

ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE ACCION DE DIFENHIDRAMINA COMO ANTIDOTO EN INTOXICACIONES AGUDAS POR ORGANOFOSFORADOS

Libardo Hernández Esquivel*

Se presenta una posible explicación del por qué la difenhidramina es más potente como antídoto de la intoxicación por organofosforados que la atropina. A bajas concentraciones ($2 \times 10^{-5}M$) la difenhidramina es un inhibidor de la acción de carbamilcolina en la sinapsis neuromuscular del recto abdominal del sapo, siendo 10 veces más potente que la atropina. Además la difenhidramina muestra efectos estabilizantes de la membrana conductiva semejantes a los presentados por los anestésicos locales. A concentraciones 100 veces mayores, la difenhidramina produce contracción del músculo.

INTRODUCCION

El uso de la difenhidramina (Benadril[®]) en las intoxicaciones por organofosforados en pacientes pediátricos y la obtención de aparentemente mejores resultados que con atropina¹, motivó para investigar el mecanismo de acción de esta droga a nivel molecular.

Los efectos tóxicos característicos de los organofosforados son debidos principalmente a la inactivación de la acetilcolinesterasa², con la consecuente acumulación de acetilcolina (Ach) en las sinapsis colinérgicas, especialmente a nivel neuromuscular. Esta acumulación de Ach causa, entre otros síntomas, parálisis de los músculos respiratorios, constituyendo esto el signo más serio de la intoxicación.

El tratamiento usado en estas intoxicaciones³ está basado en la administración de aldoximas, compuestos desarrollados en el laboratorio de Nachmansohn⁴ como reactivadores de las colinesterasas, conjuntamente con la aplicación de atropina como protector de los receptores colinérgicos contra los efectos causados por la acumulación de acetilcolina. Córdoba y col.⁹ proponen un tratamiento a base de difenhidramina, atropina y reactivadores de las colinesterasas.

En el presente reporte se comparan las acciones de la atropina y de la difenhidramina sobre la contracción del músculo recto abdominal del sapo (*Bufo marinus*) producido por carbamilcolina (CCh).

METODOLOGIA

Músculos rectos abdominales de sapo fueron disecados cuidadosamente y montados en un baño de órganos aislados, de 10 ml de capacidad. Las contracciones fueron registradas isotónicamente por medio de un transductor FTO3 GRASS y un polígrafo GRASS Modelo 79. La solución nutriente tenía la siguiente composición en micromoles/ml: NaCl 111; CaCl₂ 1.8; KCl 2,5; NaHCO₃ 2,5; Glucosa 10.

Los experimentos se realizaron a la temperatura ambiente y a un pH de 7.3 a 7.5. La preparación se burbujeó continuamente con oxígeno. Se usaron simultáneamente los dos músculos homólogos de un sapo, uno para obtener la respuesta control a carbamilcolina y el otro en presencia de la droga por ensayar. Únicamente los músculos que daban una contracción de 2 gr ó más en 30 segundos, después de que se había alcanzado una concentración de $1 \times 10^{-5}M$ de carbamilcolina, fueron utilizados.

Previamente a los ensayos las preparaciones se dejaron estabilizar en la solución nutriente por media hora como mínimo. Los músculos se montaron de tal manera que estuviesen bajo una tensión de 1.5 gr. La determinación del efecto inhibitorio de las drogas ensayadas fué determinada incubando las preparaciones por 15 minutos en presencia de ellas y realizando luego una curva dosis-respuesta del agonista en presencia de la misma concentración del inhibidor.

El valor del Ki aparente (constante de inhibición aparente) se calculó por el método de Gaddum basado en la ley de acción de masas.

* Dirección actual: Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia - Universidad Nacional, Bogotá (Colombia).

$$K_i = \frac{(I) - (A)}{(A) - (A)}$$

Donde: (I) = Concentración del inhidor
 (A) = Concentración del activador que produce la misma respuesta en presencia del inhidor.

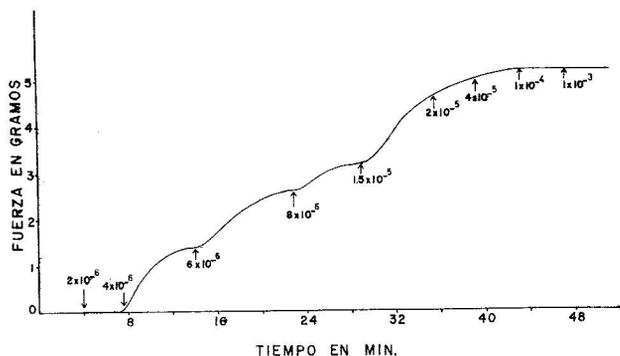
Se usó CCh en preferencia a Ach debido a que ella no es hidrolizada por las colinesterasas evitando así la necesidad de usar un anticolinesterásico que podría alterar el efecto de las drogas ensayadas.

RESULTADOS

La Gráfica 1 muestra un registro de la respuesta del músculo a CCh expresada en gramos desarrollada por el músculo a concentraciones crecientes de CCh en el baño. En esta gráfica se puede observar que a medida que se aumenta la concentración de CCh en el baño, aumenta la fuerza de contracción hasta un mínimo.

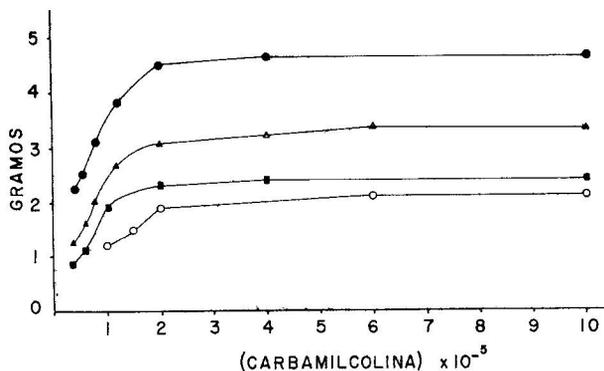
Cada concentración de CCh se dejó actuar hasta obtener un estado estacionario de la contracción que se utilizó para hacer las curvas dosis-respuesta (Ver Gráfica 2 y 4). En general el umbral fué de 4×10^{-6} M.

Se estudió el efecto del curare sobre la respuesta contráctil de CCh, encontrándose que el curare inhibe competitivamente la contracción producida por CCh, como en el recto abdominal de la rana y en la electroplaca⁶. El valor de K_i aparente encontrado es aproximadamente de 2×10^{-6} M, 10 veces más alto que los reportados para las reuniones neuromusculares de la electroplaca y de la rana.



Gráfica 1. Efecto de diferentes concentraciones de carbamilcolina sobre la concentración del recto abdominal de sapo. Se muestra el registro de un experimento, donde se puede ver que cada concentración de CCh causa un estado estacionario.

En la Gráfica 2 se pueden ver curvas dosis-respuesta de carbamilcolina sola y en presencia de 3 diferentes concentraciones de difenhidramina. Se observa que la difenhidramina inhibe el efecto de carbamilcolina y reduce la respuesta máxima.



Gráfica 2. Curvas dosis-respuesta de carbamilcolina en presencia de diferentes concentraciones de difenhidramina. Abscisa: Concentraciones de CCh. Ordenada: Estado estacionario de fuerza de contracción (Ver gráfica 1).

- = CCh
- ▲ = Difenhidramina 2×10^{-5} + CCh
- = Difenhidramina 4×10^{-5} + CCh
- = Difenhidramina 1×10^{-4} + CCh

Si se aumenta la concentración de difenhidramina a 1×10^{-3} M se produce contracción del músculo (Gráfica 3A y B). El curare no tiene ningún efecto sobre la respuesta máxima, aunque si podemos ver al comparar las gráficas 3a. y 3b un pequeño retardo en la acción de la difenhidramina. Para eliminar la posibilidad de que la contracción producida por difenhidramina pudiera ser debida a la alta osmolaridad presente, en el baño se usó sucrosa a 5×10^{-2} M no obteniéndose contracción.

La Gráfica 4 muestra los datos de 4 músculos de dos sapos, usándose en cada uno un músculo como control y el otro en presencia de difenhidramina y atropina respectivamente. Se puede ver la diferencia en la respuesta de CCh en presencia de ambas drogas y se observa que con atropina se obtiene el mismo máximo de contracción cuando se aumenta la concentración de CCh a 1×10^{-4} M, mientras que en presencia de difenhidramina el máximo se encuentra disminuído.

Las curvas dosis-respuesta muestran que la difenhidramina es 10 veces más potente como bloqueador de la acción de carbamilcolina que atropina. El tiempo de recuperación (lapso necesario para que el músculo retorne a su estado inicial) con curare y atropina es más rápido que con difenhidramina.

DISCUSION

Es bien conocido que la contracción causada por Ach ó CCh es debida a la unión de la Ach con los receptores colinérgicos de las membranas post-sinápticas. Esta unión causa una despolarización de las membranas post-sinápticas, iniciando potenciales de acción responsables de la contracción. Se presume que la fuerza registrada es una

No podemos ofrecer en este momento una explicación a la despolarización causada por difenhidramina a altas concentraciones, aunque sí podemos decir que dicha acción no es a nivel del receptor colinérgico, ya que no es bloqueada por curare.

El hecho de que se necesite una sola dosis diaria de difenhidramina en caso de intoxicaciones por organofosforados, y no varias dosis como sucede con atropina, está posiblemente fundamentado por los hallazgos aquí reportados en los cuales se demuestra que la difenhidramina es más potente, tiene mayor afinidad debido a su estructura química más semejante a Ach y su efecto estabilizante sobre la membrana conductiva en bajas concentraciones hacen que antagonice más efectivamente los efectos tóxicos de los organofosforados a nivel neuromuscular.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a la doctora Eva Bartels de Bernal y al doctor Antonio Guerra G. por sus ayudas en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Valencia, C. et al.: Nuevo método para el tratamiento de las intoxicaciones por fosforados orgánicos con difenhidramina. *Antioquia Méd* 20: 249, 1970.
2. Nachmansohn, D.: Proteins in excitable membranes.: Their properties and function in bioelectricity. *Science* 168: 1059, 1970.
3. Willemas, J. et al.: Some observations on severe human poisonings with organophosphate pesticides. *Arch Toxih* 28: 182, 1971.
4. Wilson, J.B. y A. Ginsburg.: A powerful reactivation of alkylphosphate inhibited acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta* 18: 168, 1955.
5. Kirschner, L.B. and W.E. Stone.: *J Gen Physiol* 34: 82, 1951.
6. Higman, H.B. et al.: "Apparent dissociation constants between carbamylcholine, d-tubocurarine and the receptor". *Biochim Biophys Acta* 75: 187, 1963.
7. Beranek R. y F. Vyskocil: "The effect of atropine on the frog sartorius neuromuscular junction". *I. Physiol* 195: 493, 1968.
8. Podleski, T.R. y E. Bartels: "Difference between tetracaine and-tubocurarine in the competition with carbamylcholine". *Biochim Biophys Acta* 75: 387, 1963.
9. Córdoba P.D. et al.: "Intoxicaciones por organofosforados orgánicos y su tratamiento con difenhidramina". En preparación. (Comunicación Personal)