	
2.80	2.84	2.41	
2.80	2.89	2.34	
2.30			
14.30	15.82	14.86	
Promedio X = 2.46	2.63	2.47	

Con Sustrato

5.42	7.15	6.5G	
5.05	5.81	5.52	
4.69	8.42	5.86	
4,99	7.72	6.01	
4.86	9.61	6.97	
4.85	7.83	6.95	
29,779	46.54	37.81	
Promedio X = 4.96	7.75	6.30	

Cuadro de promedios combinados de experimentos con dosis equivalentes y no equivalentes.

	Basa les		Sustrato	
	Generales	Especiales	Generales	Especiales
Normal	2, 35	2.46	4.62	4.96
T4	2, 13	2.63	6.44	7.75
PCL	2, 11	2.47	5.23	6.30

Prueba de la Significación de los promedios (Examen estadístico de lo Casual y no Casual)

El objeto de esta prueba es determinar si las diferencias del consumo de

Oxígeno entre una rata normal y las otras tratadas con drogas, son estadísticamente significantes. Las dos distribuciones son necesarias que provengan de un mismo universo y como los experimentos son realizados en ratas de una misma cepa las dos colecciones se ajustan a esta condición.

El procedimiento seguido para dicho cálculo es el siguiente: supongamos un tanteo (x), como su promedio X y su dispersión S y con extensión N (número de ensayos).

- La fórmula siguiente

$$t = \frac{\frac{x}{s}}{X} \quad \text{grado de libertad } n - \frac{N - 1}{\dots}$$

t nos da la desviación y n la extensión mediante los cuales buscamos la probabilidad P en las tablas de cualquier libro de estadística

	a	b	(a-b)	(a-b) ²
S1	5.664	7.09	-1.426	2.0230
S2	3.760	3.28	+0.480	0.2300
S3	3.940	3.81	-0.130	0.0169
S4	5.170	6.31	-1.140	1.2996
S5	4.56	5.86	-1.300	1.6900
S6	4.65	5,06	-0.410	0.1681
			-4.400	5.4176
		S(x)		S(x ²)

N número de experimentos

a ³ Consumo de oxígeno de hígado normal

b = Consumo de oxígeno de hígado tratado con PCL

$$X = \frac{4.4}{6} = - 0.733$$

$$\text{Dispersión } S^2 = \frac{1}{N-1} (Sx^2) - X (Sx)$$

$$(S^2) = \frac{1}{6 - 1} (5.4175 - 0.733 (Sx))$$

$$S^2 = 0.2 (5.4175 - 3.225)$$

$$S^2 = 0.2 (2.1925) = 0.43850$$

Desviación Estandard $S = 0.668$

Desviación tipo del promedio $S = \frac{0.668}{\sqrt{2.44}} = 0.314$

Grado de libertad - $n = 6 - 1 = 5$

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{S_x} = \frac{0.733 - 2.334}{0.314}$$

Este resultado nos da un límite de seguridad de 95%, cuando $A \sim 2$ ES el promedio es un 95% del valor real.

Con estos valores se busca en una tabla t (se encuentra en cualquier libro de estadística) y se encuentra que la probabilidad P corresponde o se encuentra entre los valores 0.05 y 0.02.

Si P es inferior a 0.05 vemos la diferencia como significativa. Si P es superior a 0.05, los resultados pueden tratarse de una verdadera casualidad.

En este caso se ha probado que el aumento de consumo de oxígeno en una rata tratada con PCL en comparación con una rata normal, se debe a la acción real de la droga y no a la casualidad.

Esta comparación no podría haberse realizado si las ratas proviniesen de diferentes cepas pues una de las condiciones para esta comparación es que sean en un mismo tipo de cepa para que nos de una aproximación con un ligero error de como si se tratase de una misma rata, en la cual se han hecho las dos determinaciones de consumo de oxígeno en forma normal y cuando se trata con las drogas ya mencionadas.

Con este mismo procedimiento se compara el consumo de oxígeno del tratado con tiroxina y la normal dándonos un P situado entre los valores 0.01 y 0.001 indicativo

de que las diferencias son significantes.

En la parte especial se usó el mismo procedimiento, obteniéndose los resultados siguientes, para el T4 se obtuvo un P situado entre 0,01 y 0.001 que corresponde exactamente al obtenido en la fase general (esto tiene que ser así pues se utiliza la misma dosis). Para el PCL (cuya dosis es igual al de la tiroxina), dio un P situado entre 0/ 0.01 y 0.001. Estos datos demuestran ser mucho más significativos que los obtenidos en la fase general y además puede observarse que estos valores son iguales al de la tiroxina o diciéndolo mejor: que sus P se encuentran entre los mismos límites.

Una vez probado que el aumento del consumo del oxígeno es significativo o sea que la diferencia observada es debida a la acción de las drogas utilizadas en cada fase experimental, necesitamos ahora comparar el aumento del consumo entre las dos drogas usadas; usaremos para esto el mismo procedimiento anterior con el objeto de comprobar que las diferencias entre los dos es casual o se aproxima a le casual o es poco significativa, en cuyo caso esto indicará que ambas drogas tienen una actividad en iguales dosis más o menos semejante en aumentar el metabolismo que se representa por el consumo de oxígeno. En el caso de que fuera significativo

	a	b	<u>a-b</u>	$\frac{2}{(a-b)^2}$
S ₁	7.15	6.50	-0.65	0.4225
S ₂	3.81	5.52	- 0.39	0.1521
S ₃	3/42	5.86	- 2.56	6.5536
S ₄	7.72	6.01	- 1.71	2.9241
S ₅	9.61	6.97	- 2.64	5.9096
S ₆	7. d3	6.95	<u>-0.68</u>	2 0.7744
			S(x) 8.83	S(x) 16.8163

N número de experimentos

a consumo de oxígeno en rata tratada con tiroxina

b consumo de oxígeno en rata tratada con PCL

$$\bar{X} = 1.471$$

$$\begin{aligned} \text{Dispersión } S^2 &= \frac{1}{N-1} (Sx^2 - X (S_x)) \\ S^2 &= \frac{1}{6-1} (16.8163 - 1.471 (8.83)) \\ S^2 &= \frac{0.765}{0.765} \\ S^2 &= 0.874 \end{aligned}$$

$$\text{Desviación tipo del promedio } S_x = \frac{0.874}{2.44}$$

$$S_x = 0.358$$

$$t = \frac{1.471}{0.385} = 4.10$$

P se encuentra entre los valores 0.01 y 0.001.

En este caso que la diferencia es significativa, interesa saber ahora a cuánto equivale en actividad de tiroxina 2 mgrs. De PCL y utilizaré para ello la comparación con un coeficiente de regresión tipo.

El cálculo de la concentración relativa a la sustancia activa en el incógnito (se llamará así al PCL) y en el Patrón (se llamará así a la tiroxina), se realiza suponiendo que los valores medios de los efectos de ambas sustancias están situadas en una misma línea recta cuya inclinación b tiene el valor encontrado experimentalmente.

La cantidad de sustancia activa d_1 contenida en la dosis del incógnito X_1 será:

$$d_2 = d_1 + (m_{y2} - m_{y1})/b$$

$$X_2 = 7.75 = m_{y2} T_4$$

$$X = 6.30 = m_{y1} = \text{PCL}$$

$$d_2 = 2.00 \text{ mgrs. } T_4$$

$$b = 1.41 = 7.75 - 6.30$$

$d_1 =$ Cantidad de Sustancias x

$$2.00 = x + 7.75 - 6.3 / 1.45$$

$$X = 1$$

La explicación gráfica de la comparación con un coeficiente de regresión Sea la ecuación de la recta $y = a + bx$, donde x e y representan las dos variables a es la ordenada al origen b la pendiente o incremento de y por incremento unitario de x es evidente que $X_2 - X_1$ es igual a la distancia $m_{y1} - A$, la cual es a su vez $m_{y2} - m_{y1}$ (2)

$$y = a + bx$$

$$7.75 = 6.30 + 1.45x$$

$$7.75 - 6.30 = 1.45x$$

$$1.45 = 1.45 x$$

$$x = 1$$

El resultado indica que 2 mgs de T4 hacen cuatro de Pentaclorofenol, las dosis equivalentes para un aumento del metabolismo, representado para el consumo seria 4mg de PCL y 2 mg. de T4, este resultado está basado en los cálculos estadísticos, falta comprobar si estos valores corresponden en forma biológica. Queda esta incógnita para futuras investigaciones.

CAPITULO V

RESUMEN GENERAL. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Se han revisado cuidadosamente los distintos trabajos científicos acerca del Pentaclorofenol, un dato curioso es que el Pentaclorofenol fue aislado en 1842 y la Tiroxina en 1915; han transcurrido hasta la fecha actual más de un siglo del descubrimiento del Pentaclorofenol y cincuenta años del aislamiento de la Tiroxina, lo que nos indica que a pesar del tiempo no se tiene un conocimiento de la acción íntima de estas dos sustancias.

1. Resumen

- a) Se describen los detalles históricos acerca del Pentaclorofenol
- b) Se dan las consideraciones generales acerca de la estructura química propiedades físicas, vías de absorción, mecanismo de acción, efectos metabólicos y manifestaciones clínicas estableciéndose comparaciones entre el T₄ y PCL
- c) Se explica la acción desacopladora en la fosforilización oxidativa y los cambios mitocondriales que suceden cuando se ha administrado Pentaclorofenol y Tiroxina
- d) Los animales de experimentación fueron ratas machos con promedio de 150-200 gramos
- e) Se describe detalladamente el manejo y funcionamiento del Aparato de Warburg, dándose una explicación detallada del procedimiento y de los cálculos del consumo de oxígeno
- f) Se explican detalladamente los experimentos efectuados, trabajándose siempre con la misma dieta y en las mismas condiciones ambientales, Comprendiendo el trabajo dos fases experimentales: seis experiencias

en las cuales se trabajan a dosis diferentes PCL 0.7 mg. y T₄ 2mg.; fase 2; en la cual se establece comparación con dosis de 2 mg. respectivamente de T₄ y PCL.

- g) Se practica estudio anatómico patológico de los animales sacrificados, no encontrándose alteraciones específicas
- h) Se realizan comparaciones estadísticas tabulándose los resultados y obteniéndose las conclusiones generales
- i) Se revisa la bibliografía señalándose algunas conclusiones importantes que discrepan con los trabajos de algunos autores.

2, Conclusiones

- a) Primero se observó franca pérdida de peso en los animales tratados con Tiroxina, lo mismo ocurrió con los que recibieron Pentaclorofenol, en un grado menor, pero significativo; las ratas normales aumentaron de peso
- b) Promedio de los experimentos Generales (0.7 mg. PCL, 2mg. T₄ diarios por seis días)

	Basal	
Normal	T ₄	PCL
2.35	2.13	2.11
	Con Sustrato	
4.62	6.44	5.23

- c) Promedio de los experimentos Especiales (2 mg. T₄ y PCL respectivamente)

	Basal	
Normal	T ₄	PCL
2.46	2.03	2.47

Normal	T ₄	PCL
4.96	7.75	6.30

- d) Como puede observarse en los cuadros, el consumo de oxígeno en los animales tiroxinizados, fue ligeramente más alto que los que recibieron Pentaclorofenol; y sumamente incrementado en comparación con los normales,
- e) Se determina la actividad biológica de manera que 2 mg. de T. corresponden a 4 mg. de Pentaclorofenol, desde el punto de vista del consumo de (Método Estadístico)
- f) Se demuestra que existen cambios significativos con una dosis de G. 7 mg. dato que está en contra de los informes publicados por algunos autores en que dosis de 1 mg. durante 15 semanas no producen cambios meta-tóxicos
- g) Por imposibilidad de microscopio electrónico tío se lograron poder estudiar los cambios en la membrana mitocondrial producidos por la T₄ y cotejarlos con el PCL.
- h) Por imposibilidades técnicas, no fue posible publicar en esta fecha nuestro trabajo sobre la eliminación de carbono 14 en ratas tratadas con PCL y T₄ (estudio que saldrá a publicación en este año)

3. Recomendaciones

- a) Que los individuos sometidos a la exposición, ya sea aguda o crónica por circunstancias profesionales, tienen que ser estudiados previamente mediante un examen metabólico y clínico, sobre todo de riñón, hígado y tiroides. Es sumamente importante que no presenten deficiencias nutritivas (principalmente en Riboflavina) y alteraciones en los Órganos anteriormente señalados
- b) Que los individuos que manipulan el Pentaclorofenol deben de tener todas las condiciones de protección de acuerdo con las recomendaciones que indican las casas productoras y que se señalan en los diferentes trabajos publicados (12, 18, 31), evitándose el contacto directo mediante ropas especiales, máscaras, guantes, etc.
- c) Desde el punto de vista de investigación, es necesario que se llegue a un estudio metabólico del Pentaclorofenol para dar una explicación más satisfactoria acerca de su acción íntima en la vida de los diferentes agentes que atacan la madera, sobre su cualidad moluscocida, fungicida, etc.

- d) Despertar la inquietud para que se realicen trabajos de experimentación acerca de los cuidados que deben tenerse sobre la madera, ya que ésta representa una gran riqueza forestal en nuestro país, sugiriendo la posibilidad de preparar en el futuro un compuesto altamente potente como fungicida, pero que constituya un menor peligro para la salud pública
- e) El estudio del Pentaclorofenol revela un campo amplio en los mecanismos bioquímicos que se verifican en la mitocondria celular, y es posible que realizando trabajos más avanzados se llegue a entender algunos aspectos de la acción de la Tiroxina, antibióticos y tóxicos que son usados en la lucha contra las diferentes especies biológicas que agreden al hombre.

BIBLIOGRAFÍA

1. - ASANO, ÁKIRA and ARNOLD F. BRODIE.: "Phosphorylation coupled to different segments of the respiratory chains of mycobacterium. Phlei." J. Biol. Chem. 240; 4002-10, Oct.65
2. - BANCROFT, HULDAH: "Introducción a la Bioestadística". 1a.ed. Buenos Aires Editorial Universitaria, 1960. Pág. 60.
- 3.- **BARD, PHILIP; Medical Physiology. 7a. ed, St. Loáis, Mosby* 1961. Pág. 789, 791**
4. - RARKER, S.B.í "Thyroid", Ann. Rev. Physiol. 17;417-441, 1955.
5. - BELL, GEORGE H.; J. NORMAN DAVIDSON and HAROLD SCARBOROUGH.: Textbook of Physiology and Biochemistry. 5th ed. London, E. & S. Livingstone, 1963, Pag. 959.
6. - BURCH, HELENB. F. EDMUND HUNTER, Jr., ANNA M. COMBS and SEVERLY A. SCHUTZ.: "Oxidative enzymes and phosphorylation in hepatic mitochondria from riboflavin deficient rats." J. Biol. Chem. 235: 1183-86, Apr.1960.
7. - CANTAROW, ABRAHAM and BERNARD SCHEPARTZ. Bioquímica. 3a. ed. México, Interamericana, 1964, Pág.
8. - CHEFURKA, >V. "Studies on the inhibition of the mitochondrial A.T. P. ase by reduction of the respiratory chain". Cañad J. Biochem. Physiol. 38:1195-98, 1960
9. - CIBA FOUNDATION. Colloquia on Endocrinology. Vol. 10: 230-252, 1957.
10. - CUTTING, WINDSOR C.: Handbook of Pharmacology; the Actions and Uses of Drugs. New York, Meredith Publishing, 1962.
- 11, - DAVSON, HUGH. Textbook of General Physiology. 2nd ed. Boston, Little Brown, 1959.
12. - DEICHMANN, W., W. MACKLE, K.O. KITMILLER and G. THOMAS.: "Acute and chronic effects of pentachlorophenol and sodium pentachlorophenate upon experimental animals", j. Pharmacol. 76; 104-117, 1942
13. - DONALDF, TAPPLEY and CECIL COOPER.: "The effect of thyroxine and compounds on oxidative phosphorylation." J. Biol. Chem. 222: 341-349, Sep. 1956.
14. - DUBOIS, KENNETHP. and EMKGEILING. Textbook of Toxicology. 1a. ed. New York, Oxford Univ. Press, 1959. Pag. 230.

15. - DUNCÁN DALLAN, R. and JOHN M. REED, "The effect of thyroxine on mitochondrial oxidation and swelling". J. Biol. Chem. 235: 1183-1186, Apr,
16. - DREISBACH, ROBERT H. Handbook of poisoning. 4th ed. Canada, Lange Medical Publications, 19. Pág. 256.
- 17.- EICHHELTZ, FRITZ. Tratado de Farmacología. Traducido al español por Fernando Peran Torres. Madrid, Edición Aguilar, 1963, pág. 101.
18. - FABRE, RENE et RENE TRUHAUT. Toxidologie des produits phytopharmaceutiques. 1a. ed, Paris, Société d'Edition Enseignement Supérieur, 1954. Pag. 191.
19. - FRUTON, JOSEPH S. and SOFÍA SIMMONDS, General Biochemistry. 2nd. Edition. New York, John Wiley & Sons, 1959.
- 20.- GANON G., WILLIAMS, Manual de Fisiología Médica, 1a. ed. Canadá, Lange Medical Publicación, 1965.
- 21.- GIESE, ARTHUR C. Fisiología. General; Estructura y Dinámica Celular. 2nd. ed. México, Interamericana, 1965. Pág. 478.
- 22.- GOTH, ANDRÉS. Farmacología Médica, Principios y Conceptos. 3rd. ed. México, D.F., Interamericana, 1966. Pag. 449.
23. - GREEN, DAVID E. and HELMUT BEINER. "Biological oxidations" Aun. Rev. Biochem. 24: 1-44, 1955.
24. - GROLLMAN, ARTHUR, Pharmacology and Therapeutics. 5th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1962.
25. - GROSS, J., D.F. FORD, S. SYMCHAWICZ J. H. HORTON. "The distribution and metabolism of thyroid hormones". London, J. & A. Churchill, 1957. Pág. 182-89. (Giba Foundation. Colloquia on Endocrinology V. 10)
- 26.- GUNTHER, BRUNO Y JAIME TALESNIK. Fisiología Funcional, 1a. ed. Chile. Ediciones de la Universidad de Chile 1963 V.I: 403.
- GUYTON, ARTHUR C. Fisiología Médica. 2a. ed. México, Interamericana, 1977.
- 28.- HARPER, HAROLD A.: Manual de Química Fisiológica, 1a. ed. México, D.E Manual Moderno, 1965, Pag. 137.
29. - HAWK, PHILIP S., BERNARD L. OSER and WILLIAM H. SUMMERSON. Practical Physiological Chemistry. 13th. ed. New York, McGraw Hill Book, 1954, Pag. 341-48.

30. - HERSEY, DAVID F. and SAMUEL J. AJ L. "Adenosine triphosphate formation in the oxidation of succinic acid by bacteria" J. Biol. Chem. 91: 113-121, July 1951.
- 31.- HERRERA, ÓSCAR LEONEL. "Intoxicación con pentaclorofenato de sodio". Tegucigalpa, D.C., Univ. Nac. Autónoma de Honduras, Facultad de Ciencias Médicas, 1966. (Tesis).
32. - HOFFMAN, WILLIAM S. The Biochemistry of Clinical Medicine. 3rd. ed. Chicago, Year Book Medical, 1964. Pag. 584.
33. - JERGENSEN, EUGENE, NICOLÁS ZENKER and CYRUS GREENBERG. "Antigoitrogenic and calorogenic activity of some alkyl substituted analogues of thyroxine" J. Biol. Chem. 225: 1732-1737, June 1960.
34. - KAJI, AKIRA and SIDNEY P. COLOWICCK. "Adenosine triphosphatase activity of yeast hexokinase and its relation to the mechanism of hexokinase reaction" J. Biol. Chem. 240: 4454-62, Nov. 1965.
35. - KAMIN, HENRY, MILDRED A. KEEN, and PHILIP HANDLER. "Stimulation by dinitrophenol of formation of melanin, like substance from tyrosine by rat liver homogenates." J. Biol. Chem. 225: 735-744, Apr. 1957
36. - KLEINER, ISRAEL S., JAMES M. OKTEN. Biochemistry. 6th ed. St. Louis, Mosby, 1962. Pag. 445.
37. - KRANTZ, JOHN C. and C. JELLEFF CARR. Pharmacologic Principles of Medical Practice. 5th. ed. Baltimore, Williams & Wilkins.
38. - LEICESTER, HENRY M. "Recent research in metabolism and endocrinology." Ann. Rev. Physiol. 21: 474-98, 1959.
- 39.- LEÓN GÓMEZ, ALFREDO, CESAR LOZANO CABALLERO. "Intoxicación con Pentaclorofenato de sodio en Honduras". Rev. Med. Hña. 33: 7-10, Ene.-Mar., 1965.
40. - LYNN, G. E. "Oral toxicity pentachlorophenol" Midland Agricul. Chemitesear. Feb. 19, 1959.
41. - MARTIN E., ERIC W., FULLERTON COOK, E. EMERSON LEVALLEN (and others). Farmacia Práctica de Remington. 2nd. ed. México, UTEHA, 1965, Pag. 1348.
42. - THE MERCK INDEX OF CHEMICALS AND DRUGS. 6th ed. Rahway, New Jersey, Merck & Co. 1952. pag.726.

43. - MORRISON, MARTIN. "Biological oxidation". Ann.Rev.Biochem. 30:11-44, 1961 44.
- NEILANDS, J.B. "Biological oxidations". Ann.Rev. Bioche. 27: 455-482, 1958
- 45.- NOLLER, CARLOS R.: Química de los Compuestos Orgánicos. 2nd. ed. Buenos Aires, Editorial Médico Quirúrgica, 1961. Pág.
- 46.- NORMAN, A.Vv. LORAN L, BIEBER O. LINDBERG, and P.D. BOYER.: "Relationships of Ca to Protein Bound. Phosphate fractions of mitochondria" J. Biol.Chem. 24: 2855-62. July, 1965.
47. - PACKER, LESTER. "Metaboiic and structural states of mitochondria reguítation by adenosine diphosphate". J. Biol. Chem. 235: 242-249, Jan. 1960.
48. - PEFSKY, HARVEYS. and ROBERT C, WARNER. "Studies on the mechanism of cold inactivation of mitochondriai adenosine triphosphatase" . J. Biol. Chem. 240: 4694-4702. Dec. 1965.
49. - PERRY, S.V. "The Biochemistry of muscle". Ann. Rev. Biochem. 30:473-498, 1961
50. - PIULACHS, P. yJ.M. CANADELL. Enfermedades del tiroides, la. ed. Barcelona, Publicaciones Médicas José janes. 1950, Pág. 28.
- 51.- SALTER, WILLIAM T. Tratado de Farmacología aplicada, la. ed. México, Interamericana, 1953. V. I: pag. 663.
52. - SAMSON WRIGHT'S. Applied Physiology. 10th ed. New York, Oxford Univ. Press, 1961. Pag. 403.
53. - SLATER, E.C. "Biological oxidations". Ann.Rev.Biochem. 22:17-56, 1953
54. - SOKOLOFF, LOUIS, SEYMOUR KAUFMAN. "The effects of thyroxin on aminoacid. Incorporation in to protein" SCIENCE 29: 569-570, Feb. 27, 1959.
55. - SOLIMANN, TORALD. Farmacoiogfa y sus aplicaciones a la terapéutica y Toxi-cologfa. Reimpresión rev. la. ed. Barcelona, Salvat Editores, 1955, Pag. 1173-74.
- 56.- SWANSON, MARJORÍE A. "Phosphatases of the liver" j. Biol. Chem. 191:577 -590. Aug. 1951.
57. - THIBAUT, ODETTE. "Thyroid Hormones at the peripheral tisú level. Metabo-lism and mode of action" (En Ciba Foundation) Colloquia on Endocrinology V. 10: 230-252, 1957.

58. - U.S. COMMUNICABLE Disease Center, Atlanta Technology Branch.
 "Pentachlorophenol" (En Clinical handbook on economic poisons emergency information for treating poisoning (by) Waland J. Hayes, Atlanta, Communicable Disease Center, Toxicology Section, 1963. (Public Health Service Publication, No. 476, rev.). Pag. 109-113.
59. - U.S. COMMUNICABLE Disease Center, Atlanta, Tecnology Branch.
 "Dinitrophenols". (En Clinical handbook)
 (Public Health Service publication, No. 476, Rev.) Pag. 109-113.
60. - VELICK, SIDNEY F. "Biological oxidations" Ann. Rev. Biochem. 25:257-290
61. - WAYNE KIELLEY, W. and RUTH K. KIELLEY: "Myokinase and adenosine triphosphatasa in oxidative phosphorylation" J. Biol. Chem. 191: 485-500 Aug. 1951.
62. - WHITNEY, FREDERICK L. Elementos de investigación. Tr. de la 3a. Ed. por José Savé. Barcelona, Ediciones Omega, 1958. (Cap. IX pag. 185)
63. - WHITE, ABRAHAM, PHILIP HANDLER, EMILL., SMITH De. WITT STETTEN, Jr. Principles of Biochemi&try. 3rd. ed. New York, McGraw-Hill Book, 1964 pag. 330.
64. - WILLIAMS, ROBERT H. Textbook of Endocrinology. 3rd. ed. Philadelphia, Saunders, 1962, Pag. 109.
65. - WURMSER, RENE: "Biological oxidations free energy of reactions". Ana, Rev. Biochem. 20: 1-22, 1951.
66. - ZALKIN, H., MAYNARD E. PULLMAN and E. RACKER. "Formation of a complex between coupiing factor 1 and adenosine dhosphate and its relation to the \A_C-adenosine diphosphate -adenosine triphosphate exchange reaction" J. Biol. Chem. 240: 4011-4016, Oct. 1965.
67. - ZALKIN, H. and E. RACKER. "Properties of coupiing Factor 4" J. Biol. Chem. 240: 4017-4022, Oct. 1965.