

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



INTERACCION DE HEXACLOROFENO CON  
PROTEINAS DE PLASMA SANGUINEO, MEMBRANA  
DE ERITROCITOS Y TEJIDO NERVIOSO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A

ARACELI CONSUELO HINOJOSA JUAREZ

MEXICO, D. F.

1979



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AS TESIS 1979  
DE N. T. 170  
FECHA \_\_\_\_\_  
PROG \_\_\_\_\_  
B \_\_\_\_\_



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN TEMA.

PRESIDENTE.	<u>IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA.</u>
VOCAL.	<u>ENRIQUE CALDERON GARCIA.</u>
SECRETARIO.	<u>CARLOS RAMON GARCIA.</u>
1er.SUPLENTE.	<u>ENRIQUE SANCHEZ SALOMA.</u>
2do.SUPLENTE.	<u>MA.DOLORES LASTRA AZPILICUETA.</u>

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS.

CIUDAD UNIVERSITARIA.

U.N.A.M.

SUSTENTANTE: ARACELI CONSUELO HINOJOSA JUAREZ.

ASESOR DEL TEMA: CARLOS RAMON GARCIA.

EL PROYECTO FUE ORIGINADO POR EL DR. GUSTAVO FLORES Y SE REALIZO BAJO SU DIRECCION EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS. DEBIDO A LA AUSENCIA DEL DR. FLORES DEL PAIS, LA REDACCION Y REVISION FINAL DEL TRABAJO FUE HECHA BAJO LA SUPERVISION DE LOS DOCTORES CARLOS RAMON GARCIA Y FELA VISO. A QUIENES HAGO PATENTE MI AGRADECIMIENTO.

A LA MEMORIA IMPERECEDERA DE MI ADORADO PADRE:  
PROFR. MANUEL HINOJOSA GILES, QUE CON SU INMEN-  
SO AMOR, Y EJEMPLAR VIDA DE HOMBRE RECTO SUPO-  
GUIARME POR EL CAMINO DEL SABER HASTA EL ULTI-  
MO MOMENTO DE SU VIDA.

A MI MADRECITA CONSUELO JUAREZ DE HINO-  
JOSA COMO UN HUMILDE HOMENAJE A QUIEN EN  
SILENCIO ME DIO EJEMPLO, VIDA Y AMOR.

A MIS QUERIDOS HERMANOS: CARMELA, MANUEL,  
IDALIA, JORGE Y LOURDES, CON MI PROFUNDO  
AGRADECIMIENTO POR SU EJEMPLO, COMPREN—  
SION Y RESPALDO, PARA HACER POSIBLE LA —  
REALIZACION DE MI CARRERA.

A MIS HIJAS: ARACELI Y ALEJANDRA:  
CON TODO MI AMOR.

A MI ESPOSO: DR. ALFREDO CABRAL CASAS  
CON ADMIRACION, AGRADECIMIENTO Y AMOR.

A LA FACULTAD DE QUIMICA.

A MIS MAESTROS CON INMENZA GRATITUD.

CONTENIDO.

	Página.
AGRADECIMIENTOS.	
LISTA DE CUADROS Y TABLAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
I. INTRODUCCION.....	1
II. PROPIEDADES DEL HEXACLOROFENO.....	3
A. ASPECTOS FISICOS Y QUIMICOS.....	3
B. ASPECTOS FARMACOLOGICOS.....	4
1. Eficacia.....	4
2. Toxicidad.....	6
a) DL <sub>50</sub> .....	6
b) Efectos en tejido nervioso..	7
c) Absorción a través de la piel y concentración en sangre...	11
d) Estudio en membranas.....	12
3. Eliminación.....	12
4. Efectos Bioquímicos.....	13
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	15
A. Preparación de membranas de eri- trocitos.....	15
B. Preparación de proteínas básicas de mielina.....	17
C. Separación de diferentes tipos - de sinaptosomas.....	18
D. Medición de proteínas con el reac- tivo de Folin.....	21
E. Electroforesis en gel de poliacri- lamida.....	22
1.- Preparación de la solución de proteínas.....	23
2.- Purificación de acrilamida y metilénbisacrilamida.....	24

3.- Preparación de los geles.....	24
4.- Preparación de las muestras.....	24
F. Preparación de las muestras para la determi- nación de Carbón-14.....	25
IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	27
V. RESUMEN.....	48
VI. APENDICE.....	50
VII. BIBLIOGRAFIA.....	56

LISTA DE CUADROS.

Página.

CUADRO No. 1	Distribución del hexaclorofeno C-14 unido a las fracciones de proteínas plasmáticas de diverso origen, después de realizar electroforesis de dichas muestras separadas por diálisis. ....	29
CUADRO No. 2	Distribución del hexaclorofeno C-14 unido a las fracciones de proteínas eritrocíticas de diverso origen, — después de realizar electroforesis de dichas muestras separadas por — diálisis. ....	32
CUADRO No. 3	Distribución del hexaclorofeno C-14 unido a las fracciones de proteínas de tejido nervioso de rata, después de realizar electroforesis de dichas muestras separadas por diálisis. ....	35

LISTA DE TABLAS.

TABLA No. I.	Cálculo del Peso Molecular de las — bandas protéicas de mayor contenido de hexaclorofeno radioactivo. ....	39
TABLA No. II.	Radioactividad en muestras de proteínas de tejido nervioso-hexaclorofeno C-14, después de la diálisis. (Cuentas por minuto).....	41

TABLA No. III	Hexaclorofeno unido por mg de proteína después de la diálisis de diversas muestras de tejido nervioso en contacto con 1 ml de hexaclorofeno C-14, $1 \times 10^{-4}$ (En nanomoles).....	44
TABLA No. IV	Parámetros de la ecuación de línea recta $y=mx+b$ , obtenidos al ajustar los datos de hexaclorofeno unido por mg de proteína contra $\mu\text{g}$ de proteína, por el método de mínimos cuadrados.....	46
LISTA DE FIGURAS.		
FIGURA No. 1	Gráfica empleada para la determinación del peso molecular de la banda proteica de mayor radioactividad.....	38
FIGURA No. 2	Gráfica de radioactividad (cuentas por minuto) contra cantidad de proteína ( $\mu\text{g}$ ) después de una diálisis de diferentes muestras de tejido nervioso en contacto con 1 ml de hexaclorofeno C-14, $1 \times 10^{-4}$ M. ....	42
FIGURA No. 3	Gráfica de n moles de hexaclorofeno unido por mg de proteína contra $\mu\text{g}$ de proteína, después de una diálisis de diferentes muestras de tejido nervioso en contacto con 1 ml de hexaclorofeno C-14, $1 \times 10^{-4}$ M.....	45

## I. INTRODUCCION.

El hombre está expuesto constantemente a una gran variedad de compuestos químicos, algunos aparentemente inocuos y otros definitivamente tóxicos, que se han utilizado cada vez con mayor frecuencia por la sociedad moderna. Uno de estos compuestos químicos es el hexaclorofeno, bisfenol clorado, que se emplea desde 1945 como germicida, fungicida y antiparasitario (5).

El hexaclorofeno se encuentra incorporado a una gran variedad de productos comerciales entre los que se encuentra: antiperspirantes, pastas dentales, jabones, shampoos, cremas, cosméticos y desodorantes vaginales (29); en éstos, el agente químico está en contacto con la piel y otras partes del organismo humano.

Recientemente se han publicado datos de toxicidad cutánea del hexaclorofeno, especialmente en niños, así como alteraciones de tejido nervioso, hemólisis de eritrocitos y alteraciones bioquímicas de algunas enzimas y proteínas (18, 19, 33, 50).

En otros estudios (11, 19, 20), se ha propuesto las manifestaciones tóxicas del hexaclorofeno son impedidas por su unión a proteínas en las membranas de eritrocitos y de tejido nervioso. La toxicidad se explica en base a la presencia de hexaclorofeno libre, debida ya sea a una saturación de las proteínas, a concentraciones elevadas del compuesto, o bien, debida a concentraciones bajas de proteínas.

El presente trabajo ha tenido como propósito aportar datos al estudio de la interacción del hexaclorofeno con las proteínas plasmáticas, de membranas de eritrocitos y de tejido nervioso, (se propone que estas es—

estructuras poseen una proteína que se une al hexaclorofeno e impide que este presente manifestaciones tóxicas).

La presentación del trabajo se ha organizado de la siguiente manera:

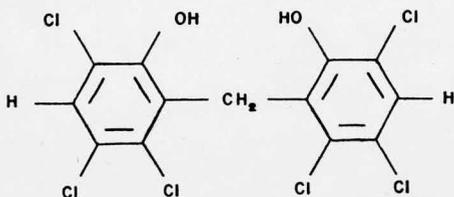
En el capítulo II se examinan diversas propiedades del hexaclorofeno: en el siguiente capítulo se presenta la fase experimental (capítulo III), - seguido de los resultados y conclusiones obtenidos (capítulo IV). Finalmente, se hace un resumen (capítulo V), se anexa una apéndice (capítulo VI) - con los datos directos del aparato de conteo de radioactividad y la bibliografía consultada, enlistada en orden alfabético (capítulo VII).

## II. PROPIEDADES DEL HEXACLOROFENO.

### A. Aspectos Físicos y Químicos.

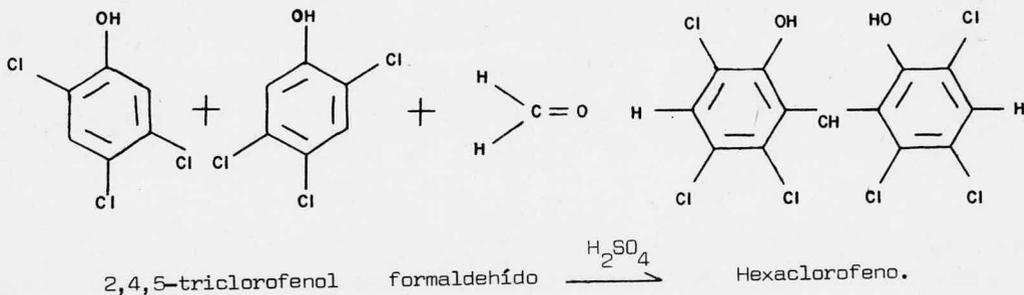
El hexaclorofeno es un polvo blanco, prácticamente insoluble en agua; soluble en alcohol, acetona, éter, cloroformo, propilenglicol, aceite de olivo y soluciones alcalinas diluidas. Forma sales con álcalis y éteres alcalinos. Fórmulas:  $C_{13}H_6O_2Cl_6$ , P.M.: 406.92, punto de fusión: 164-165 — (26, 52).

Químicamente, el hexaclorofeno es un bisfenol clorado, 2,2'-metilén bis (3,4,6-triclorofenol):



2,2'-metilén-bis (3,4,6-triclorofenol)

Este compuesto ha sido sintetizado por condensación de dos moléculas de 2,4,5-triclorofenol con formaldehído en presencia de ácido sulfúrico — (28), como se muestra a continuación:



## B. Aspectos Farmacológicos.

### 1.- Eficacia.

#### Estudio como agente antibacteriano.

El hexaclorofeno se ha aplicado sobre la piel de niños recién nacidos como agente profiláctico contra infecciones producidas por Staphylococcus aureus, desde 1945 en que se empezó a emplear. Farquharson (17), Haryment (30) y Saffer y col. (48), fueron los primeros en reportar eliminación de pioderma al aplicar hexaclorofeno al 3% en toda la piel y el cordón umbilical de los recién nacidos. Posteriormente, Williams y Oliver (56) y Gluck y col. (27), describieron experiencias del uso del hexaclorofeno para el cuidado de la piel de niños recién nacidos, en los cuales se demostró una incidencia muy baja de infecciones estafilocócicas; se obtuvo una reducción máxima de éstas cuando se aplicaron preparaciones de hexaclorofeno durante las tres primeras semanas de vida, o al aplicar ungüento con neomicina-polimixina en el cordón umbilical (22).

Todos los reportes publicados sobre hexaclorofeno, en un período aproximado de 15 años, fueron favorables para éste; sin embargo, en 1971 la FDA señala que es inadecuado, irresponsable, innecesario y no se autoriza su empleo, por tener datos de toxicidad, sobre todo en tejido nervioso (18).

Recientemente, Light y Sutherland (38), observaron que la frecuencia de enfermedades severas producidas por Staphylococcus aureus disminuía y que ésto se debía a la disminución espontánea de las infecciones producidas por Staphylococcus aureus tipificado con el fago 80/81. Encontraron que durante un período de 12 años, comprendidos entre 1960 y 1972, la frecuencia de infecciones producidas por Staphylococcus aureus disminuyó des-

de el 17.8% hasta el 6.5% del total de estas infecciones, a la vez que las producidas por Staphylococcus aureus tipificado con el fago 80/81, disminuyeron del 15.3% al 6.5% durante el mismo período. Además, se encontró que el baño con hexaclorofeno nunca se empleó en la sala de prematuros, donde ocurrió una disminución similar de S.aureus tipificado con el fago 80/81, de un promedio de 10.7% a 6.4%. La observación de que esta disminución es un suceso anterior a la introducción del baño con hexaclorofeno y que continuó durante cuatro años posteriores a su eliminación, resulta altamente significativo.

Se concluyó que este decrecimiento no tuvo relación con el empleo — del hexaclorofeno en el baño del recién nacido, ya que comenzó antes del uso de éste y continuó cuatro años posteriores a su eliminación (38).

Porfar y col. (22), amplificaron los estudios del efecto que tiene — el baño diario con hexaclorofeno en los niños y encontraron que no únicamente actuó sobre S.aureus, sino que también modificó la flora Gram-negativa. Al emplear hexaclorofeno, la frecuencia de enfermedades estafilocócicas disminuyó de 10% a 3%, al mismo tiempo que la incidencia de infecciones producidas por Gram-negativos aumentó significativamente de 0.9% a 5%; en contraste, en los hospitales en los que no se empleó hexaclorofeno, la tasa de colonias tanto de S. aureus, y bacilos Gram-negativos, permaneció inalterada. Estos datos concuerdan con las observaciones de estudios previos (36), que demostraron una relación recíproca entre la frecuencia de infecciones producidas por S. aureus y bacilos Gram-negativos, aún cuando este fenómeno biológico no es exclusivo del hexaclorofeno.

Finalmente, se puede decir que hay un gran número de variables involucradas en la determinación de la flora ambiental propia de un hospital y antes de decidir sobre el control que se va a realizar, deben considerarse

los efectos indeseables que pueden resultar de las medidas de control empleadas.

## 2.- Toxicidad.

Se consideró pertinente para este trabajo revisar los siguientes aspectos de toxicidad del hexaclorofeno. a) Dosis letal media ( $LD_{50}$ ), b) Efectos en tejido nervioso. c) Absorción a través de la piel y concentración en sangre, d) Estudios en membranas.

### a) Dosis Letal Media ( $LD_{50}$ ).

Existen numerosas pruebas en animales para determinar la  $DL_{50}$  y dosis tóxica subaguda de hexaclorofeno, encontrándose una gran variabilidad en los datos; la variabilidad depende de:

- i) la especie y el sexo del animal estudiado.
- ii) el estado físico del hexaclorofeno.

Así, se tiene que en cuanto a la especie empleada, la  $DL_{50}$  es de 250 mg/kg en cuyos, 200 mg/kg en ratones y 140 mg/kg en perro (10, 21, 32). Además, se reporta que para ratas hembra y macho la  $DL_{50}$  oral es de 56 y 66 mg/kg, respectivamente (26).

En cuanto al estado del hexaclorofeno, se ha encontrado que la  $DL_{50}$  en ratones es de 161 mg/kg cuando se administra en medio acuoso en propilenglicol, mientras que en suspensión es de 146 mg/kg (29, 53). Al estudiar la dosis subaguda en ratas, se alimentó a los animales con 36 mg/kg/día de hexaclorofeno (500 ppm), observándose que presentaban parálisis de los miembros posteriores, diarrea, pérdida de peso y, al observar los cerebros

al microscopio, presentaban edema cerebral y degeneración esponjosa de la materia blanca. Cuando se alimentó a los animales con 28.8 mg/kg/día — (400 ppm) y 14.4 mg/kg/ día (200 ppm) de hexafluorocloro, durante un período más prolongado, se observó que, además de los síntomas ya mencionados, presentaban cambios patológicos en hígado y riñón (10, 43).

b) Efectos en tejido nervioso.

Se ha señalado al hexafluorocloro como responsable de producir daño — en sistema nervioso central (18, 31, 44, 49). Por esta razón, varios investigadores determinaron el grado de toxicidad de tratamientos a base de compuestos de hexafluorocloro, sobre tejido nervioso.

Así, Powell y col. (46), estudiaron 69 casos de niños a quienes se les había aplicado hexafluorocloro y que murieron en un período perinatal. — En siete de ellos observaron estratos esponjosos de los tractos mielinizados, que en estudios microscópicos confirmaron la presencia de amplios espacios interlaminares dentro de las vainas de mielina. Observaron una relación directa entre la mielinopatía y exposición de hexafluorocloro. Además, — consideraron los siguientes factores como contribuyentes al desarrollo de estas mielinopatías.

Ninguno de los niños que presentaron estratos esponjosos pesó más de 1.400 g al nacer; seis de los niños afectados tenían seis o más exposiciones al hexafluorocloro; en los niños con alteraciones neurológicas se observaron escoriaciones, heridas y erupciones dérmicas. Estos datos fueron confirmados por Shuman y col. (49). Así, los factores importantes correlacionados a la aparición de las alteraciones citadas son:

- i) peso bajo al nacer.
- ii) número de exposiciones al hexafluorocloro.

iii) alteraciones en la piel.

Larson (37), observó que al aplicar hexaclorofeno a pacientes quemados, tanto a niños como a adultos, el compuesto pasaba rápidamente a través de la herida y, si la concentración en sangre era significativamente elevada, podía dar como resultado convulsiones.

Por otra parte, en el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los E.U.A. (42), se estudiaron seis pacientes expuestos al hexaclorofeno. Dos de ellos eran adultos que accidentalmente habían ingerido la sustancia y los cuatro restantes eran niños que presentaron quemaduras tratadas a base de compuestos que contenían hexaclorofeno. Los cerebros de los seis pacientes presentaban edema severo y degeneración esponjosa de la materia blanca. Los signos y síntomas de intoxicación, después de la ingestión del compuesto son: náusea, irritabilidad, vómito, debilidad de extremidades inferiores, deshidratación, diplopia, indiferencia al medio y anorexia.

Recientemente Gutiérrez (59), reporta un estudio de 18 años, sin alteraciones en la piel, intoxicados accidentalmente por talco con hexaclorofeno al 0%; de los estudiados cuatro murieron, dos presentaron paraplegia y en los doce restantes se observó alteraciones vasculares en el cordón — espinal producidas por edema intermielínico masivo y, en algunos casos con secuelas permanentes y anormalidades oculares tales como midriasis, parálisis sexto par craneal y nistagmus.

Para detectar los efectos de toxicidad del compuesto, se han realizado estudios en animales de experimentación y a este respecto Kimbrough y — Gaines (34), observaron que al alimentar con 500 ppm de hexaclorofeno a ratas de la cepa Sherman, éstas desarrollaron debilidad y posteriormente parálisis del cuerpo, dentro de un período de 12 a 19 días y finalmente murie-

ron. Los cerebros de las ratas que ingirieron hexaclorofeno eran significativamente más duros comparados con los de los animales control; exámenes microscópicos de estos tejidos mostraron edema extenso y degeneración esponjosa de la materia blanca. Cuando a los animales se les retornó a su dieta normal, las alteraciones cerebrales desaparecieron completamente al final de la décima semana.

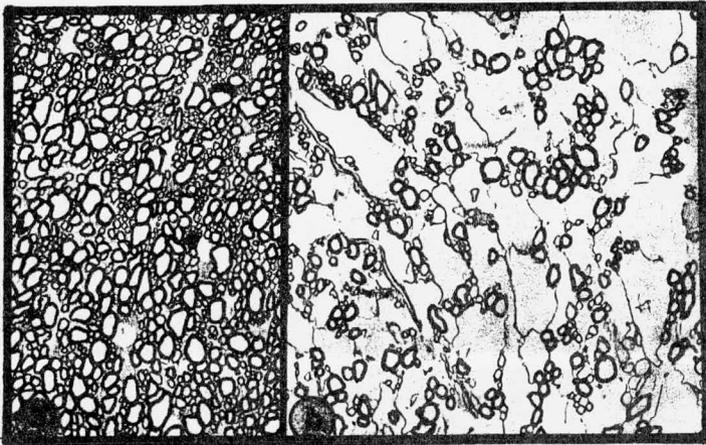
Adler y Montagna (1, 41), reportan estudios acerca de la toxicidad del hexaclorofeno en monos recién nacidos, a los que bañaron con solución de hexaclorofeno al 3% y en los que detectaron lesiones cerebrales que consistían en edema intermielínico y degeneración esponjosa de la materia blanca; por esto sugieren la restricción de este compuesto en el baño del recién nacido.

Además de estos reportes de daño cerebral causados por hexaclorofeno, se reportan una serie de alteraciones tales como: disminución de la respuesta pupilar en la oveja (55), observándose que el hexaclorofeno induce la vacuolación del nervio óptico; aumento significativo del peso húmedo del cerebro (33), disminución del crecimiento del animal (43) y elevación de la temperatura corporal en varias especies de animales (6). Los signos y síntomas de intoxicación por hexaclorofeno en animales fueron: debilidad de extremidades inferiores, los cerebros presentaron edema severo y degeneración esponjosa de la materia blanca, ver el esquema de la página 10.

La razón por la cual el hexaclorofeno produce una acumulación de fluido intracelular en tejido nervioso posiblemente esté relacionada a una inhibición de la formación de ATP, ya que este es requerido para el transporte de iones a través de la membrana celular.

El hexaclorofeno puede también afectar indirectamente tejido nervio-

Lámina que muestra la degeneración de la materia blanca del cordón cervical de ratón.



- a. Materia blanca normal del cordón cervical de un ratón normal, paraformiléndiamina, X 1000.
- b. Materia blanca edematosa del cordón cervical de un ratón, con 14 días de ingestión de hexaclorofeno. Nótese la separación de láminas de mielina. Paraformilén diamina X 1000.

so alterando la biosíntesis o transporte de nutrientes, sustratos, hormonas, etc., que se estén formando en otra parte del cuerpo y sean transportados a tejidos nerviosos.

El tóxico real puede también ser un metabolito del hexaclorofeno.

c) Absorción de hexaclorofeno a través de la piel y concentración en la sangre.

Debido a que el hexaclorofeno es empleado directamente sobre la superficie de la piel, al aplicarlo como agente germicida, fungicida, etc, algunos investigadores decidieron estudiar su toxicidad midiendo su concentración en sangre.

Así Kimbrough (33), realizó un estudio en 50 niños recién nacidos a quienes se les aplicó hexaclorofeno en su baño diario; al determinar los niveles del compuesto en sangre, encontró que todas las muestras lo contenían en mayor o menor concentración, indicando así que el compuesto se absorbe a quienes observaron que pequeñas concentraciones de hexaclorofeno radioactivo se absorbían a través de la piel intacta de la rata.

Curley y Hawk (13), reportan que las muestras de sangre de niños que recibieron baños con soluciones de hexaclorofeno al 3%, presentaban concentraciones del compuesto semejante a las encontradas en sangre de ratas, en las que se observaron lesiones cerebrales.

Asimismo, Taylor y col. (51), realizaron estudios de absorción del compuesto en la piel de cerdos, por encontrar semejanzas con la piel del organismo humano; al detectar la concentración del compuesto en sangre, observaron que existía una relación entre la concentración del compuesto y las lesiones cerebrales observadas en los animales. A este respecto, Alder y col. (1), encontraron que la concentración del fármaco en sangre de cerdos después de tratamientos iguales, lo que hace pensar que se absorbe en proporción a través de la piel de niños, o bien, que la disposición del fármaco sea diferente en niños y en cerdos.

Por otra parte se puede decir que el hexaclorofeno se absorbe a -

través de la piel y de superficies mucosas como la boca y vagina, por lo -  
que al aplicar el compuesto en jabones, desodorantes vaginales o pastas -  
dentales, se podría producir intoxicación sistémica o hipersensibilidad -  
al compuesto.

d) Estudio en membranas.

Flores y Buhler (19, 20), encontraron que el hexaclorofeno y bisfe-  
noles clorados relacionados con él, son potentes agentes líticos de eritro-  
citos en concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-5}$  M, y que algunas proteínas  
sanguíneas protegen al eritrocito de la acción lítica del compuesto.

Corner (11), supone que el plasma protege contra la lisis celular,  
y que esto probablemente se deba a la unión del hexaclorofeno con proteínas  
plasmáticas o lipoproteínas sanguíneas.

Ansel Cadwallader (2), reportan que algunos agentes antibacteria-  
nos, entre ellos bisfenoles, tienen acción lítica sobre las membranas de -  
plantas, bacterias y eritrocitos, y que dicha acción aumenta cuando a estos  
agentes se les adiciona átomos de Cloro.

La lisis de eritrocitos por compuestos bisfenólicos pudiera ocurrir  
por dos mecanismos básicos: El primero comprende la unión del compuesto -  
con las membranas del eritrocitos, cambiando la estructura celular, el traso  
porte iónico y por consiguiente la permeabilidad osmótica.

3.- Eliminación.

Se ha reportado (57), que una gran parte del hexaclorofeno marcado con Carbón-14, administrando por vía oral, se encuentra en las heces de ratas y conejos como glucurónido conjugado, conjuntamente con dos metaboli—  
tos ácidos que se producen en pequeñas cantidades y que se han identifica—  
do tentativamente como 2,4,5-triclorofenol y ácido 3,4,6-triclorosalicíli—  
co.

Pittman (45), al realizar estudios con hexaclorofeno marcado con —  
C-14, confirmó que dicho compuesto se elimina como glucurónido conjugando  
en heces de niños afectados por el empleo de hexaclorofeno; muchos de estos  
niños presentaban hiperbilirrubinemia.

Curly y Hawak (13), estudiaron la eliminación en ratas alimentadas —  
con 25 mg/kg del compuesto durante 55 días, encontrando una vida media de  
19 horas.

Smole y Poust (50), estudiaron la absorción y eliminación de hexaclo—  
rofenol en epidermis humana in vivo, empleando técnicas bioelectrométricas  
y ensayos espectrofotométricos; encontraron que el 55% del compuesto se eli—  
mina en seis horas, e infieren que el resto es de lenta eliminación; la vi—  
da media del compuesto encontrada por ellos fué aproximadamente de 4.5 ho—  
ras.

#### 4.- Efectos bioquímicos.

Se ha encontrado que el hexaclorofeno y bisfenoles relacionados se —  
unen fuertemente a proteínas y lipoproteínas (19). El compuesto se une a —  
las proteínas mediante enlaces de puente de hidrógeno y a los lípidos a —  
través de la interacción de enlaces hidrofóbicos. Además, se ha reportado  
que el hexaclorofeno forma complejos con metales pesados (24). Estas pro—

piedades sugieren que el hexaclorofeno puede afectar un gran número de sis temas biológicos.

Cadwell y col. (6), encontraron que el hexaclorofeno es un poderoso inhibidor de la fosforilación oxidativa y que su mayor efecto es en la mitocondria hepática. Commer y Moore (7), observaron que además de actuar en mitocondria de hígado, también altera la fosforilación oxidativa de mitocondria de cerebro. Buffa y col. (4), reportan que el hexaclorofeno se une fuertemente a las proteínas de mitocondria y encontraron una relación entre la alteración de la fosforilación y la elevación de la temperatura corporal. Los inhibidores de la fosforilación oxidativa normalmente producen aumento de la temperatura corporal, por ejemplo el pentaclorofenol (50). - Además, se ha encontrado que la actividad inhibidora de la fosforilación muestra incremento con la introducción de átomos de cloro a los anillos aromáticos de bisfenoles (43); dicho aumento en la inhibición de la fosforilación muestra incremento con la introducción de átomos de cloro a los anillos aromáticos de bisfenoles (43); dichos aumento en la inhibición de la fosforilación oxidativa parece presentar también relación con el aumento de la actividad antibacteriana, antifúngica y hemolítica de los bisfenoles clorados y la introducción de átomos de cloro a su molécula.

Gandolfi y col. (24), encontraron que al incubar microsomas de ratas con hexaclorofeno se observó una disminución de los niveles de citocromos P-450 y b<sub>5</sub>. Encontraron también que el UDP glucuronil hepático se inhibía por hexaclorofeno pero en menor extensión que otros sistemas enzimáticos - microsomales.

Thorsell (54), demostró un incremento de la ATP-asa y decrecimiento de la oxidasa succínica y colinesterasa cuando homogenizó Fasciola hepática y la incubó con hexaclorofeno. Wit y col. (57), observaron que el hexaclorofeno y los bisfenoles clorados también inhiben los sistemas succinasa

málica, citocromo-oxidasa y deshidrogenasa-láctica, en bacterias y mamíferos.

Todos estos reportes de alteraciones bioquímicas hacen pensar que existen mecanismos para explicar las respuestas toxicológicas del hexaclorofeno.

En resumen, de acuerdo a las observaciones planteadas, especialmente las que relacionan la toxicidad (hemólisis de eritrocitos, alteraciones de tejido nervioso, etc.) del hexaclorofeno con la fracción del fármaco libre, esto es, aquél que no se encuentra unido a fracciones protéicas corporales, han originado el presente proyecto en el que se plantea que las membranas de eritrocitos y de tejido nervioso poseen proteínas a las que se une el hexaclorofeno y que impiden que éste produzca lisis de eritrocitos y alteraciones de tejido nervioso; dichas alteraciones se manifiestan cuando la concentración de hexaclorofeno en el medio es tan alta que satura la interacción hexaclorofeno proteína, o bien cuando la concentración de la proteína en el medio es baja; de esta manera el hexaclorofeno libre en el medio produce los efectos toxicológicos ya reportados.

Se pretende entonces, al estudiar la interacción del hexaclorofeno con proteínas plasmáticas de membranas de eritrocitos y de tejido nervioso, aportar datos que ayuden a esclarecer esta interacción hexaclorofeno-proteína, determinando si esta proteína es común a todas las muestras estudiadas o si difiere para cada una de ellas.

### III. PARTE EXPERIMENTAL.

A.- Preparación de membrana de eritrocitos humano, conejo y rata, libres de hemoglobina. (16).

## MATERIAL.

### REACTIVOS.

Solución de fosfato de sodio, monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 0.156 M. (Merck)

Solución de fosfato de sodo, dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 0.103 M. (Merck)

Amortiguador hipotónico de fosfato 20 miOsm. pH 8.0

Amortiguador isotónico de fosfato 310 miOsm. pH 8.0

### APARATOS.

Potenciómetro Corning pH meter modelo 7.

Centrífuga Internacional.

Ultracentrífuga Mistral modelo 61.

### PROCEDIMIENTO:

La sangre extraída, por punción cardiaca en el caso del conejo y rata, y punción venosa en el caso de humano, se coloca en una jeringa conteniendo heparina. Posteriormente los eritrocitos se separan por centrifugación a  $1\ 000 \times g$  durante 20 minutos. El plasma y los glóbulos blancos se retiran por aspiración y el plasma obtenido se congela para realizar electroforesis posteriormente. Las células se lavan cinco veces y finalmente se suspenden en un volumen igual de amortiguador isotónico de fosfato, y esto constituye la suspensión de eritrocitos. Posteriormente se procede a la hemólisis de las células.

Hemólisis por choque hipotónico.

La hemólisis se realiza al tomar una alícuota de 2 ml de la suspensión de eritrocitos lavados en un tubo de centrifuga de 40 ml, el cual con

tiene 28 ml de amortiguador hipotónico de fosfato. El contenido se mezcla por agitación y las membranas se sedimentan por Ultracentrifugación a 20 000 x g durante 40 minutos.

El sobrenadante se aspira cuidadosamente y el sedimento de fantasmas se suspende en el amortiguador hipotónico, llevando al volumen original de 30 ml; se lavan tres veces más, se elimina el sobrenadante y se congela el sedimento de membranas colocando 1 ml de muestra en cada tubo de ensayo, para posteriormente descongelarlos a medida que se emplean.

B. Preparación de proteínas básicas de mielina de tejido nervioso central, (15).

#### MATERIAL.

Cloroformo-metanol 2:1 (V/V), (Sigma)

Acido clorhídrico 1 N, (Sigma)

Acetona, (Sigma)

#### APARATOS:

Homogenizador de pistola.

Potenciómetro Corning pH meter modelo 7

#### PROCEDIMIENTO.

Se homogenizan 200 g de tejido nervioso central con 19 volúmenes de cloroformo-metanol. La suspensión se agita durante toda la noche y finalmente se filtra por vacío a través de papel filtro Whatman No. 1, teniendo cuidado de que la pastilla no se seque por fuera. El residuo de tejido se resuspende dos veces en 10 volúmenes de cloroformo-metanol, y luego una vez más en 10 volúmenes de acetona; cada suspensión se agita durante 15 minutos

y se filtra como se describe anteriormente. El material sólido se suspende completa y uniformemente en cada etapa del procedimiento.

El residuo tratado con acetona finalmente se dispersa en 20 volúmenes de agua; la suspensión se agita durante toda la noche y el residuo del tejido nervioso se recupera por filtración a vacío, a través del papel filtro Whatman No. 54, y se suspende nuevamente en 2.5 volúmenes de agua.

Se ajusta la suspensión a pH 3.0 mediante la adición lenta y cuidadosa de HCl 1 N.

La suspensión acidificada se centrifuga durante 60 minutos a 12 000 X g, y el sobrenadante se decanta cuidadosamente, procediendo entonces a congelar la muestra en diferentes tubos de ensayo para descongelarlos cuando se emplean.

#### C. Separación de diferentes tipos de Sinaptosomas, (47).

#### MATERIAL.

#### REACTIVOS.

Solución de NaCl al 90%.

Amortiguador de fosfato 1.0 mM pH 6.7, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  1.0  $\mu\text{M}$ , sacarosa 0.3 M y 15 mg de "bentone" por cada 100 ml (Merck)

Solución de sacarosa 0.32 M. (Merck).

Solución de sacarosa 1.4.M (Merck)

Solución sacarosa 1.22 M. conteniendo  $\text{CaCl}_2$  1.7  $\mu\text{M}$  (Merck).

Solución sacarosa 0.95 M. conteniendo  $\text{CaCl}_2$  3.4  $\mu\text{M}$ .

Solución sacarosa 0.75 M. conteniendo  $\text{CaCl}_2$  3.4  $\mu\text{M}$  y 30 mg de "bentone " por cada 100 ml.

#### APARATOS.

Homogenizador de pistola Potter Elvejem.

Centrifuga Internacional, rotor de columpio.

Centrifuga Sorvall.

#### PROCEDIMIENTO.

Se obtienen los cerebros de ocho ratas de 20 días de edad y se elimina el tallo cerebral; se lavan en solución salina y el excedente de ésta - se elimina sacándolos con papel filtro; se pesan y se desmenuzan perfectamente en un volumen pequeño de solución amortiguadora de fosfato; se añade esta solución para completar ocho volúmenes con respecto al peso del tejido y se homogeniza, con tres o cuatro movimientos del pistón, en un homogenizador se lava añadiendo cuatro volúmenes de solución de fosfato, se ajusta y se mezcla con el resto del homogeneizado.

El homogeneizado se transfiere a tubos cónicos de 50 ml y se centrifuga a 2 000 X g durante 10 minutos en rotor de columpio, en la centrífuga Internacional. El sobrenadante se decanta parcialmente para retirar el resto con pipeta Pasteur. En casos necesarios, las partes más flojas de las - pastillas se colectan y junto con el sobrenadante se centrifuga nuevamente y se colectan en la misma forma.

El sobrenadante así obtenido se transfiere a tubos cónicos de 50 ml y se centrifuga a 12 500 x g durante 15 minutos en la centrífuga Sorvall; el sobrenadante se aspira por vacío al máximo evitando retirar parte de —

las pastillas; éstas se unen y se suspenden por medio de un homogenizador de luz amplia, primero con 12 ml de sacarosa 0.32 M y luego se añade más - sacarosa hasta obtener 50 ml de homogeneizado. El homogeneizado se reparte en tubos cónicos y se centrifuga a 13 000 x g durante 15 minutos; el sobre na dan te se aspira al máximo con vacío, evitando remover parte de las pasti llas.

El precipitado se suspende en sacarosa 0.32 M, en 15% del volumen - empleado para homogenizae los cerebros, que equivale aproximadamente a 3 - ml de sacarosa 0.32 M por cada 1.5 g. de cerebro. La suspensión se homoge- niza manualmente con dos movimientos del homogenizados y posteriormente se transfiere 1.3 ml del homogenizado a tubos de 30 ml.

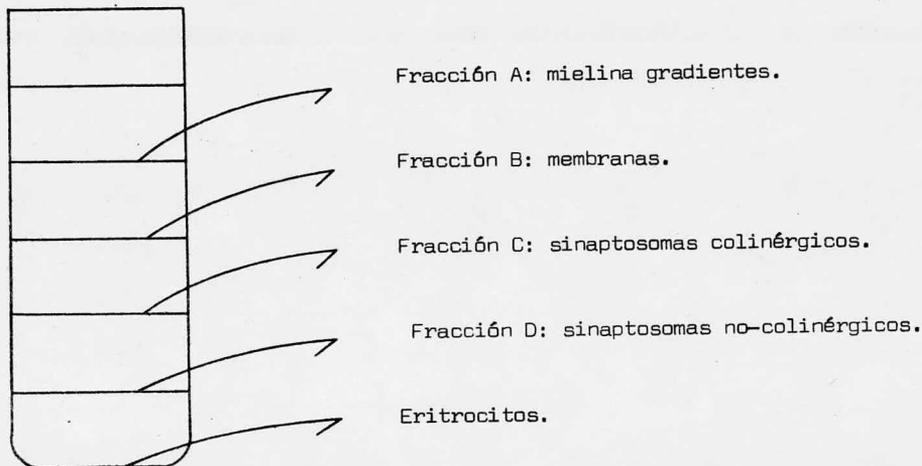
El homogenizado se coloca con cuidado en la parte superior de los - gradientes discontinuos de sacarosa recientemente preparados, de la siguien te manera:

- 1.- 6 ml de sacarosa 1.4M.
- 2.- 9 ml de sacarosa 1.22 M +  $\text{CaCl}_2$  1.7  $\mu\text{M}$ .
- 3.- 8 ml de sacarosa 0.95 M +  $\text{CaCl}_2$  3.4  $\mu\text{M}$ .
- 4.- 7 ml de sacarosa 0.75 M +  $\text{CaCl}_2$  3.4  $\mu\text{M}$ .

Las diferentes bandas que se obtienen se separan por succión al va- ci o, y las fracciones se diluyen en sacarosa 0.75 M, en la siguiente forma:

- Fracción A + 2.0 volúmenes de sacarosa 0.075 M.  
Fracción B + 2.0 volúmenes de sacarosa 0.075 M.  
Fracción C + 2.5 volúmenes de sacarosa 0.075 M.  
Fracción D + 2.5 volúmenes de sacarosa 0.075 M.

Esquemáticamente estas bandas se presentan así:



D. Medición de proteínas con el reactivo de Folín, (39)

MATERIAL.

REACTIVOS.

Reactivo A.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , al 2% en  $\text{BaOH}$  0.1 N, (Merck)

Reactivo B.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , (Merck)

Reactivo C. Solución Cúprico-alcalina, preparada mezclando 50 ml. del reactivo A con 1 ml de Reactivo B (se prepara el mismo día de su empleo)

Reactivo D. Reactivo de Folín (Sigma), diluido V/V con agua destilada.

Solución estándar de albúmina bovina (Merck), 1 mg/ml.

APARATOS.

Espectrofotómetro Beckman.

## PROCEDIMIENTO.

A una muestra de 0.1 ml de membranas de eritrocitos o de tejido nervioso, se le adiciona 1 ml de agua destilada, 5 ml de Reactivo C y se agita inmediatamente después de adicionado el reactivo de Folín; se deja reposar 10 minutos en la oscuridad y se lee a 625 nm en el espectrofotómetro.

La concentración de proteínas se calcula en base a una curva estándar con 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu$ g de albúmina bovina.

E. Electroforesis en gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato para separación de proteína, (58).

## MATERIAL.

### REACTIVOS.

Amortiguador para proteínas: fosfato de sodio 0.01 M, pH 7.0, dodecil sulfato de sodio (J.T. Baker Chemical Co.) al 1% y B-mercaptoetanol al 1% (Merck-Shuchardt).

Amortiguador para gel: fosfato de sodio dibásico con una molécula de 0.05 M, (Merck); sulfato de sodio dibásico heptahidratado 0.15 M, (merck) y dodecil sulfato de sodio 0.2%.

Solución de acrilamida (Merck-Shuchardt) al 10% para lo cual, 22.2 g de acrilamida y 0.6 g de metilénbisacrilamida se disuelve en agua y se llevan a 100 ml.

Solución de persulfato de amonio (Merck) al 1.5%.

N,N,N',N'-tetrametiléndiamina, grado químico (Merck).

Colorante de frente, con: 3 ml de azul de bromofenol (Merck) al 0.05%, 5 ml de glicerol, 5 ml de amortiguador de diálisis.

Amortiguador de diálisis: fosfato de sodio 0.01 M, dodecil sulfato de sodio 0.1% y B-mercaptoetanol al 0.1%.

Solución colorante para geles, con: 1.25 g de azul de Coomassie brillante (Merck), en una mezcla de 454 ml de metanol al 50% y 46 ml de ácido acético glacial.

Solución decolorante con: 75 ml de ácido acético, 50 ml de metanol y 875 ml de agua.

#### APARATOS.

Potenciómetro Corning pH meter modelo 7.

Aparato de electroforesis construido bajo pedido por el Departamento de Desarrollo de la Universidad de Oregon..

Fuente de Poder reguladora modelo NE 400-1

Agitador magnético.

#### PROCEDIMIENTO.

1.- Preparación de la solución de proteínas.

Las proteínas se incuban a 37°C por dos horas en fosfato de sodio 0.01 M, dodecil sulfato de sodio al 1%, B-mercaptoetanol al 1% y partes iguales de hexaclorofeno radioactivo  $1 \times 10^{-4}$  M. La concentración final de proteínas es de 1 mg/ml; después de la incubación las proteínas se diali-

zan aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente contra 500 ml del amortiguador de diálisis. Cuando se omite el diálisis, las proteínas se disuelven directamente en el amortiguador de diálisis con partes iguales de hexa clorofeno radioactivo  $1 \times 10^{-4}$ .

## 2.- Purificación de acrilamida y metilénbisacrilamida.

Cien g de acrilamida se disuelven en 50 ml de metanol y 150 ml de acetona en baño de agua a 55°C, se filtra a vacío en matraz Kitasato, a través de papel filtro Whatman No. 1, y se guarda en refrigeración para filtrarlo al día siguiente; los cristales obtenidos se colocan en desecados con  $\text{CaCl}_2$ , evitando su exposición a la luz. Por otro lado, se disuelven 10 g de metilénbisacrilamida en 300 ml de metanol y 90 ml de acetona y se sigue el mismo procedimiento de purificación que para acrilamida.

## 3.- Preparación de los geles.

Para preparar los doce geles, se elimina el aire a 15 ml de amortiguador para gel y se mezcla con 13.5 ml de solución de acrilamida. Posteriormente se adicionan 1.5 ml de persulfato de amonio recientemente preparado y 0.045 ml de **N,N,N,N**-tetametiléndiamina. Después de la mezcla se llena cada tubo, de 10 cm de largo, con dos ml de solución y antes de que solidifique el gel se desliza una pequeña gota de agua por la pared del tubo teniendo cuidado de mantener la interfase para evitar que el menisco se distorsione.

## 4.- Preparación de las muestras:

Con el amortiguador para gel, diluido V/V con agua, se llena perfectamente la pared superior e inferior de los tubos de vidrio que contienen los geles. Los dos compartimientos del aparato de electroforesis se llenan

con el amortiguador para gel diluido V/V con agua. A cada gel se le aplican 10  $\mu$ l de colorante de frente y una corriente de 1 ma/gel para que éste — penetre; posteriormente se aplican 100  $\mu$ l de las muestras como anteriormente se describió y una corriente constante de 8 ma/gel.

#### 5.- Tinción y decoloración.

Los geles se colocan en pequeños tubos con solución para teñirlos — durante 12 horas; después se decoloran con lavados sucesivos de agua destilada y finalmente se colocan en agitación, en tubos de plástico perforado, sumergidos en solución de decoloración.

F. Preparación de muestras para la determinación de Carbón-14 en líquido de centelleo.

#### MATERIAL.

##### REACTIVOS.

2,5-dinitrofenil - oxazol (PPO) (PFALTZ and BAUER. INC.)

Etilén glicol monoetil eter (Cellosolve) (Merck-Shuchardt).

Tolueno (Merck)

Acido perclórico al 60% (Merck)

Peróxido de hidrógeno al 30% (Merck)

Material radioactivo. Hexaclorofeno C-14 de Givaudan Corporation.

Clifton New Jersey.

#### PROCEDIMIENTO.

Los geles obtenidos de la electroforesis (p.22) se fraccionan respetando las bandas. Cada fracción se deposita dentro de un vial de conteo al que se le agrega un volumen de 0.1 ml de ácido perclórico y se mezcla con el gel; posteriormente se adiciona 0.2 ml de peróxido de hidrógeno y el conteo

nido se agita nuevamente.

Los viales se colocan en baño de agua a 70°C durante 60 minutos; — ocasionalmente los viales se agitan para acelerar el proceso de solubilización.

Las muestras con los viales se colocan a temperatura ambiente y la — preparación de las muestras se completa con la adición de una alícuota de 10 ml de solución que contiene 1.8 g de 2,5 dinitrofeniloxazol, 300 ml de tolueno y 150 ml de cellosolve.

Después de mezcladas las muestras se procede a determinar el contenido de radioactividad en un Espectrómetro Tri-Carb centelleo líquido.

#### IV RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Se realizaron experimentos preliminares en ratas con un rango de peso comprendido entre 0.270 a 0.320 Kg y se encontró que al administrar por vía parenteral 10, 15 y 20 mg/kg del hexaclorofeno, se produjo parálisis de las patas posteriores durante los primeros 20 minutos, en los animales a los que se les aplicó 10 y 15 mg/kg, y muerte del animal después de 70 minutos de administrado el compuesto, al que se le aplicó mayor dosis. Esto indica que el compuesto actúa sobre sistema nervioso, en concordancia con los datos ya reportados (31, 34, 37, 43, 46). Además se observó hemólisis de eritrocitos de rata, conejo y humano suspendidos en solución salina, al ser tratados con hexaclorofeno  $1 \times 10^{-4}$  M, en 100% de los casos, y hemólisis en el 2% de las muestras cuando se trató sangre total con hexaclorofeno de la concentración ya mencionada; dichos resultados estuvieron de acuerdo con lo encontrado por otros investigadores. (11, 19, 20).

En base a estas observaciones se procedió a trabajar con proteínas de tejido nervioso, plasma y eritrocitos como material de unión para hexaclorofeno C-14,  $1 \times 10^{-4}$  M. Para el estudio se seleccionó el método radioactivo dado que se pueden detectar cantidades pequeñas de esta unión. La concentración final de proteínas utilizadas fue de 1 mg/ml. La mezcla de proteína-hexaclorofeno se sometió a equilibrio de diálisis para eliminar el hexaclorofeno libre y a la fracción protéica con hexaclorofeno marcado se le sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida.

Inicialmente se trabajó con proteínas plasmáticas. En el Cuadro 1, se puede observar los resultados obtenidos al realizar electroforesis en gel de poliacrilamida, del hexaclorofeno C-14,  $1 \times 10^{-4}$  M, unido a proteínas plasmáticas de diverso origen, esto es, plasma de recién nacido (gel A) plasma de adulto (gel B), plasma de rata (gel C) y testigo (gel D). En ca-

da uno de los geles se observaron una variedad de bandas con diferentes porcentajes de radioactividad. En todos los geles se observó una banda conteniendo una cantidad mucho mayor de radioactividad en relación con las bandas restantes; se determinó la distancia de dicha banda al origen y se corrigió por la distancia al frente.

En todos los geles estudiados se corrieron 100  $\mu$ l de la suspensión de proteínas plasmáticas preparadas como se describe en la p.24, y el mismo volumen de agua destilada para el gel testigo, con 100  $\mu$ l de hexaclorofeno radioactivo. Las bandas obtenidas se revelaron con azul de Coomassie brillante.

Así, los resultados para cada uno de los geles fueron:

- Gel A: Se observó una banda de color azul más intenso y de mayor extensión conteniendo el 87% de radioactividad, a una distancia del origen de 0.8.
- Gel B: Se observó una banda de color azul más intenso y de mayor extensión con el 91% de radioactividad, a una distancia del origen de 0.82.
- Gel C: Se encontró una banda de mayor magnitud y coloración conteniendo el 81% de la radioactividad, a una distancia del origen de 0.8.
- Gel D: Se observó que el 98% de la radioactividad se encontraba en el frente del gel, a 11 cm del origen lo cual indica que no hay unión con proteínas.

En los geles A, B y C se advierte una banda protéica conteniendo una gran proporción de hexaclorofeno radioactivo (87%, 91% y 81%, respectivamente) y que se encuentra aproximadamente a la misma distancia del origen (0.8, 0.82 y 0.8 respectivamente). Estas observaciones hacen suponer que dicha fracción protéica sea común a todas las muestras de proteínas plas-



máticas. Y, por extrapolación con una banda de albúmina que capturó el 81% de radioactividad y corrió aproximadamente la misma distancia, se podría suponer que se trata de la misma proteína.

En el Cuadro No. 2 se pueden observar los resultados obtenidos al — realizar electroforesis en el gel de poliacrilamida, de hexaclorofeno C-14,  $10 \times 10^{-4}$  M, unido a proteínas de eritrocitos de diferentes especies, esto es, membranas de eritrocitos humanos (gel A), membranas de eritrocitos de conejo (gel B), membranas de eritrocitos de rata (gel C), membrana de eritrocitos de rata despues de diálisis (tec. p. 24), (gel D). Se utilizaron proteínas de membrana a una concentración final de 1 mg/ml.

Una vez mas, en cada uno de los geles se observó una variedad de bandas conteniendo una cantidad mayor de radioactividad en relación con las — bandas restantes. Se determinó la distancia de la banda de mayor porcentaje de radioactividad al origen, corregida por la distancia al frente.

En todos los geles estudiados se corrieron 100  $\mu$ l de la suspensión de proteínas membranales a la concentración ya mencionada, con hexaclorofeno radioactivo. Al revelar las bandas obtenidas con azul de Coomassie brillante se obtuvieron los resultados siguientes:

Gel A: Se observó una banda de color azul más intenso y de mayor exten— sión que contenía el 76.8% de radioactividad, a una distancia del origen de 0.80.

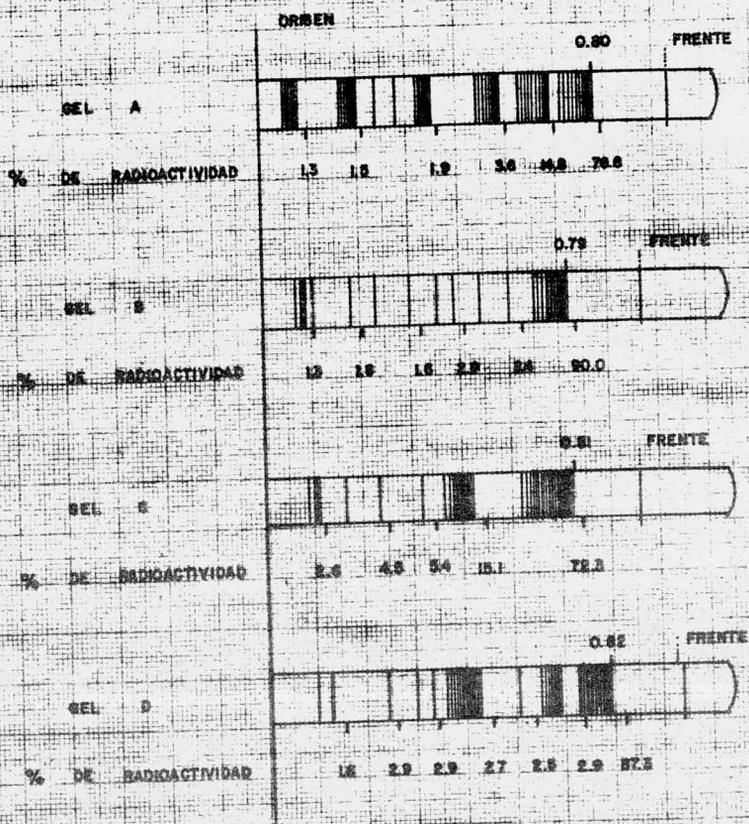
Gel B: Se observó una banda de color azul más intenso y de mayor exten— sión que contenía el 90% de radioactividad, a una distancia del — origen de 0.79.

Gel C: Se observó una banda de color azul más intenso y de mayor extensión con el 72.3% de radioactividad, a una distancia del origen de 0.81.

Gel D: Se observó una banda de mayor extensión de color azul más intenso con el 87.3% de radioactividad, a una distancia del origen de 0.82.

Así, en todos los geles A, B, C y D se advierte una banda protéica - conteniendo una gran proporción del hexaclorofeno radioactivo (76.8%, 90%, 72.3% y 87%, respectivamente) y que se encuentra aproximadamente a la misma distancia del origen (0.80, 0.79, 0.81 y 0.82). Estas observaciones - nuevamente hacen suponer que dicha fracción protéica sea común a las cuatro muestras de protéica.

Se advierte que en los geles C y D, con las muestras de membranas de eritrocitos antes y después de la diálisis respectivamente, presentan poca diferencia, por lo que piensa que en las condiciones de estudio la electroforesis no afecta la interacción proteína-hexaclorofeno, y ésta es una unión relativamente fuerte.



CUADRO No. 2: DISTRIBUCION DEL HEXACLOROFENO C-14 UNIDO A LAS FRACCIONES DE PROTEINAS ERITROCITICAS DE DIVERSO ORIGEN, DESPUES DE REALIZAR UNA ELECTROFORESIS DE DICHAS MUESTRAS SEPARADAS POR DIALISIS.  
 GEL A: PROTEINAS DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS HUMANOS  
 GEL B: PROTEINAS DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS DE CONEJO  
 GEL C: PROTEINAS DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS DE RATA  
 GEL D: PROTEINAS DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS DE RATA.  
 DESPUES DE DIALISIS.

En el Cuadro No. 3, observamos los resultados obtenidos al realizar electroforesis en gel de poliacrilamida, del hexaclorofeno C-14,  $1 \times 10^{-4}$  M, unido a proteínas de tejido nervioso, distribuidas en esta tabla de la siguiente manera: mielina soluble, técnica p. 17 (gel A), mielina gradientes obtenida por la técnica de gradientes p. 18, (gel B), membranas de células nerviosas, técnica p. 21 (gel C); sinaptosomas colinérgicos técnicas p.21 (Gel D), sinaptosomas no-colinérgicos, técnica p. 21, (Gel E). Las proteínas se llevaron a una concentración final de 1 mg/ml.

Nuevamente en cada uno de los geles se observó una variedad de bandas con diferentes porcentajes de radioactividad. En todos los geles se observó una banda conteniendo una cantidad mucho mayor de radioactividad en relación con las bandas restantes. Se determinó la distancia de dicha banda al origen, corregida por la distancia al frente.

En todos los geles estudiados se corrieron 100  $\mu$ l de proteínas de tejido nervioso a la concentración ya mencionada, con hexaclorofeno radioactivo como se describe en la p. 24 al revelar las bandas obtenidas con azul de Coomassie brillante. Se obtuvieron los resultados siguientes:

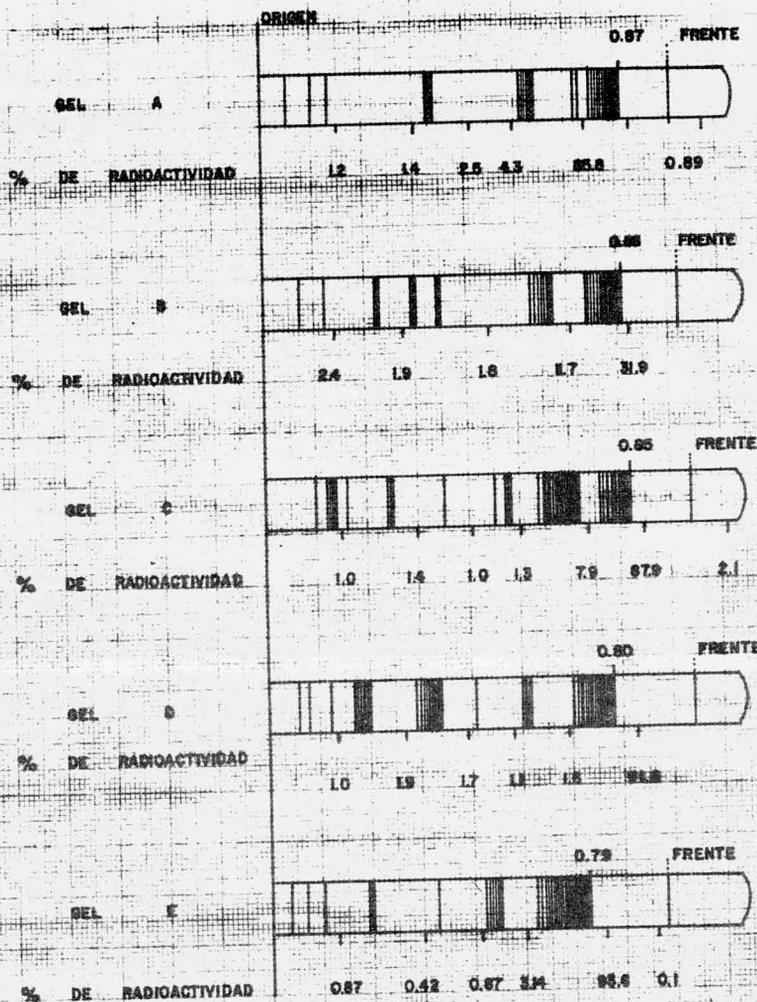
- Gel A: Se observó una banda de color azul más intenso y de mayor extensión conteniendo 85.5% de radioactividad, a una distancia del origen de 0.87.
- Gel B: Se observó una banda de color más intenso y de mayor extensión, con el 84.8% de radioactividad, a una distancia del origen de 0.86.
- Gel C: Se encontró una banda de mayor magnitud y coloración conteniendo 84.9% de radioactividad, a una distancia del origen de 0.85.

Gel D: Se observó una banda de color azul más intenso y de mayor extensión, con el 91.8% de radioactividad, a una distancia de 0.80.

Gel E: Se observó una banda de mayor magnitud y coloración, con el 93.6% de radioactividad, a una distancia de 0.79.

En resumen, en los geles A, B y C se advierte una banda protéica — conteniendo una gran proporción de hexaclorofeno radioactivo (85.8%, 81.9% y 84.9%, respectivamente) y que se encuentra a la misma distancia del origen aproximadamente (0.87, 0.86 y 0.85, respectivamente). Estas observaciones hacen suponer que dicha fracción protéica sea común a las tres primeras muestras estudiadas. Para los geles D y E se advierte una banda protéica conteniendo mayor proporción de hexaclorofeno radioactivo (91.8% y 93.6% respectivamente) con relación a los geles anteriores, a una distancia de 0.80 y 0.79.

Dado que el porcentaje de unión de hexaclorofeno-proteína es mayor — para las fracciones de sinaptosomas, en relación a las de las fracciones restantes, se podría suponer que la banda de mayor radioactividad es una fracción común para los geles D y E y quizá diferente a la de los geles A, B y C.



CUADRO No. 3: DISTRIBUCIÓN DEL HEXACLOROPENO C-14 UNIDO A LAS FRACCIONES DE PROTEÍNAS DE TEJIDO NERVIOSO DE RANA, DESPUÉS DE REALIZAR ELECTROFÓRESIS DE DICHAS MUESTRAS SEPARADAS POR DIALISIS.

GEL A: PROTEÍNAS DE MIELINA (SOLUBLE)

GEL B: PROTEÍNAS DE MIELINA (GRADIENTES)

GEL C: PROTEÍNAS DE SINAPTOSOMAS COLINÉRGICOS

GEL D: PROTEÍNAS DE MEMBRANAS DE TEJIDO NERVIOSO

GEL E: PROTEÍNAS DE SINAPTOSOMAS NO-COLINÉRGICOS

Con los resultados obtenidos de la electroforesis del hexaclorofeno C-14, unido a proteínas plasmáticas, proteínas de membranas de eritrocitos y de tejido nervioso, como se vé en los Cuadros 1, 2 y 3 respectivamente, se procedió a determinar el peso molecular aproximado de las bandas de mayor porcentaje de radioactividad mediante el método de Weber y Osborn (58). Dicho método utiliza la movilidad electroforética de proteínas de peso molecular conocido, utilizando dichos valores (en una gráfica de peso molecular vs movilidad en escala log-log) como referencia para calcular el peso molecular de la fracción problema, en base a la movilidad electroforética observada.

La movilidad electroforética se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Movilidad} = \frac{\text{distancia de migración de la proteína}}{\text{longitud después de la decoloración}} \times$$

$$\frac{\text{Longitud antes de la decoloración}}{\text{DISTANCIA DE MIGRACION DEL COLORANTE.}}$$

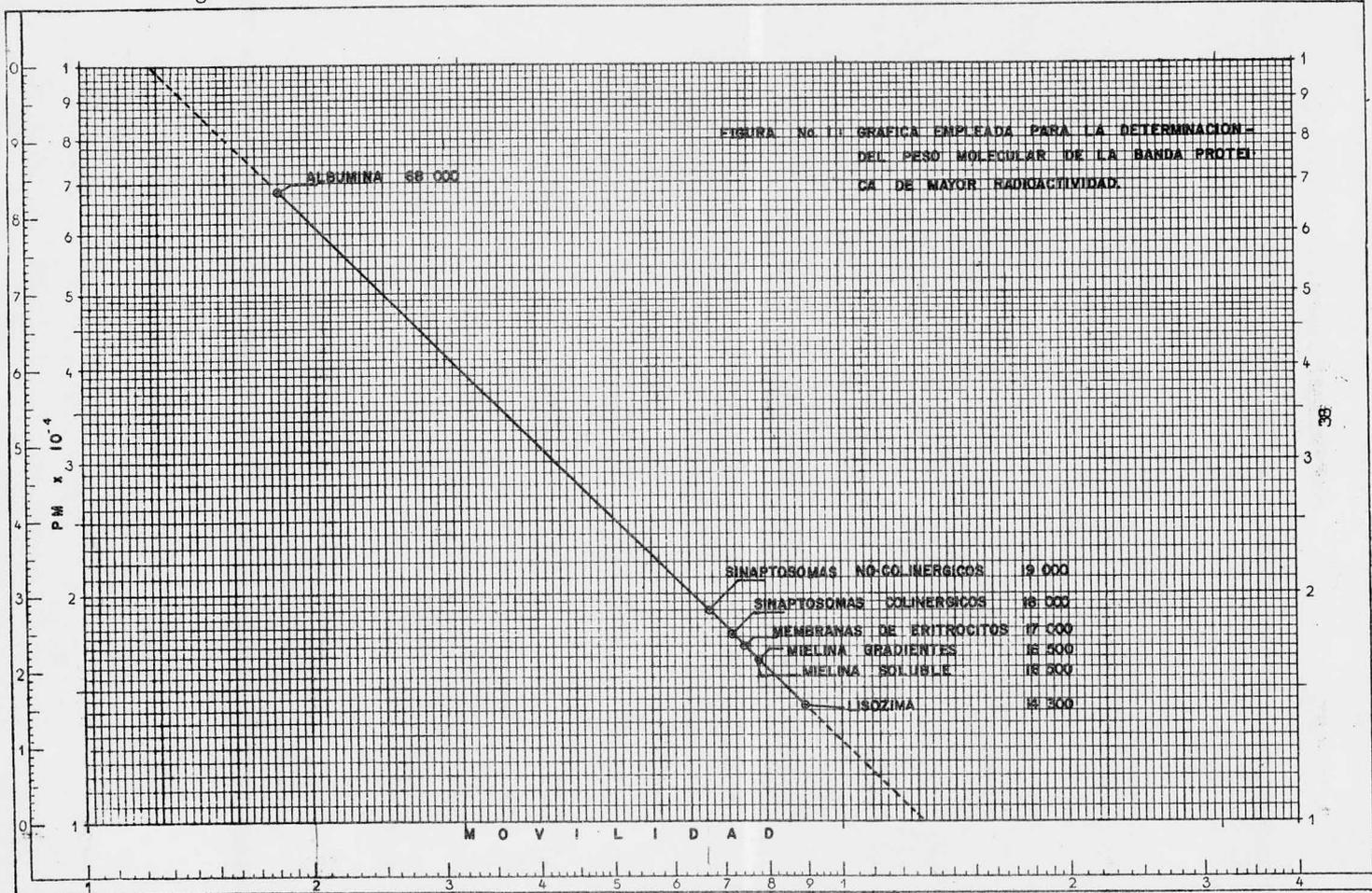
Los cálculos de movilidad incluyen la longitud del gel antes y después de la decoloración, así como también la movilidad de la proteína y del colorante de frente.

Para determinar el peso molecular de la fracción protéica de mayor porcentaje de radioactividad, se utilizó como referencia dos proteínas (lizozima y albúmina) con peso molecular conocido de 14 300 y 68 000, respectivamente. Al graficar el logaritmo del peso molecular contra el logaritmo de la movilidad obtenida experimentalmente, en las condiciones ya mencionadas, se obtuvieron los resultados mostrados en la Fig No. 1. Por extrapola- ción de la movilidad promedio de las fracciones protéicas estudiadas, se -

encontró que el P.M. de las bandas conteniendo el mayor porcentaje de radioactividad quedaba dentro de los rangos de 16 500 a 19 000.

Los P.M. obtenidos para las fracciones de mayor porcentaje de radioactividad se muestra en la Tabla 1.

DINA 4  
NA-8122  
100 x 100  
Modul'60



FRACCION PROTEICA	MOVILIDAD	P.M. CALCULO CON APROXIMACION
MEMBRANA DE ERITROCITOS	0. 7588	17, 000
MIELINA GRADIENTES	0. 7816	16, 500
MIELINA SOLUBLE	0. 7905	16, 500
SINAPTOSOMAS COLINERGICOS	0. 7275	18, 000
SINAPTOSOMAS NO-COLINERGICOS	0. 6725	19, 000

TABLA 1: CALCULO DEL PESO MOLECULAR DE LAS BANDAS PROTEICAS DE MAYOR CONTENIDO DE HEXACLOROFENO RADIOACTIVO.

Con el objeto de obtener más datos acerca de la interacción fármaco — proteína, se procedió a realizar otros estudios con las muestras de tejido nervioso. Así, además de realizar electroforesis de las muestras de tejido nervioso, se efectuaron otros experimentos en los que 250, 500, 750 y 100 —  $\mu\text{g}$  de proteína de mielina gradientes, mielina soluble, membranas, sinaptosomas colinérgicos y sinaptosomas no-colinérgicos, en contacto con 1 ml de hexaclorofeno C-14,  $1 \times 10^{-4}$  M, fueron sometidos a equilibrio de diálisis — para eliminar el hexaclorofeno libre. Se procedió a contar la radioactividad del complejo proteína-hexaclorofeno para determinar la variación de la interacción a diferentes cantidades de proteínas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II. Al construir la gráfica con dichos datos, cuentas por minutos versus cantidades de proteínas, como se muestra en la Fig. 2, se obtuvo un juego de líneas rectas indicando que la unión hexaclorofeno-proteína es proporcional a la cantidad de proteínas utilizadas. Se observa una unión hexaclorofeno-proteína relativamente estable en las condiciones de diálisis utilizadas.

PROTEINAS	CANTIDAD DE PROTEINAS ( $\mu$ g)			
	250	500	750	1 000
MIELINA SOLUBLE	653	813	920	1 108
MIELINA GRADIENTES	840	961	—	1 194
MEMBRANAS	756	967	—	1 172
SINAPTOSOMAS COLINERGICOS	987	1 804	2 107	2 899
SINAPTOSOMAS NO-COLINERGICOS	891	1 206	—	2 276

TABLA II: RADIOACTIVIDAD EN MUESTRAS DE PROTEINAS DE TEJIDO NERVIOSO-HEXAFLOROFENO C-14, DESPUES DE LA DIALISIS. (CUENTAS POR MINUTO)

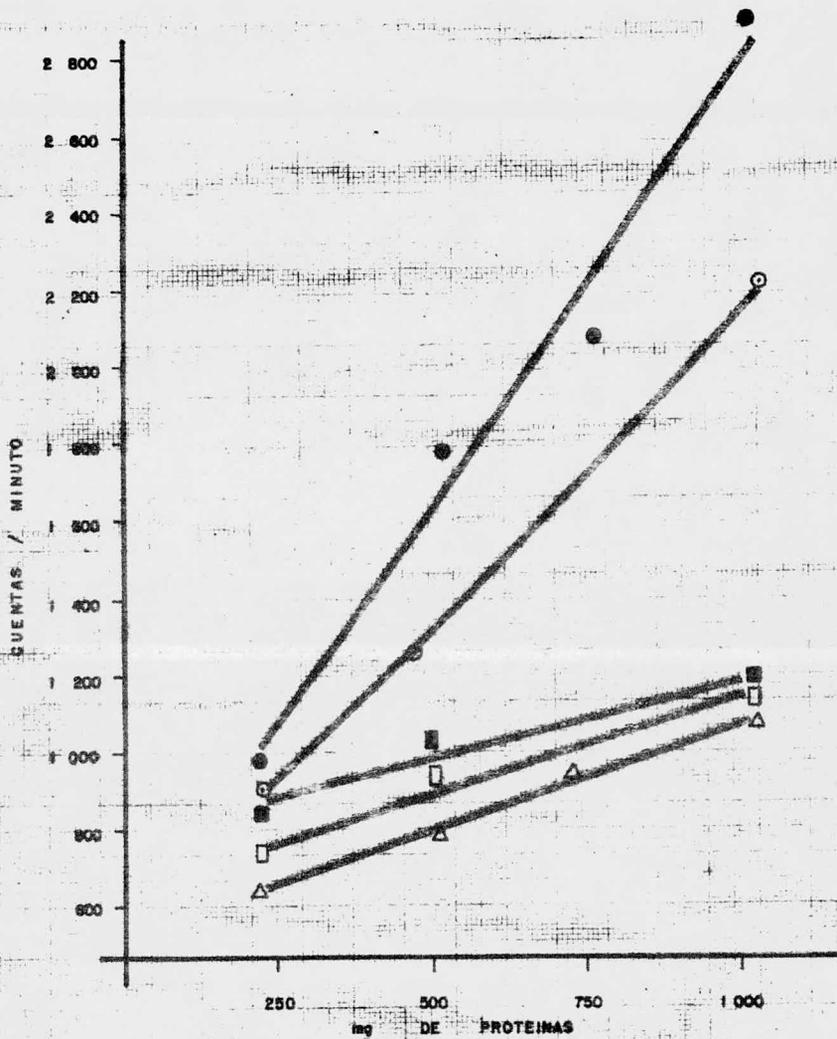


FIGURA No. 2 : GRAFICA DE RADIOACTIVIDAD (CUENTAS/MINUTO) CONTRA CANTIDAD DE PROTEINAS (mg), DESPUES DE UNA DIALISIS DE DIFERENTES MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO EN CONTACTO CON UN ml DE HEXACLOROFENO - C-14,  $1 \times 10^{-4}$  M. MIELINA SOLUBLE  $\triangle-\triangle$ , MIELINA GRADIENTES  $\square-\square$ , MEMBRANAS  $\blacksquare-\blacksquare$ , SINAPTOSOMAS COLINERGICOS  $\bullet-\bullet$ , SINAPTOSOMAS NO-COLINERGICOS  $\circ-\circ$ .

Posteriormente, se transformaron los resultados de cuentas por minuto a n moles de hexaclorofeno por mg de proteína, con el objeto de tener datos más concretos de esta unión, dado que las unidades de cuentas/minuto no indican directamente cuanto hexaclorofeno se unió a la proteína. Para efectuar esta transformación se tomó en cuenta que 1 ml de hexaclorofeno  $1 \times 10^{-4}$  M da cuentas por minuto.

Los datos obtenidos se muestran en la Tabla III.

Al construir la gráfica con dichos datos, como se muestra en la Fig. No. 3, se obtuvieron líneas rectas como era de esperarse. Los datos experimentales se ajustaron a la mejor línea recta, de ecuación  $y=mx+b$ , mediante el método de mínimos cuadrados y se encontraron los siguientes parámetros - para cada juegos de observaciones: pendiente (m), coeficiente de determinación ( $r^2$ ), intercepto (b). Tales datos se muestran en la Tabla IV.

Se puede observar que las pendientes de las rectas correspondientes a la interacción hexaclorofeno con mielina soluble, mielina gradientes y membranas (0.049, 0.039 y 0.045, respectivamente) son muy similares y de 3 a 5 veces menores que las pendientes encontradas para la interacción con los sinaptosomas colinérgicos y no-colinérgicos, que en sí pueden constituir otro grupo (0.202 y 0.157, respectivamente).

Las diferencias en dichas pendientes reflejan diferentes proporciones de unión del hexaclorofeno con las fracciones protéicas en estudio, lo cual podría indicar un número de sitios receptores mayor en las fracciones de mielina y membranas.

Esta observación se refuerza por los datos que se tienen del porcien-

PROTEINAS	CANTIDAD DE PROTEINAS ( $\mu\text{g}$ )			
	250	500	750	1 000
MIELINA SOLUBLE	5.44	6.78	7.66	9.23
MIELINA GRADIENTES	7.0	8.0	—	9.95
MEMBRANAS	6.3	8.06	—	9.78
SINAPTOSOMAS COLINERGICOS	7.32	15.02	17.56	23.33
SINAPTOSOMAS NO-COLINERGICOS	7.42	10.02	—	18.96

TABLA III : HEXACLOROFENO UNIDO POR mg DE PROTEINA DESPUES DE LA DIALISIS DE DIVERSAS MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO EN CONTACTO CON 1 ml DE HEXACLOROFENO C-14,  $1 \times 10^{-6}$  M. (EN NANOMOLES)

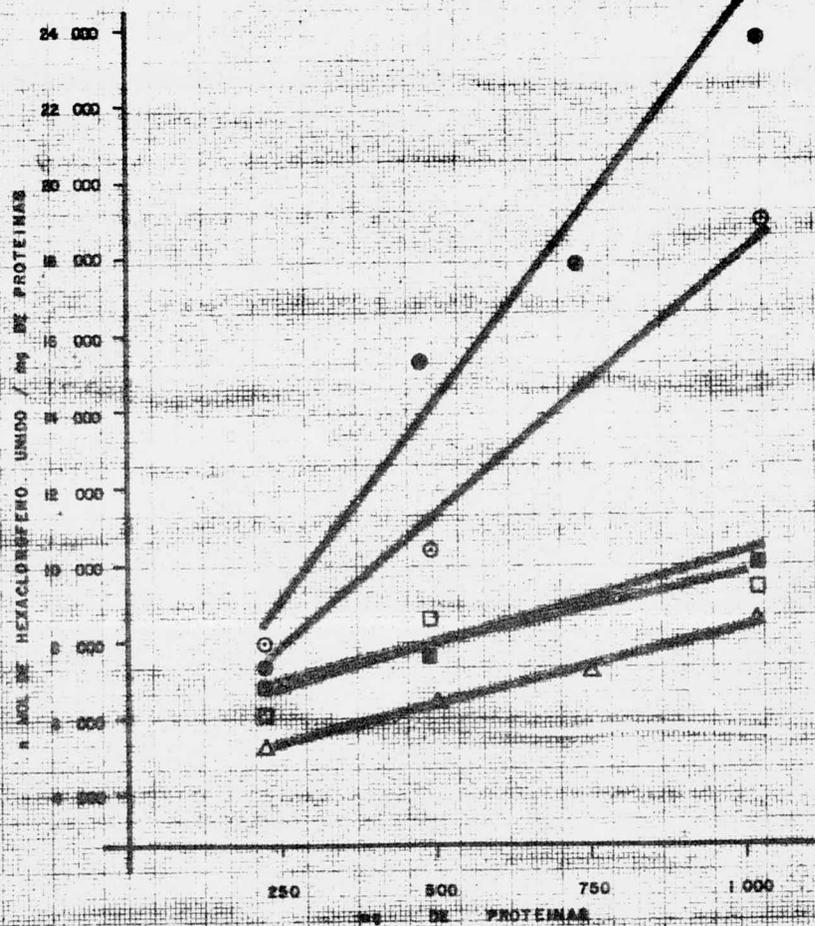


FIGURA No. 3 GRAFICA DE μ MOLES DE HEXACLOROFENO UNIDO POR mg DE PROTEINAS CONTRA mg DE PROTEINA, DESPUES DE UNA DIALISIS DE DIFERENTES MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO EN CONTACTO CON UN ml. DE HEXACLOROFENO C-14, 1x10<sup>-6</sup> M. MIELINA SOLUBLE △-△, MIELINA GRADIENTES ■-■, MEMBRANAS □-□, SINAPTOSOMAS COLINERGICOS ●-●, SINAPTOSOMAS NO-COLINERGICOS ○-○.

PROTEINAS	PARAMETROS		
	m	b	r <sup>2</sup>
MIELINA SOLUBLE	0.049	4.215	0.9895
MIELINA GRADIENTES	0.039	6.025	0.9999
MEMBRANAS	0.045	5.440	0.9618
SINAPTOSOMAS COLINERGICOS	0.202	3.165	0.9664
SINAPTOSOMAS NO COLINERGICOS	0.157	2.965	0.9870

**TABLA IV :** PARAMETROS DE LA ECUACION DE LINEA RECTA  $y=mx+b$ , OBTENIDOS AL AJUSTAR LOS DATOS DE HEXACLOROFENO - UNIDO POR mg DE PROTEINA CONTRA mcg DE PROTEINAS, POR EL METODO DE MINIMOS CUADRADOS.

to de unión en electroforesis del tejido nervioso (p.37), en donde se encuentra que para el caso de mielina soluble, mielina gradientes y membranas, el porcentaje unido (84.9%, 82% y 81.9%, respectivamente), es menor que el porcentaje de unión para el caso de sinaptosoma colinérgicos y no-colinérgico (91.8% y 93.6%, respectivamente); la distancia recorrida por la proteína, corregida por la distancia al frente, en esta misma electroforesis, mielina gradientes y membranas (0.87, 0.88 y 0.88, respectivamente), y para sinaptosomas colinérgicos y no-colinérgicos la distancia recorrida fué ligeramente menor (0.82 y 0.83, respectivamente) aunque aproximadamente la misma. Por estos datos podemos proponer que para el caso de tejido nervioso — podrían ser dos proteínas diferentes las que se unen al hexaclorofeno, siendo la de sinaptosomas la de mayor afinidad. Esto podría relacionarse a la causa del daño toxicológico en este tejido, al quedar hexaclorofeno libre — en el organismo.

## V. DISCUSION DE RESULTADOS.

El hexaclorofeno es un compuesto ampliamente usado como agente antibacteriano, del que recientemente se han reportado efectos de toxicidad, (1, 12, 14, 20, 26, 32, 37, etc.); aunque esta acción tóxica ha sido extensamente estudiada aún a la fecha se sabe poco acerca de los efectos en los humanos.

Si bien el hexaclorofeno y otros bisfenoles clorados no son hemolíticos in vivo, aún cuando se administren a la dosis letal, la incubación de estos compuestos con eritrocitos nucleados y no nucleados in vitro produce hemólisis. Se ha postulado que el plasma total o soluciones de suero humano y bovino, albúmina, hemoglobina, otras proteínas y lipoproteínas, protegen al eritrocito contra hemólisis inducida por bisfenoles clorados, (11, 19).

En base a estos datos se planteó la siguiente Hipótesis: Las membranas de eritrocitos y de tejido nervioso poseen proteínas que se unen al hexaclorofeno, que impiden que este produzca lisis de eritrocitos y alteraciones de tejido nervioso; dichas alteraciones se manifiestan cuando la concentración de hexaclorofeno es alta o bien cuando la concentración de proteínas en el medio es baja de esta manera el hexaclorofeno libre en el medio produce los efectos toxicológicos ya reportados.

La hipótesis de trabajo planteada se estudió determinando la unión hexaclorofeno-proteína por medio de incubación de eritrocitos y plasma de diferentes especies de animales de laboratorio y sinaptosomas, membranas y mielina de tejido nervioso de rata con hexaclorofeno C-14,  $1 \times 10^{-4}$  M. Se dializaron las muestras para eliminar el hexaclorofeno libre y finalmente se realizó electroforesis de la interacción hexaclorofeno-proteína en gel de poliacrilamida, con el objeto de determinar una cantidad protéica común

a todas las muestras estudiadas y que capturara la mayor cantidad de hexacloro  
rofeno.

Se encontró que en todas las muestras estudiadas aparecía una frac—  
ción proteíca con una cantidad elevada y muy similar de radioactividad (81  
a 91%) y a una distancia del origen (corregida por la distancia al frente,  
en cm) aproximadamente igual (0.80 a 0.88); sin embargo, se puede suponer —  
que para el caso de sinaptosomas de tejido nervioso la proteína tiene mayor  
afinidad por el compuesto, ya que la cantidad unida es de 2 a 3 veces mayor  
y la migración de la proteína en el campo electroforetico es ligeramente me  
nor. En base a tales observaciones se podría suponer que las fracciones pro—  
téicas que capturan la mayor cantidad del compuesto son de proteínas dife—  
rentes, una para membranas de eritrocitos y de tejido nervioso y otra para  
sinaptosomas; en cuanto a las proteínas plasmáticas, se propone que la pro—  
teína que captura la mayor cantidad de hexaclorofeno es albúmina, ya que al  
correr una control de albúmina con hexaclorofeno marcado se encontró un por—  
centaje de unión de 81.0%, muy similar al encontrado para la banda de mayor  
porcentaje de radioactividad de proteínas plasmáticas.

Se estudió la interacción fármaco-proteína sometiendo a diálisis mues—  
tras de proteínas de tejido nervioso en contacto con hexaclorofeno radiooa—  
tivo. Comparando los resultados obtenidos de éstos estudios con los obteni—  
dos al aplicar electroforesis, se observó esencialmente lo mismo, concluyen—  
do entonces que la interacción hexaclorofeno proteína es estable, por lo —  
menos en las condiciones de los experimentos. Se encontró una relación de —  
proporcionalidad directa entre n moles de hexaclorofeno unido por mg de pro—  
teína con la cantidad de proteína estudiada, en el rango de 250, 500, 750 y  
1000  $\mu$ g de proteína para muestras de mielina soluble, mielina gradientes,  
membranas, sinaptosomas colinérgicos y sinaptosomas no-colinérgicos. Los —

datos experimentales se ajustaron a la mejor línea recta por el método de mínimos cuadrados, obteniéndose coeficientes de determinación,  $r^2$ , altamente satisfactorios (de 0.9618 a 0.9999). Al analizar las pendientes obtenidas para tales rectas fué posible discernir dos tendencias, (Tabla IV), una de las cuales incluía a las pendientes obtenidas para la interacción hexaclorofeno con proteínas de sinaptosomas colinérgicos y no-colinérgicos, que resultan de tres a cinco veces mayores que las pendientes del otro grupo, - que incluyó a la interacción hexaclorofeno con proteínas de mielina soluble, mielina gradientes y membranas. Esto "parece indicar un número mayor de sitios receptores en las proteínas provenientes de sinaptosomas que el número de sitios receptores en las proteínas provenientes de mielina y membrana". Considerando estos resultados, nuevamente se podría proponer que se tratan de proteínas diferentes que se unen al hexaclorofeno con diferente afinidad, una para membranas de eritrocitos y de tejido nervioso ya que podemos decir que tienen aproximadamente el mismo peso molecular (Tabla IV), y otra para sinaptosomas que tienen un peso molecular diferente de los anteriores y que además presentan mucho mayor capacidad de unión al hexaclorofeno, en las condiciones estudiadas. "Considerando esta observación y el hecho de que algunas propiedades del hexaclorofeno se refieren al tejido nervioso, quizá pudiera existir alguna relación entre dicha interacción fármaco proteína de sinaptosomas y los efectos tóxicos ya mencionados".

## VI. CONCLUSIONES.

La hipótesis inicialmente planteada, podría ser modificada parcialmente proponiendo que quizá la interacción hexaclorofeno-proteína plasmática, de membranas de eritrocitos y de tejido nervioso secuestran al fármaco protegiendo el organismo de sus manifestaciones tóxicas, mientras que la interacción hexaclorofeno-proteína de sinaptosomas (proteína de mayor peso molecular y mayor afinidad aparente) pudiera quizá ser correlacionada a la toxi

cidad del fármaco en tejido nervioso.

Existen muchas preguntas aún por resolver, entre ellas cuál es la concentración del fármaco que satura la interacción hexaclorofeno-proteína; esto podría elucidarse variando la concentración de hexaclorofeno en contacto con una cantidad fija de proteína, para así poder determinar la Velocidad Máxima ( $V_{m\acute{a}s}$ ) y la constante de Michaelis ( $K_m$ ) de dicha interacción; de esta manera se obtendrían medidas de la afinidad y capacidad de unión con el hexaclorofeno. Con estos datos, extrapolados a la concentración de proteínas en el cuerpo humano, se podría determinar la concentración del compuesto que produce manifestaciones tóxicas.

Además, merecería estudios posteriores la interacción hexaclorofeno proteína de sinaptosomas y su relación con la toxicidad en tejido nervioso.

VI. APENDICE.

Datos del espectrómetro Tri-Carb centelleo líquido.

71	100	142	145	
72	100	75	76	
73	100	169	150	} Albúmina
74	100	229	229	
75	100	538	541	
76	100	11001	11034	
77	100	172	171	
78	100	199	200	
79	100	249	249	} Membrana humana después de diálisis
80	100	5066	5086	
81	100	12548	12639	
82	100	593	595	
83	100	132	132	
84	100	119	120	
85	100	201	201	} Membrana de conejo después de diálisis
86	100	16157	16224	
87	100	3356	3373	
88	100	200	200	
89	100	222	222	
90	100	156	153	
91	100	341	340	} Membrana de rata después de diálisis
92	100	2902	2827	
93	100	17151	17214	
94	100	154	155	

194	1000	3049	}	<b>Albumina</b>
195	1000	1727		
196	1000	2999		
197	1000	5428		
199	1000	39288	}	<b>Membrana humana sin dializar</b>
199	1000	1081		
200	1000	1307		
201	1000	4524		
202	1000	3013	}	<b>Membrana de conejo sin dializar</b>
203	1000	12408		
204	1000	64367		
205	1000	1480		
206	1000	3777	}	<b>Membrana humana dializada</b>
207	1000	3145		
208	1000	50094		
209	1000	34801		
210	1000	2292	}	<b>Membrana de rata sin dializar</b>
211	1000	3908		
212	1000	4795		
213	1000	13797		
214	1000	62976	}	<b>Membrana humana dializada</b>
215	1000	997		
216	1000	1004		
217	1000	1236		
218	1000	1817	}	<b>Membrana humana dializada</b>
219	1000	1529		
220	1000	2181		
221	1000	3773		

222	1000	1094	
223	1000	1418	
224	1000	1243	
225	1000	2535	Membrana de conejo dializada
226	1000	1983	
227	1000	21552	
228	1000	1194	
229	1000	2114	
230	1000	2022	
231	1000	1865	Membrana de rata dializada
232	1000	2159	
233	1000	64347	
234	1000	2235	
235	1000	2445	
236	1000	1334	
237	1000	2209	
238	1000	79230	Plasma humano
239	1000	7166	
240	1000	7599	
241	1000	13820	
4	1000	8390	8400
5	1000	9595	9616
6	1000	11910	11940
7	1000	7545	7556
8	1000	9653	9657
9	1000	11599	11686

26/1/72

Fración A Mielina

Fración B Membranas

C2053

196	1000		19039	} Fracción C Sinaptosomas Colinérgicos
197	1000		21076	
198	1000		28996	
199	1000		125893	} Control
200	1		126	
191	1000		6529	} Mielina Soluble
192	1000		8131	
193	1000		9196	
194	1000		11073	
195	1000		3733	
146	100	7510	12203	} Fracción D Sinaptosomas no - Colinérgicos
147	100	933	891	
148	100	1201	1206	
149	100	2270	2276	
16	1000	430	434	} Gel de Mielina
17	1000	443	443	
18	1000	432	437	
19	1000	443	450	
20	1000	502	511	
21	1000	335	339	
22	1000	20923	20972	
23	1000	120060	120230	} Control
24	1000	116065	117131	
25	1000	122572	122714	

## VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Adler, V.G, Burman, D., Corner, B.D., Gillespie, W.A.: Absorption of — hexachlorophene from infants' skin. *Lancet*, ii, 384, (1972).
- 2.- Ansel, H.C., and Cadwallader D.R.J. *Pharm. Sci.* 53, 169, (1964).
- 3.- Balazas, T.: Measurement of acute toxicity, In Paget, G.E., Ed.: *Methods in Toxicology*. Philadelphia; F.A. Davis, Co., p.60, (1970).
- 4.- Buffa, P., Carafoli, E. and Muscatello, U.: Mitochondrial biochemical lesion and pyrogenic effect of pentachlorofenol. *Biochem. Pharmacol.* 12, 769, (1963).
- 5.- Cade, A.R., and Gump, W.A.: Antiseptics, Desinfectants, Fungicides and Chemical and Physical Sterilization. (Ed. Peddish) p. 319. Lea and Febiger, Philadelphia. (1957).
- 6.- Caldwell, R.S., Nakaue, H.S., and Buhler, D.R.: Biochemical lesion in rat liver mitochondria induced by hexachlorophene. *Biochem. Pharmacol.* 21, 2426, (1972).
- 7.- Cammer, R.S., and Moore, C.L.: The effect of hexachlorophene on the respiration of brain and liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Communications*, 46, 1887, (1972).
- 8.- Campbell, A., Pitkewics, J.S.: The incidence of infections in nurseries since the discontinuation of hexachlorophene bathing. *Pediatrics*, 51, (2), Part II, 360, (1973).

- 9.- Carroll, F.E., Salak, W.W., Howard, J.M., and Parent, F.W.: Absorption of antimicrobial agents across experimental wounds. Surgs. Gynec. Obstet, 125, 974, (1967)
- 10.- Chung, H.L. Ts'ao, W.C., Hsu, H.C. Kuo, C.H. K'o, H.Y., Mo, P.S., Chang, H.Y., Chuo, H.T., Chuo, W.H.: Hexachlorophene (G-11) as a new specific drug against chlonorchiosis sinensis: its efficacy and toxicity in experimental and human infection. Chin, Med. J. 82, 691, (1963).
- 11.- Corner, T,R.: Hemolysis by hexachlorophene. Chem. Biol. Interactions. 8, 107, (1974).
- 12.- Curley, A., Hawk, R.E., Kimbrough, R.D., Natherson, G., Finberg, L.: Dermal absorption of hexachlorophene in infants. Lancet, ii, 296, (1971).
- 13.- Curley, A., and Hawk, R.E.: Hexachlorophene I. Analysis in body fluids and tissues of experimental animals. Presented at the 161 st National Meeting of American Chemical Society. March 28-april 2, (1971)
- 14.- Curly, A., Kimbrough, R.D., Hawk, R.E., Natherson, G., Finberg, L.: Dermal absorption of hexachlorophene in infants. Lancet, 1, 296, (1971)
- 15.- Deibler, G.E., Martenson, R.E., Kies, M.W.: Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species. Preparative Biochemistry, 2, (2), 139, (1972)
- 16.- Dodge, J.T., Mitchell, C., Hanahan, D.J.: The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys, 100, 119, (1963).

- 17.- Farquharson, J.H., Penny, S.F., Edward, H.E., Barr, E.: Control of — Staphylococcal skin infections in nursery.: *Canad. Med. A.J.* 67, 247, (1952).
- 18.- FDA: Hexachlorophene Temporizes on Brain-Damaging, *Chemical Science*, 174 805, (1971).
- 19.- Flores, G.; and Buhler, D.: In vitro hemolysis by chlorinated bisphenols. The role of hexachlorophene-protein interaction in the toxicity of chlorinated bisphenols. *Fedn Proc.* 31, 520, (1972).
- 20.- Flores, G., and Buhler, D.: Hemolytic Properties of hexachlorophene — and related chlorinated bisphenols. *Biochemical Pharmacology.* 23, 1835, (1974)
- 21.- Florestano, H.J.: Tuberculocidad activity and toxicity of some diphenyl methane deivatives. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 238, (1949).
- 22.- Forfar, I.E., Gould, J.C., and Maccabe, A.: Effect of hexachlorophene on incidence of staphylococcal and gram-negative infection in the — ne born, *Lancet*, 2, 7561, (1968).
- 23.- Gaines, T.B., and Kimbrough, R.D.: The oral and dermal toxicity of — hexachlorophene in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 19, (2), 375, (1971).
- 24.- Gandolfi, A.J., Nakaue, H.S., Buhler, D.R.: Effect of hexachlorophene on hepatic. drug-metabolizing enzymes in rat. *Biochemical Pharmacology* 23, 1977, (1974).

- 25.- Gezon, H.M., Thompson, D.J., Rogers, K.D., Hatch, T.F., Rycgeck, R.R., Yee, R.B.: Control of staphylococcal infections and disease in the newborn through the use of hexachlorophene bathing. Pediatrics, 51, (2) Part. II, 331, (1973).
- 26.- Gluck, L.: A perspective on hexachlorophene. Pediatrics. 51, (2) Part. II 400, (1973).
- 27.- Gluck, L., Wood, H.F., Fousek, M, D., Septicemia of the newborn. Ped. Clin. N. Amer. 13, 1131, (1966).
- 28.- Gump, W.S. Patent. 2, 250, 480, July 29, (1941)
- 29.- Gump, W.S.: Toxicological properties of hexachlorophene. J. Soc. Cosmet. Chem. 20, 173, (1969)
- 30.- Hardyment, A.F.: Control of infections of newborn infants. Pediat.Clin. N.Amer. 5, 287, (1952).
- 31.- Herter, W.B.: Hexachlorophene poisoning. Kaiser. F. Med. Bull. 7, 228, (1959).
- 32.- Kimbrough, R.D., Gaines, T.B.: Hexachlorophene effects on the rat brain. Arch. Environ. Health 23, 114, (1971).
- 33.- Kimbrough, R.D.: Review of Recent Evidence of Effects of Hexachlorophene Pediatrics. 51, (2), Part. II, 391, (1973).

- 34.- Kimbrough, R.D., Gaines, T.B.: Hexachlorophene effects on the rat -- brain. Studies of high dosis by light and electron microscopy. Arch. Environ Health, 23, 114, (1971)
- 35.- Kovacs, B.A., Gynes, L.: Smooth muscle relaxing effect of hexachlorophene. Arch. Int. Pharmacol. 13, 307, (1966).
- 36.- Kravitz, H., Murphy, J.B., Edadi, K., Rosetli, A., Ashrat, H.: Effect of hexachlorophene-detergent baths in a newborn nursery: With emphasis on the care of circumcisions. Illinois Med. J. 122, 133, (1962).
- 37.- Larson, D.L.: Studies show hexachlorophene causes burn syndrome. Hospitales, J. Amer, Hosp. Ass., 42, 63. (1968).
- 38.- Light, I.J. and Sutherland, J.M.: What is the evidence that hexachlorophene is not effective?. Pediatrics, 51, (2), Part. II, 345, (1973).
- 39.- Lowry, O., Rossenbrugh, N.: Protein mesurement with the Folin Phenol Reagent., J. Biol. Chem. 193, 265, (1951).
- 40.- Mahin, D.T., Lofberg, R.T.: Simplified method of sample preparation for determination of Tritium, Carbon-14, or Sulfur-35 in Blood or Tissue by liquid scintillation counting. Analytical Biochemistry 16, 500, (1966)
- 41.- Montagna, M., and Yun, J.S.: The skin of the domestic pig. J. Invest. Derm. 43, 11, (1964).
- 42.- Mullick, F.G.: Hexachlorophene Toxicity-Human Experience at the Armed Forces Institute of Pathology. Pediatrics, 51, (2), Part. II, 395, (1973).

- 43.- Nakau, H.S., Dost, F.N., Buhler, D.R.: Studies on the toxicity of — hexachlorophene in rat . Toxicology and applied Pharmacology, 24, 239, (1973).
- 44.- Pilapil, V.R.: Hexachlorophene toxicity in an infant. Amer. J. Dis — Child 111, 333, (1966).
- 45.- Pittman K.A.: Hexachlorophene metabolism initial studies, data from — files of Sterling-Winthrop. Research Institutes, Rensselaer, N.Y., February, (1970).
- 46.- Powell, H., Swanner, O., Gluck, L., and Lampert, P.: Hexachlorophene — myelinopathy in premature infants. The Journal of Pediatrics, 82, (6), 979, (1973).
- 47.- Robertis, E. D., Pellegrino de Iraldi, A., Rodriguez de Lores Arnaiz, G. Salganicoff.: Cholinergic and non-cholinergic Nerve. Endings in Rat Brain I, Journal of Neurochemistry, 9, 23, (1962)
- 48.- Saffer, T.E., Baldwin, J.N., and Wheeler, E.: Staphylococcal infections in nurseries. In Advances in Pediatrics, 10, Chicago: Year Book Publishers, Inc. P., 243, (1958).
- 49.- Shuman, R.M., Leech, R.W., and Alvord, E.C.: Neurotoxicity of hexachlorophene in human infants, Pediatrics, 54, 689, (1974).
- 50.- Smolen, V.F., Poust, R.I.: Interaction of hexachlorophene with human epidermis II: Comparison of kinetic and equilibrium. In vivo results obtained by direct and bioelectrometric methods, Journal of Pharmaceutical Sciences, 61, (7), 1102, (1972).

- 51.- Taylor, T., Chasseaud, L.F., Down, W.H., Medd, R.K.: The Percutaneous absorption of hexachlorophene by piglets, *Fd. Cosmet, Toxicol.* 10, 857, (1972).
- 52.- The Merck Index. Ninth Edition. Merck and Co., Inc., E.U.A., (1976).
- 53.- Thorpe, E.: Chemotherapy of experimental fascioliasis in the albino - rat. *J. Comp. Pathol.*, 75, 45, (1965).
- 54.- Thorsell, W.: The in vitro effect of hexachlorophene on some enzymes in the liver fluke, *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*, 57, 665, (1967).
- 55.- Udall, V., and Malone, J.C.: Optic nerve atrophy after drug treatment, *Proc. Eur. Soc. Study Drug Toxicity*, 11, 244, (1970)
- 56.- Wit, J.G., and Van Genderen, H.: Some aspects of the fate of hexachlorophene 2,2' -methylene bis (3,5,6-trichlorophenol) in rabbits, rat and dairy cattle. *Acta Physiol. Pharmacol. Neurl.* 11, 123, (1962).
- 57.- Williams, C.P., and Oliver, T.K., Jr: Nursery routines and staphylococcal colonization of newborn, *Pediatrics*, 44, 640, (1969).
- 58.- Weber, K., Osborn, M.: The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 244, (16), 4406, (1969).
- 59.- Gutierrez, F., Aicardi, J.: Accidental percutaneous hexachlorophene intoxication in children. *British Medical Journal*, 2, 663, (1977)

# TESIS

Por primera vez en México impresos por computadora

Rapidez extraordinaria

Paseo de las Facultades No. 34 Locales C-D

Tels. 550-86-32 y 550-87-43