

EFFECTO DE LA APLICACIÓN TÓPICA DE UNA SOLUCIÓN COMERCIAL DE AMITRAZ SOBRE EL CRONOTROPISMO Y DROMOTROPISMO CARDIACOS EN RATAS ANESTESIADAS Y PERROS CONSCIENTES

Effect of a Topical Application of Amitraz Solution on Cardiac Chronotropism and Dromotropism in Anesthetized Rats and Conscious Dogs

Héctor A. Zerpa^{*1}, Elena del C. Briceño^{**}, Tony Chacón^{***}, Simón G. Comerma-Steffensen^{*}, Tibisay Ladrón^{****}, Elías R. Ascanio^{**}, Jesús Rojas^{*}

^{*}Cátedra de Fisiología y ^{**}Cátedra de Farmacología, ^{***}Cátedra de Clínica Aplicada. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, estado Aragua. ^{****}Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Maracay, estado Aragua. Venezuela

Correo-E: hector.zerpa@lycos.com

Recibido: 01/04/09 - Aprobado: 11/12/09

RESUMEN

El amitraz es una formamidina usada como ectoparasiticida en Medicina Veterinaria. Su toxicidad intravenosa y oral ha sido reportada, aunque su prescripción se fundamenta en aplicaciones tópicas. Esta investigación evaluó los efectos cronotrópicos y dromotrópicos de la aplicación tópica de amitraz (12% v/v; 4mL/L) en ratas anestesiadas con pentobarbital sódico y en perros conscientes. Se usaron 16 ratas y 12 perros, los cuales se sometieron a un electrocardiograma (ECG) control. Subsecuentemente, a 16 ratas se les aplicó amitraz en baño de inmersión por 2 min y a 12 perros se les aplicó baños de aspersión. Posteriormente, se registraron dos ECGs consecutivos cada 30 min, durante 1 h. Como indicadores de cronotropismo y dromotropismo, se usaron la frecuencia cardiaca (FC) y el intervalo P-R, respectivamente. La FC en ratas fue reducida (control: $265,7 \pm 12,1$ lat/min *vs* amitraz: $234,4 \pm 13,8$ lat/min) a los 30 min del baño con amitraz, alcanzando diferencias significativas ($P < 0,05$), a los 60 min ($225,0 \pm 13,6$ lat/min). Se prolongó el intervalo P-R (control: $54,3 \pm 2,0$ mseg *vs* amitraz:

ABSTRACT

Amitraz is a diamidine molecule widely used as an ectoparasiticide in Veterinary Medicine. Although amitraz is prescribed as a topical treatment, its toxicity has been reported in oral and intravenous administration. This investigation assessed the potential chronotropic and dromotropic effects of topical amitraz (12% v/v; 4mL/L) in anesthetized rats and conscious dogs. Sixteen rats and twelve dogs were used. Before treatment, body surface was moistened with water and all animals were subjected to a baseline electrocardiogram (ECG). Subsequently, amitraz was applied to rats ($n=16$) as an immersion bath for 2 min, or as a spray application to dogs ($n=12$), respectively. Two consecutive ECGs were recorded at 30 min interval for 1 h. The heart rate (HR) and the P-R intervals were calculated to estimate chronotropism and dromotropism, respectively. The HR of rats was reduced (control: 265.7 ± 12.1 beats/min *vs* amitraz: 234.4 ± 13.8 beats/min) at 30 min after amitraz application, reaching a significant ($P < 0,05$) value at 60 min (225.0 ± 13.6 beats/min). The P-R interval was significantly ($P < 0.05$)

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

67,9±2,4 mseg) ($P<0,05$) a los 30 min y 60 min (72,1±2,8 mseg), respectivamente. En contraste, no se observaron cambios significativos en la FC e intervalo P-R en perros. Los efectos cronotrópicos y dromotrópicos negativos observados en ratas, podrían reflejar una acción agonista α_2 -adrenérgica presináptica en el sistema nervioso central, con la consecuente reducción del tono simpático, sin descartar una acción parasimpaticomimética. Posiblemente, la absorción cutánea del amitraz en caninos, sería incapaz de desarrollar estos efectos. En caninos sin premedicación, pudieran desarrollarse respuestas autonómicas reflejas capaces de regular un posible efecto del amitraz sobre las variables estudiadas. Las dosis terapéuticas de amitraz, no produjeron cambios en el ECG de caninos aparentemente sanos. Se requieren experimentos adicionales para esclarecer si dosis superiores en aplicación tópica actúan en forma similar en perros con lesiones de piel producidas por ácaros o garrapatas.

(Palabras clave: Perro, rata, pentobarbital, amitraz, frecuencia cardiaca, electrocardiografía, cronotropismo, dromotropismo, aplicación tópica)

prolonged at 30 min (control: 54.3±2.0 msec vs amitraz: 67.9±2.4 msec) and 60 min (72.1±2.8 msec), respectively. In contrast, no significant changes in HR and P-R interval were found in dogs treated with amitraz. The negative chronotropic and dromotropic effects observed in rats may reflect the activation of pre-synaptic α_2 -adrenoceptors in the central nervous system and a reduction in the sympathetic outflow, without excluding a potential parasymphatomimetic effect. The lack of these effects in dogs might be related either to reduced skin absorption or to a potential autonomic regulatory reflex in conscious dogs. The therapeutic dose of amitraz used herein did not modify the ECG in apparently healthy dogs. Further experiments are required to establish the effects of higher topical doses in dogs suffering from skin diseases related to mites or ticks infestations.

(Key words: Dog, rats, pentobarbital, amitraz, heart rate, electrocardiography, chronotropism, dromotropism, topical application)

INTRODUCCIÓN

El amitraz (N'-(2,4-dimethylphenyl)-N-[(2,4-dimethylphenyl)iminomethyl]-N-methylmethanimidamide: C₁₉H₂₃N₃) es una formamidina usada como acaricida en Medicina Veterinaria. Se ha usado ampliamente en perros con dermatitis asociada al *Demodex canis* y en infestaciones por *Rhipicephalus sanguineus*. En perros, las vías de administración más comunes son: collares, baños con soluciones acuosas o la aplicación de soluciones más concentradas en las áreas de la piel donde se localice la lesión (Mundel, 1996; Tarallo et al., 2009). Se propone que el sitio de acción de este fármaco en los invertebrados se localiza en el receptor de la octopamina, adenilato ciclasa dependiente. Este receptor presenta una similitud estructural con los receptores α -adrenérgicos, por lo cual, se ha propuesto que uno de los posibles mecanismos de generación de toxicidad en los mamíferos pudiera ser mediado por estos receptores (Costa et al., 1988; Andrade et al., 2006).

Los efectos secundarios que causa el amitraz son similares a los producidos por los agonistas α_2 -adrenérgicos, tales como la clonidina y la xilazina (Shin y Hsu, 1994). Por otra parte, esta última ha sido usada como preanestésico en Medicina Veterinaria, donde se han descrito sus efectos cardiovasculares en perros (Martinez, 1986; Vega, 1996). Dentro de los efectos farmacológicos de la xilazina en perros, destacan la generación de bloqueos aurículo-ventriculares, bradicardia, hipertensión arterial seguida de hipotensión. Algunos de los efectos secundarios de la administración de amitraz son la sedación y la letargia, signos que mimetizan los principales efectos farmacológicos de la administración de xilazina u otros agonistas α_2 -adrenérgicos. De hecho, en pacientes humanos intoxicados por la ingestión de amitraz, o en gatos inyectados vía intravenosa, la bradicardia es un hallazgo común (AÑgin et al., 2004; Andrade et al., 2007). Sin embargo, se desconoce si la aplicación tópica en dosis terapéuticas, pueda generar variaciones electrocardiográficas. Por lo tanto, el

objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos cronotrópicos y dromotrópicos de la aplicación tópica de amitraz en dosis terapéuticas en ratas anestesiadas y perros conscientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante este trabajo se respetaron las normas internacionales de ética para investigación en animales, evitando la producción de dolor o sufrimiento innecesario. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la FCV-UCV.

Protocolo 1

Se utilizaron 16 ratas Sprague-Dawley hembras entre 300 a 400 g de peso, las cuales se anestesiaron con pentobarbital sódico (30mg/kg) vía intraperitoneal. Una vez alcanzado el plano de anestesia quirúrgica, estas se bañaron con agua, y se realizó un electrocardiograma (ECG) control y luego se les aplicó el baño de inmersión con amitraz (Triatox®; 12 % v/v), en una dilución de 4 mL/L, registrándose posteriormente dos ECGs por animal cada 30 min, durante 1 h, garantizando el mantenimiento de una profundidad anestésica homogénea. De igual manera, se usó un grupo de 6 ratas anestesiadas a las cuales sólo se les aplicó el baño con agua, siendo usadas para estimar el efecto de la anestesia sobre las variables en estudio durante el tiempo de registro. Los ECGs se registraron mediante la derivación II usando electrodos subcutáneos de aguja, colocados en ambas axilas y en el apéndice xifoides (Mayo y Jamali, 1999), con un equipo EK10 (Burdick Corporation, USA). Se calculó el número de ondas R en 10 cm (velocidad del registro: 25 mm/seg) del trazado, para luego estimar la frecuencia cardíaca (FC), como indicador de cronotropismo. Al mismo tiempo, se calculó el intervalo P-R (mseg) en 6 complejos electrocardiográficos, como indicador de dromotropismo (Vega y Szabuniewicz, 1977).

Protocolo 2

En el caso de los perros, el protocolo 2 fue similar al descrito en el protocolo 1. Sin embargo, a estos caninos no se les aplicó anestesia. Doce perros mestizos de ambos sexos fueron bañados con agua, se colocaron en posición decúbito lateral derecho y se colocaron electrodos exploradores tipo "caimán"

en ambos codos y rodillas, para obtener un registro electrocardiográfico en derivación II estándar, siguiendo el protocolo descrito por Vega y Szabuniewicz (1977) en el laboratorio de la cátedra de Farmacología, FCV-UCV. Seguidamente, se aplicó un baño de aspersión con amitraz a la misma dosis que en el protocolo 1 y se realizaron dos ECGs consecutivos, cada 30 min luego de aplicado el amitraz. Los indicadores de las variables para cronotropismo y dromotropismo fueron los mismos que en el protocolo 1.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores para cada variable fueron expresados como el promedio \pm el error estándar de la media. Se obtuvieron valores controles antes de aplicar el baño con amitraz. El efecto a los 30 y 60 min luego de la aplicación cutánea de amitraz, se comparó con sus valores controles pre-tratamiento a través de la prueba de "t" de Student para datos pareados con un nivel de significancia estadística de $P < 0,05$.

RESULTADOS

La Figura 1 muestra los trazados originales de los ECGs en una rata anestesiada con pentobarbital y un perro consciente. Se denota la típica arritmia sinusal respiratoria del ECG de los perros.

En la Figura 2 se observa que la aplicación tópica de amitraz en ratas anestesiadas causó una reducción no significativa en la FC a los 30 min (control: $265,7 \pm 12,1$ lat/min vs amitraz: $234,4 \pm 13,76$ lat/min), alcanzando niveles de significación a los 60 min ($225,0 \pm 13,62$ lat/min). Simultáneamente, se observó un incremento ($P < 0,05$) en el intervalo P-R a los 30 min (control: $54,3 \pm 2,0$ mseg vs amitraz: $67,9 \pm 2,4$ mseg) y 60 min ($72,1 \pm 2,8$ mseg), luego de aplicado el baño. Se destaca que la aplicación de la anestesia con pentobarbital, permitió manipular las ratas tanto para la aplicación tópica del amitraz, como para la realización de los registros electrocardiográficos. No se observaron cambios significativos en las variables estudiadas en ratas anestesiadas con pentobarbital (Figura 3). La aplicación tópica (baños de aspersión) de amitraz en perros conscientes, no causó variaciones significativas en las variables electrocardiográficas estudiadas hasta 60 min, luego de aplicado el tratamiento (Figura 4).



Figura 1. Trazado original del electrocardiograma (ECG) control de una rata anestesiada y de un perro consciente. Ambos ECGs fueron registrados en derivación II a una velocidad de 25 mm/seg y una amplitud de 1 cm/1 mV, usando un equipo EK10, Burdick.

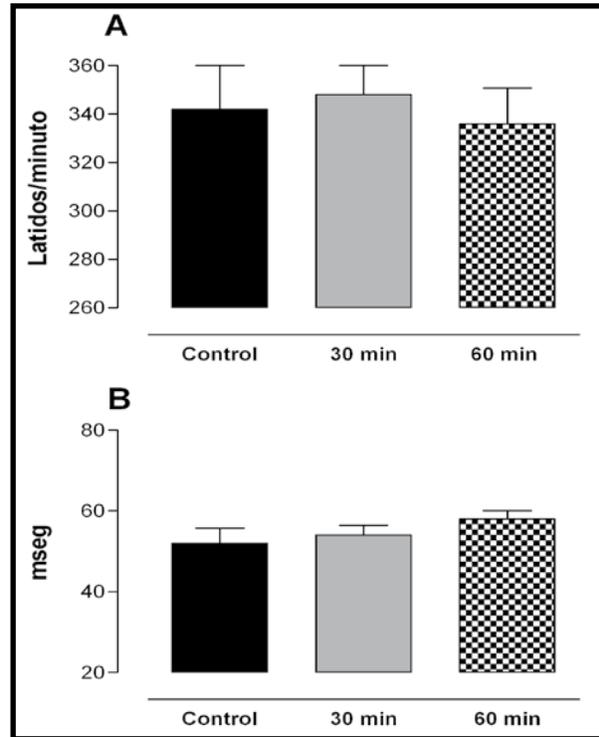


Figura 3. Variables electrocardiográficas en ratas anestesiadas (n=6) con pentobarbital sódico. A: frecuencia cardiaca (lat/min); B: intervalo P-R (mseg). * denota $P < 0,05$ vs. control.

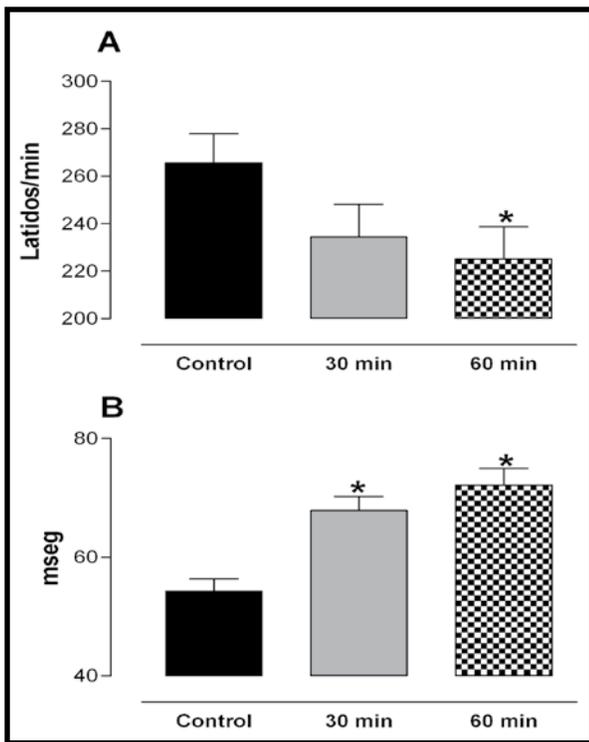


Figura 2. Efecto de la aplicación tópica de una solución comercial de amitraz (Triatox[®]) sobre algunas variables electrocardiográficas en ratas anestesiadas (n=16) con pentobarbital. A: frecuencia cardiaca (lat/min); B: intervalo P-R (mseg). * denota $P < 0,05$ vs. control

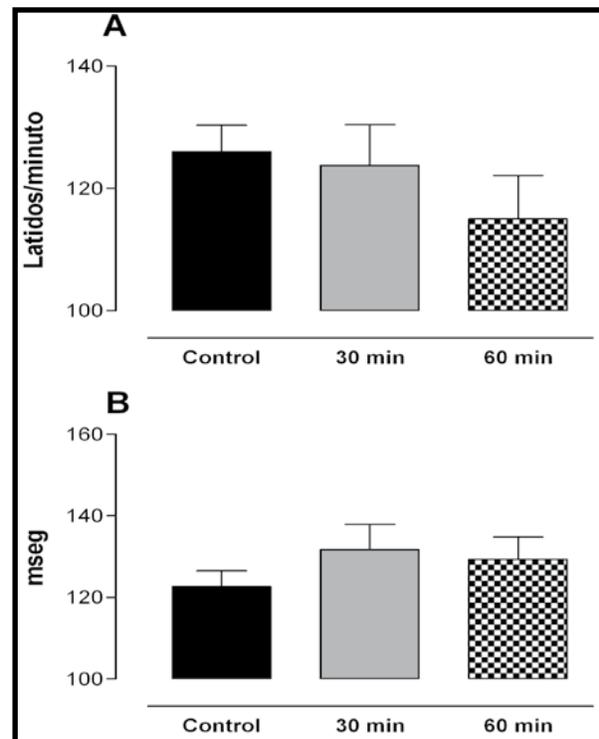


Figura 4. Efecto de la aplicación tópica de una solución comercial de amitraz (Triatox[®]) sobre algunas variables electrocardiográficas en perros conscientes (n=12). A: frecuencia cardiaca (lat/min); B: intervalo P-R (mseg). * denota $P < 0,05$ vs. control

DISCUSIÓN

Los efectos dromotrópicos y cronotrópicos negativos producidos por la aplicación tópica de la solución de amitraz en ratas, coinciden con los efectos cardiovasculares reportados en humanos expuestos en fumigaciones con chlordimeform en aerosol (Zhou *et al.*, 1999). El chlordimeformo es una formamidina con una estructura química similar al amitraz, por lo cual existe la posibilidad que la exposición cutánea al amitraz pueda generar efectos depresores cardiovasculares similares al chlordimeform. Sin embargo, la administración intravenosa de amitraz en ratas anestesiadas con éter, produjo bradicardia y midriasis, sin que el chlordimeform produjera efectos similares (Hsu y Kakuk, 1984). En el mismo reporte, se demuestra que la midriasis y la bradicardia asociadas al amitraz son producto de una acción agonista sobre receptores α_2 -adrenérgicos post-sinápticos y pre-sinápticos, respectivamente (Hsu y Kakuk, 1984).

Existen evidencias bioquímicas que sustentan la hipótesis de que los receptores α_2 -adrenérgicos representan blancos importantes para los efectos nerviosos de las formamidinas, como el amitraz (Costa *et al.*, 1988; Andrade *et al.*, 2006). Los efectos dromotrópico y cronotrópico negativos observados en este ensayo en ratas anestesiadas, son similares a los observados en gatos intoxicados en forma experimental con amitraz vía intravenosa (Andrade *et al.*, 2007), en los cuales se registraron bradicardia sinusal y bloqueos aurículo-ventriculares de primer grado. La administración de xilazina (agonista de receptores α_2 -adrenérgicos) en perros, frecuentemente se asocia a bradicardia y bloqueos aurículo-ventriculares de segundo grado (Martinez, 1986; Vega, 1996). En este experimento, se observó un bloqueo aurículo-ventricular de primer grado, tipificado por la prolongación del intervalo P-R, lo cual sugiere el retardo en la conducción aurículo-ventricular (Szabuniewicz y Vega, 1977).

Los mecanismos capaces de generar los efectos cronotrópicos y dromotrópicos negativos asociados a la administración del amitraz en mamíferos, aún no han sido determinados. Considerando las evidencias que sugieren al amitraz como un agonista de receptores α_2 -adrenérgicos, parte de los efectos observados en este trabajo podrían explicarse por la acción post-sináptica sobre los receptores α_2 -adrenérgicos en

el músculo liso vascular, lo cual incrementaría la resistencia periférica total y la presión arterial. En esta situación, la respuesta autonómica vía refleja se traduciría en el desarrollo de bradicardia a través de la reducción del tono simpático central. Adicionalmente, una acción agonista sobre receptores α_2 -adrenérgicos pre-sinápticos podría reducir el tono simpático a nivel del sistema nervioso central, al inhibir la liberación de norepinefrina en el componente pre-sináptico, o posiblemente al ejercer un efecto periférico similar sobre la neurona eferente efectora simpática en el corazón. Cualquiera de estos posibles mecanismos se traduciría en un tono parasimpático más elevado, lo cual implicaría una acción colinérgica muscarínica con una subsiguiente depresión de la pendiente de despolarización en fase 4 del potencial de acción de las fibras del sistema de conducción del corazón, traduciéndose a su vez en bradicardia y reducción de la conducción cardiaca. Sin embargo, la posibilidad de una acción directa sobre las fibras musculares cardiacas no puede ser descartada.

La potencial explicación de los posibles mecanismos que subyacen la acción del amitraz sobre el cronotropismo y dromotropismo cardiacos, se complica aún más al considerar que el amitraz podría bloquear, aunque con reducida potencia, la enzima acetilcolinesterasa, a través de un mecanismo similar al de los carbamatos (Clayton y Macphail, 1989). Esta acción se implicaría en un efecto parasimpaticomimético que explicaría y potenciaría el desarrollo de bradicardia. A pesar que en este ensayo no se midieron los niveles plasmáticos de amitraz luego de su administración tópica, los resultados sugieren que durante el baño de inmersión con una solución comercial de amitraz, se absorbe una concentración capaz de generar cambios en los niveles basales de los indicadores electrocardiográficos evaluados en ratas anestesiadas.

En contraste con el efecto descrito anteriormente en ratas anestesiadas, la aplicación de amitraz a la dosis recomendada por el fabricante en perros conscientes, no se tradujo en alteraciones significativas en las variables electrocardiográficas estudiadas. Sólo 1 de 12 perros evaluados mostró una bradicardia equivalente a una reducción del 50% de la FC, con signos evidentes de depresión y letargia. Pareciera que la administración tópica de amitraz a dosis terapéuticas en perros aparentemente sanos, no es capaz de causar una absorción cutánea del fármaco que eleve las

concentraciones plasmáticas y cause alteraciones en las variables cronotrópicas o dromotrópicas estudiadas. Se ha reportado que la administración oral del amitraz en perros causa bradicardia, hipotensión, sedación, poliuria, hipotermia e hiperglucemia (Hugnet *et al.*, 1996). El objetivo de la presente investigación fue determinar la potencial generación de efectos cardiovasculares colaterales a través del uso del amitraz en dosis terapéuticas usando la vía de administración tópica recomendada. Los resultados obtenidos sugieren que el amitraz no causa cambios electrocardiográficos al administrarse vía tópica en perros aparentemente sanos. Sin embargo, se requiere de más investigaciones para determinar si la aplicación terapéutica de amitraz podría causar efectos colaterales cardiovasculares en perros con dermatitis asociada a infestación por ácaros o garrapatas.

La diferencia de los efectos observados entre las dos especies usadas en este estudio, podría explicarse simplemente por la variabilidad entre especies, lo cual ratificaría las limitaciones al extrapolar resultados de modelos animales entre diferentes especies. Al mismo tiempo, estas diferencias podrían asociarse a la potencial capacidad de absorción cutánea entre las especies estudiadas. Por otro lado, el hecho de haber usado anestesia en las ratas, probablemente permitió reducir la magnitud de las respuestas autonómicas reflejas ante los posibles cambios hemodinámicos asociados a la administración tópica del amitraz y su acción sobre receptores α_2 -adrenérgicos post o pre-sinápticos. En el caso de los perros en los cuales la evaluación se realizó sin aplicar ningún agente anestésico, existe la posibilidad que, absorbiéndose una cantidad suficiente de amitraz a través de la piel, las respuestas autonómicas moduladoras reflejas podrían haber influenciado las variables estudiadas para no observarse cambios importantes en la muestra sometida al estudio.

En conclusión, la utilización del amitraz bajo un régimen terapéutico adecuado, pareciera no influenciar el cronotropismo y dromotropismo cardiaco en perros aparentemente sanos. Sin embargo, las evidencias obtenidas en ratas anestesiadas, sugieren que ciertamente existe la posibilidad que al aplicar amitraz en forma tópica, se produzcan efectos cronotrópicos y dromotrópicos negativos, similares a los reportados para agonistas de receptores α_2 -adrenérgicos. Futuras investigaciones se centrarán en establecer los posibles

mecanismos de acción de los efectos del amitraz aplicado en forma tópica en ratas.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a la división de Salud Animal de la compañía farmacéutica Schering Plough, por haber facilitado el amitraz y algunos insumos para la realización de estos experimentos. Al mismo tiempo, agradecemos el apoyo prestado por el Ing. Martin Camacaro, al facilitar el uso de sus mascotas (caninos) durante la realización de esta experiencia.

REFERENCIAS

- AAgin, H.; ÖCalkavur, Ö.; Uzun, H.; Bak, M. 2004. Amitraz Poisoning: Clinical and Laboratory Findings. *Indian Pediatrics.*, 41:492-495.
- Andrade, S.F.; Sakate, M.; Laposy, C.B.; Sangiorgio, F. 2006. Yohimbine and atipamezole on the treatment of experimentally induced amitraz intoxication in cats. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 4:200-208.
- Andrade, S.F.; Sakate, M.; Laposy, C.B.; Valente, S.F.; Bettanim, V.M.; Rodrigues, L.T.; Marcicano, J. 2007. Effects of experimental amitraz intoxication in cats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59:1236-1244.
- Clayton, M.; Macphail, R. 1989. Investigations of amitraz neurotoxicity in rats III. Effects on motor activity and inhibition of monoamine oxidase. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 12: 12-22.
- Costa, L.; Olibet, G.; Murphy, Sh. 1988. Alpha2-adrenoceptors as a target for formomidine pesticides: in vitro and in vivo studies in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 93:319-328.
- Hsu, W.; Kakuk, Th. 1984. Effect of amitraz and chlordimeform on heart rate and pupil diameter in rats: mediated by α_2 -adrenoceptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 73:411-415.
- Hugnet, C.; Buronrosse, F.; Pineau, X.; Cadoré, J.L.; Lorgue, G.; Berny, P.J. 1996. Toxicity and kinetics of amitraz in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 57:1506-1510.
- Martinez, A. 1986. Un análisis sobre la acción de la Xilacina (Rompum®) en la hemodinamia cardiovascular en perros. Trabajo de Ascenso. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. pp. 1-43.
- Mayo, P.; Jamali, F. 1999. Methoxyflurane anesthesia augments the chronotropic and dromotropic effects of verapamil. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 2:30-35.
- Mundel, A. 1996. Demodicosis. En: Manual Clínico de Pequeñas Especies (S. Birchard y R. Sherding,

- eds.). Interamericana. McGraw-Hill. Mejiro. pp. 348-353.
- Shin, D.; Hsu, W. 1994. Influence of the formamidine pesticide amitraz and its metabolites on porcine myometrial contractibility: involvement of α_2 -adrenoceptors and Ca^{++} channels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 128:455-49.
- Szabuniewicz, M.; Vega, F. 1977. La electrocardiografía en clínica veterinaria. II parte: El electrocardiograma anormal. *Rev. Fac. Cs. Vets., UCV.*, 27:151-174.
- Tarallo, V.; Lia, R.; Sasanelli, M.; Cafarchia, C.; Otranto, D. 2009. Efficacy of Amitraz plus Metaflumizone for the treatment of canine demodicosis associated with *Malassezia pachydermatis*. *Parasit. Vectors.*, 2:13.
- Vega, F. 1996. Efecto de dosis crecientes de hidrocloreto de Xilacina (Rompum®) sobre las variables presión arterial, fuerza de contracción y contractilidad miocárdica, en perros reserpinizados y vagotomizados. Trabajo de Ascenso. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. pp. 5-98.
- Vega, F.; Szabuniewicz, M. 1977. La electrocardiografía en clínica veterinaria. I parte: Aspectos normales del electrocardiograma. *Rev. Fac. Cs. Vets., UCV.*, 27:79-102.
- Zhou, Z.; Xue, Sh.; Hu, Y.; Wu, H. 1999. Effect of chlordimeform on cardiovascular function in occupational exposures. *J. Occup. Health.*, 41:59-61.