

SECCION DE MEDICINA EXPERIMENTAL

EFFECTOS DEL PETIDO NATRIURETICO ATRIAL SOBRE LAS ARRITMIAS CARDIACAS
INDUCIDAS POR ACEPROMAZINA EN LA RATA:
REPORTE PRELIMINAR

1, 2, 3 Dr. Ariosto Rosado
2 Dr. Rafael D. Hernández
1, 3 Dra. Angela Halls
1, 3 Dr. Humberto Bencosme
1, 3 Dra. María García
1, 3 Dr. Sergio A. Bencosme

RESUMEN:

Recientemente se ha demostrado en las células de Purkinje del sistema de conducción intraventricular cardiaco, la presencia del Péptido Natriurético Atrial (PNA), así como receptores y mRNA para el mismo, lo que sugiere una función autocrina para esta hormona y una posible función moduladora del impulso a través de este sistema. El propósito del presente estudio fue determinar si el PNA tenía un potencial terapéutico sobre las arritmias cardiacas, utilizándose la Acepromazina como sustancia arritmogénica. Para tal fin se administró PNA, en la forma de Extracto Crudo de Tejido Atrial (ECTA), antes y después de inducir una arritmia. Se demostró, en el registro electrocardiográfico (ECG) de la rata, que esta hormona tiene un efecto de tipo preventivo y supresivo. Estos hallazgos sugieren un efecto modulador del PNA sobre la conducción y/o automatismo cardiaco, y por ende, un potencial terapéutico antiarrítmico para esta hormona.

Péptido Natriurético Atrial Arritmia Cardiaca Acepromazina.

ABSTRACT:

It has been recently demonstrated in the cells of the Purkinje's intraventricular cardiac conduction system, the presence of the Atrial Natriuretic Peptide (PNA) and receptors and m-RNA for it. This suggest an autocrine function for this hormone and a posible modulatory function of the impulse going through this system. The purpose of this study was to determine if the PNA had a therapeutic potential over cardiac arrhythmias. We use Acepromazin as arrytmic induction substance.

We administered PNA in the form of a crude extract of atrial tissue (ECTA), before and after the induction of the arrhythmia. It was demonstrated in the electrocardiographic trace of the rat, that this hormone have a preventive and surpressive effect over the arrhythmia.

These findings suggest a modulatory effect of the PNA over conduction and/or cardiac automatism and therefore an antiarrhythmic therapeutic potential for this hormone.

Atrial Natriuretic Petide Cardiac Arrythmia Acepromazin

1. Centro de Biología Humana y Experimental. Centro de Investigación, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, R.D.
2. Area de Ciencias Fisiológicas, Departamento de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, R.D.
3. Departamento de Investigaciones Clínicas, Hospital Regional Universitario José María Cabral y Báez, Santiago, R.D.

INTRODUCCION

Con el descubrimiento del Péptido Natriurético Atrial (PNA) por el Dr. Adolfo de Bold en el 1981, se estableció que el corazón posee una función endócrina.¹⁻²

A este péptido se le atribuye una importante participación en la homeostasis corporal, principalmente de sodio y agua, como de la presión arterial.³

En este sentido, el PNA está siendo ampliamente estu-

diado en relación con diversas patologías caracterizadas por exceso de fluido corporal y retención de NaCl, como son: la hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca, fallo renal, cirrosis hepática, síndrome nefrótico y preeclampsia, entre otras.³⁻⁴

Recientemente se ha demostrado que las células de Purkinje del sistema de conducción intraventricular producen PNA, y además poseen receptores para el mismo, lo que sugiere una función reguladora, vía un mecanismo autocrino.⁵⁻⁶

Esta posible función reguladora del sistema de conducción nos ha motivado a estudiar la relación del PNA con las arritmias cardiacas, en función de un potencial terapéutico de esta hormona.

MATERIALES Y METODO

A. PREPARACION DEL PNA: EXTRACTO CRUDO DEL TEJIDO ATRIAL DE LA RATA

Se sacrificaron 5 ratas con un fuerte golpe en la cabeza. Rápidamente se les extrajo el corazón, colocándolos de inmediato en un petri de vidrio con solución salina helada al 0.9%. Los atrios fueron disecados, secados rápidamente con papel de filtro, pesados y luego hervidos por 10min en solución salina 0.9%, con una relación de 62.5ml por gramo de tejido atrial. El tejido se maceró en un mortero de porcelana y luego se centrifugó a 2500 rpm x 10min. Al sobrenadante se le removió la capa superficial de grasa y se hirvió de nuevo para concentrarlo llevándolo a 5ml. El extracto se puede usar de inmediato o almacenarlo a -20°C hasta su uso. Por conveniencia, usaremos los términos ECTA y PNA indistintamente.

Cinco atrios de ratas promedian 0.4mg, por lo que 0.1ml del ECTA equivale a 8mg de tejido atrial. El contenido aproximado de PNA puro por 0.1 ml del ECTA se puede extrapolar de la literatura,⁶ ya que 8mg de tejido atrial de rata contienen 24 ug de PNA en condiciones óptimas de extracción. El contenido exacto de PNA en nuestros extractos sólo se podrá hacer cuando esté instalado el RIE para medir el PNA.

Para preparar el vehículo y usarlo como control, se tomaron 25ml de solución salina al 0.9% y se hirvieron hasta concentrarlo a 5 ml.

B. PREPARACION EXPERIMENTAL GENERAL

Se usaron ratas Wistar de 250-300 G de ambos sexos, anestesiadas con Ketalar 50mg/K + Acepromazina 1 ml/K de una solución al 0.5% vía intraperitoneal. Se catectizó la vena femoral para la infusión de líquidos y medicamentos. Se inició registro electrocardiográfico usando un fisiógrafo de la Narco Bio-System conectado a un osciloscopio. Luego de un período de estabilización de 15min se tomó registro basal del EKG iniciándose los experimentos según se describen a continuación.

C. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

1. Efecto arritmogénico de la Acepromazina (Calmivet 0.5%, Vetoquinol, S.A.; Magny-Vernois, Lure, France). A tres ratas se les administraron tres bolus de 0.3ml de Acepromazina con intervalos de 1 min hasta inducir una arritmia sostenida; ésta se dejó evolucionar 5min. Luego se les administró otro bolus de 0.3ml de Acepromazina.

2. Efecto del PNA sobre las arritmias inducidas por Acepromazina. Este experimento se dividió en tres partes a, b, c, utilizándose una rata en cada una.

a. Se administraron dos bolus de 0.4 ml de Acepromazina a intervalo de 1 min; luego se administró un bolus de 0.4ml de PNA. Se observó la evolución durante 5 min.

b. Se inició con una infusión de Acepromazina 0.1 ml/min que duró todo el experimento. Inmediatamente después de iniciar la infusión, el animal recibió además dos bolus de 0.3ml de Acepromazina a intervalos de 1 min cada uno. Luego se administró un bolus de 0.25ml de PNA, se dejó evolucionar durante 5min. Se repitió en dos ocasiones, sucesivas, el procedimiento descrito para producir una arritmia con los dos bolus de Acepromazina y el tratamiento posterior con el bolus de PNA.

c. Inicialmente se administraron 3 bolus de PNA de 0.25, 0.5 y 0.75ml con intervalos de 5min. Inmediatamente después se administraron cinco bolus de Acepromazina de 0.3ml a intervalos de 1 min. A seguidas de producirse una arritmia sostenida, se administró un bolus de 0.25ml de PNA.

3. Efecto del vehículo usado para extraer e infundir el PNA en las arritmias inducidas por Acepromazina. Se tomó una rata, a la cual se le administraron 3 bolus del vehículo de 0.25ml, con un intervalo de 5 min entre cada dosis. Luego se administraron tres bolus de Acepromazina de 0.3ml a intervalos de 1 min para obtener una arritmia, inyectándose de inmediato un bolus de 0.25ml del vehículo, se observó por 3 min.

RESULTADOS

1. Efecto arritmogénico de la Acepromazina. En estas ratas, después del primer bolus, se evidenció una depresión del nodo sino-atrial (S-A), el cual fue sustituido por un ritmo del empalme con los dos bolus subsiguientes (Fig. 1a y 1b). Después del cuarto bolus apareció una disminución en la frecuencia del ritmo del empalme, así como extrasístoles ventriculares (Fig. 1c).

2. Efecto del PNA sobre las arritmias inducidas por Acepromazina.

a. En este animal se produjo un cambio del marcapaso desde el nodoS-A a un origen atrial bajo acompañado de cambios en la polaridad del QRS, y un au-

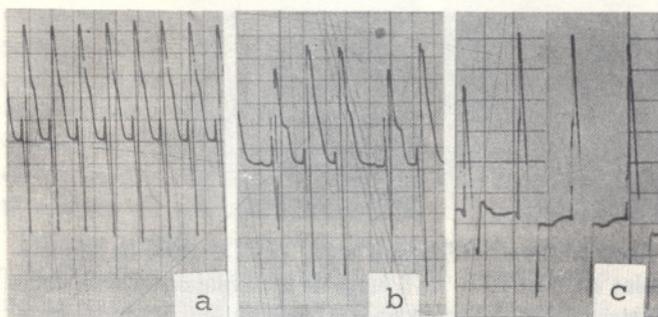


FIG. 1. ECG después de la administración de Acepromazina en tres ratas (a,b,c). a y b: Luego de 3 bolus. c: luego de un cuarto bolus.

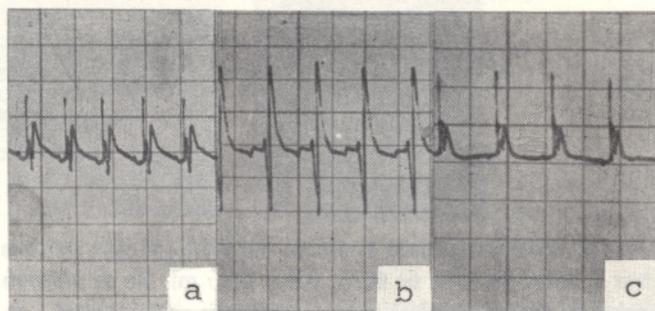


FIG. 2. ECG mostrando el efecto de PNA en la arritmia por Acepromazina. a: Registro basal. b: Ritmo atrial bajo a seguidas de 2 bolus de Acepromazina. c: Restablecimiento del ritmo sinusal a los 15 seg luego de administrar el PNA.

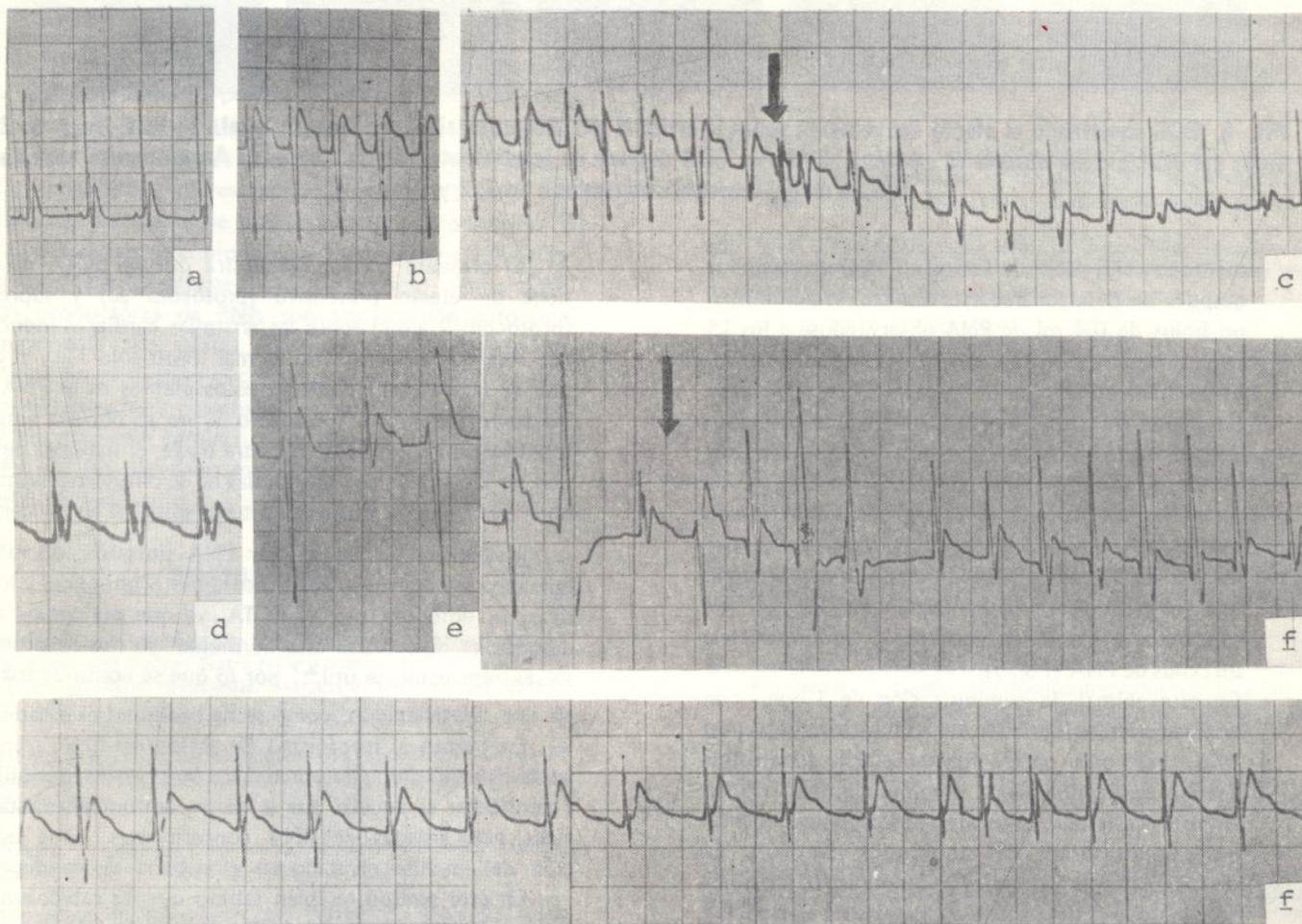


FIG. 3. ECG mostrando el efecto del PNA sobre las arritmias por Acepromazina. a: Registro basal. b: Ritmo del empalme producido por la infusión + 2 bolus de Acepromazina. c: La flecha indica momento de administración del PNA; a seguidas se restablece el ritmo sinusal. d: ECG 30 seg después del bolus de PNA. e: Ritmo ventricular bigeminado luego de la administración de Acepromazina. f: Restablecimiento del ritmo sinusal luego de administrar 0.25 ml de PNA.

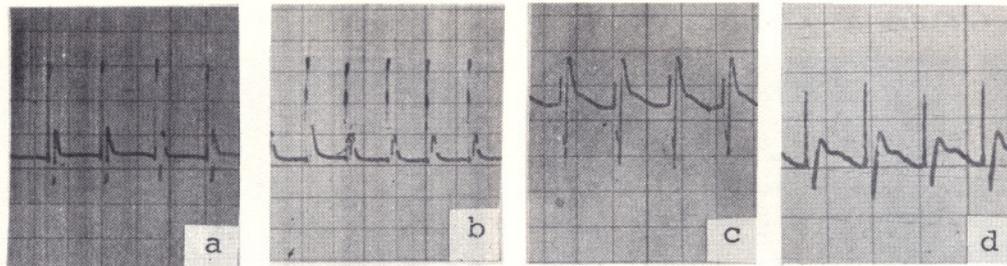


FIG. 4. ECG mostrando el efecto del PNA sobre la arritmia por Acepromazina. a: Registro basal. b: ECG luego de administrar 3 bolus de PNA de 0.25, 0.5 y 0.75 ml. No se observó cambios en el ECG. c: ECG luego de la administración de cinco bolus de Acepromazina; apareció arritmia del empalme. d: Restablecimiento del ritmo sinusal 20seg después de administrar 0.25 ml de PNA.

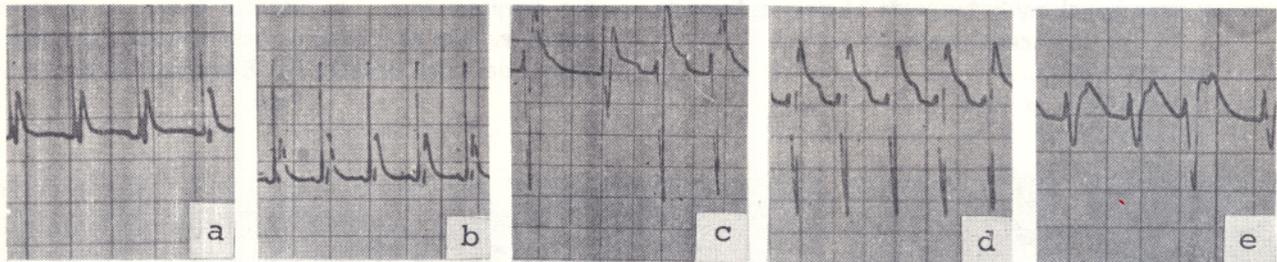


FIG. 5. ECG mostrando el efecto del vehículo sobre la arritmia por Acepromazina. a: Registro basal. b: ECG luego de 3 bolus del vehículo sin observarse cambios. c, d y e: ECG después de la administración de 3 bolus de Acepromazina seguido de 0.25 ml del vehículo observados a los 1, 2 y 3 min.

mento en el voltaje de la onda T. Veinte segundos después de desarrollarse este cuadro, se administró un bolus de 0.4 ml de PNA observándose a los 15 seg un restablecimiento del ritmo sinusal (Fig. 2).

- b. En este animal se obtuvo un cambio del marcapaso S—A por un ritmo del empalme. Diez segundos después se administró un bolus de PNA, restableciéndose, casi de inmediato, el ritmo sinusal. Al repetirse este procedimiento, los resultados fueron iguales al anterior. En cambio, al repetirse por tercera vez el mismo procedimiento se desencadenó una arritmia ventricular bigeminada, la cual fue suprimida a los 6 seg después de administrársele un bolus de PNA (Fig. 3).
- c. En este animal, la administración de 3 bolus con dosis crecientes de PNA no indujo cambios en el ECG. Por otra parte, fue necesario administrar 5 bolus de Acepromazina, para inducir una arritmia; en este caso del empalme, observándose además un episodio breve de taquicardia ventricular (7 seg). Treinta seg después se administró un bolus de PNA que restableció el ritmo sinusal a los 10 seg (Fig. 4).

3. Efecto del vehículo sobre las arritmias inducidas por Acepromazina. La administración del vehículo no indujo cambio alguno en el ECG, ni tampoco en la arritmia del empalme sostenida inducida por la Acepromazina durante los 3 min de observación (Fig. 5).

DISCUSION

El presente trabajo demuestra que el ECTA de rata tiene un efecto preventivo (protocolo 2c) y supresivo (protocolo 2 a,b,c) sobre las arritmias cardiacas inducidas por Acepromazina en este animal (protocolo 1), y sugiere que el factor responsable de estos efectos es el PNA, ya que con el vehículo (protocolo 3) no se obtuvo ninguna modificación en el ECG. Por otra parte, el hallazgo de que con las altas dosis de PNA usadas no se obtuvieron cambios en el ECG, motiva y justifica futuros estudios en ese campo.

Idealmente, se debió usar PNA sintético, de rata o humano. Sin embargo, por dificultades económicas y logísticas, se optó por usar el ECTA, ya que por varios años después de descubrirse esta hormona,¹ su uso ha probado ser extremadamente útil,^{2,7} por lo que se continúa usando en este departamento, como se ha hecho en el pasado.⁸⁻¹⁰

En cuanto al mecanismo de acción del PNA, frente a las arritmias por Acepromazina, la primera posibilidad a considerar es aquella que se deriva de funciones establecidas, pero aisladas, del PNA, concernientes con la regulación del impulso cardiaco en el sistema de conducción.

En este sentido, es bien sabido que las catecolaminas producen un aumento del AMP-c y a través de este último juegan un papel importante en la producción de arritmias.¹¹⁻¹³ Estas últimas pueden prevenirse con el GMP-c¹⁴ el cual sirve como segundo mensajero para el PNA.⁷

La reciente demostración de que el PNA inhibe considerablemente la producción de AMP-c, tanto el basal como el estimulado por las catecolaminas en las células de Purkinje, y que esta hormona a altas dosis también

incrementa el GMP-c de esas células, les ha permitido a otros autores sugerir que el PNA es posiblemente un factor importante en la función reguladora del sistema de conducción.⁵⁻⁶ Según estos últimos,⁵ los episodios de bradicardia reportados por otros,¹⁵ cuando se infunden grandes cantidades de PNA en el hombre, resultarían en parte a través de un decremento en el AMP-c y un aumento del GMP-c, según lo explicado anteriormente.

En este sentido, es posible que en nuestro modelo con Acepromazina, los altos niveles de PNA administrados contribuyeran a los efectos preventivos y supresivos de las arritmias, mediante la disminución del AMP-c y el incremento del GMP-c en las células de Purkinje de estos animales.

Los grandes adelantos en el conocimiento de la acción del PNA sobre el sistema de conducción y sus alteraciones se deben mayormente al rápido progreso de la biología celular moderna.

Se ha establecido que en el Sistema Nervioso Central algunas neuronas tienen una función autocrina al sintetizar el PNA,⁵⁻⁶ tener receptores para el mismo,¹⁶⁻¹⁷ y determinarse que esta hormona posee en ella un efecto inhibitorio sobre su frecuencia de disparo.¹⁸ De las similitudes morfofuncionales entre algunas neuronas centrales y las células de Purkinje,¹⁶⁻²¹ y los resultados del presente trabajo, han surgido los elementos de trabajo para la conformación de una nueva concepción biológica del sistema de conducción. Esta considera las células de Purkinje como células endocrinas productoras de PNA con una función autocrina, permitiéndole esta última usar los altos niveles de esta hormona en el líquido circundante, para modular, en condiciones normales y patológicas, el impulso de conducción, y/o automatismo cardiaco, a través de cambios en los niveles de los segundos mensajeros, AMP-c y GMP-c⁵⁻⁶ de estas células.

BIBLIOGRAFIA

1. De Bold, A.J.; Borenstein, H.B.; Veres, A.T.; Sonnenberg, H.: A Rapid and Potent Natriuretic Response to Intravenous Injection of Atrial Myocardial Extracts in Rat. *Life Sci*, 28:89-94, 1981.
2. De Bold, A.J.: On the Shoulders of Giants: The Discovery of Atrial Natriuretic Factor. *Can J Physiol Pharmacol*, 65: 2007-2012, 1987.
3. Baxter, J.; Lewicki, J.; Gardner, D.: Atrial Natriuretic Peptide. *Biotechnology*, 6:529-543, 1988.
4. Weidmann, P.; Saxenhofer, H.; Ferrier, C.; Shan, S.: Atrial Natriuretic Peptide in Man. *Amer J Nephrol*, 8:1-14, 1988.
5. Cantin, M.; Thibault, G.; Haile-Meskel, H.; Ding, J.; Milne, R.W.; Ballak, M.; Charbonneau, C.; Nemer, M.; Drouin, J.; García, R.; Genest, J.: Atrial Natriuretic Factor in the Impulse-Conduction System of Rat Cardiac Ventricles. *Cell Tissue Res*, 256:309-325, 1989.
6. Anand-Srivastava, M.B.; Thibault, G.; Sola, C.; Fon, E.; Ballak, M.; Charbonneau, C.; Haile-Meskel, H.; García, R.; Genest, J.; Cantin, M.: Atrial Natriuretic Factor in Purkinje Fibers of Rabbit Heart. *Hypertension*, 13:789-798, 1989.
7. Bencosme, S.A.; Tejada, R.; Díaz, S.; López, L.; Báez, N.; Jiménez, U.; Guzmán, I.: Corazón Endocrino: Cardionatrin. CBHE, CI; FCS, PUCMM y el DIC, HRUJMCB, SESPAS. Monografía No.3, 1985.
8. Cruz, M.; Bencosme, S.A.; Guzmán, I.; Peña, E.; Núñez, M.; Bencosme, H.: Efecto Vasorrelajante del Extracto Crudo de Tejido Atrial Canino sobre la Aorta de Perros y Conejos Previamente Contraída. A-8, 3ra. Jornada Médico Quirúrgica. HRUJMCB. 1986.
9. Tejada, R.; Bencosme, S.A.; Guzmán, I.; Núñez, M.; Cruz, M.; Bencosme, H.; Peña, E.: Resultados Preliminares del Modelo Experimental In Vivo para la Evaluación Fisiológica del Extracto Crudo de Tejido Atrial. A-9, 3ra. Jornada Médico Quirúrgica. HRUJMCB. 1986.
10. Sepúlveda, M.; Sandoval, R.; Kelly, G.; Calcaño, N.; Morel, A.: Efecto de la Infusión de la Hormona Cardíaca sobre el Flujo Sanguíneo de la Carótida en Perros Anestesiados. Tesis de grado del Departamento de Medicina. CBHE, CI, PUCMM. 1989.
11. Pecker, M.S.; Wook-Bin, I.M.; Sonn, J.K.; Lee, C.O.: Effect of Norepinephrine and Cyclic AMP on Intracellular Sodium Ion Activity and Contractile Force in Canine Cardiac Purkinje Fibers. *Cir. Res*, 59: 390-397, 1986. Citado de la referencia No.6.
12. Podzuweit, T.: Catecholamine-cyclic AMP/Ca²⁺-induced ventricular Tachycardia in the Intact Pig Heart. *Basis Res Cardiol*, 75: 772-779, 1980. citado de la referencia No.6.
13. Tsien, S.: Adrenaline-like effect of Intracellular Iontophoresis of Cyclic AMP in Cardiac Purkinje Fibers. *Nature New Biol*, 245:120-122, 1973. Citado de la referencia No.6.
14. Mehegan, J.P.; Muir, W.W.; Unverferth, P.V.; Fertel, R.H.; McGuirk, S.M.: Electrophysiologic Effect of Cyclic GMP on Canine Cardiac Purkinje Fibers. *J Cardiovasc Pharmacol*, 7:30-35, 1985. Citado de la referencia No.6.
15. Franco-Suárez, R.; Somani, T.; Mulrow, P.J.: Bradycardia after Infusions of Atrial Natriuretic Factor. *Ann Int Med*, 107:594, 1987.
16. Quirion, R.; Dalpe, M.; Dam T.V.: Characterization and Distribution of Receptors for the Atrial Natriuretic Peptides in Mammalian Brain. *Proc Natl Acad Sci, USA* 83: 174-178, 1986.
17. Bianchi, C.; Gutkowska, J.; Ballak, M.; Thibault, G.; García, R.; Genest, J.; Cantin, M.: Radioautographic Localization of ¹²⁵I-Atrial Natriuretic Factor Binding Sites in the Brain. *Neuroendocrinology*, 44:365-372, 1986.
18. Okuya S, Yamashita Y.: Effect of atrial natriuretic polypeptide in rat hypothalamic neurons in vitro. *J Physiol* 1987; 389: 717-728. Citado de la referencia No.6.
19. Bencosme, S.A.; Trillo, A.; Alanis, J.; Benitez, D.: Correlative Ultrastructural and Electrophysiologic Study of the Purkinje System of the Heart. *J Electrocardiol*, 2:27-28, 1969.
20. Martínez-Palomo, A.; Alanis, J.; Benitez, D.: Transitional Cardiac Cells of the Conduction System of the Dog Heart. Distinguishing Morphological and Electrophysiological Features. *J Cell Biol*, 47:1-17, 1970.
21. Kawata, M.; Nakao, K.; Morii, N.; Kiso, Y.; Yamashita, H.; Imura, H.; Sano, Y.: Atrial Natriuretic Polypeptide: Topographical Distribution in the Rat Brain by Radioimmunoassay and Immunohistochemistry. *Neuroscience*, 16:521-546, 1985.