

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Fisiología Animal



**EFFECTOS DE LA ANESTESIA INHALATORIA SOBRE
LA RESPUESTA ORGÁNICA Y LA FUNCIÓN ADRENAL
EN EL CONEJO NZW**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Alfredo González Gil

Bajo la dirección del Doctor:

Juan Carlos Illera del Portal

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2681-X

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA ANIMAL**



**EFFECTOS DE LA ANESTESIA INHALATORIA SOBRE
LA RESPUESTA ORGÁNICA Y LA FUNCIÓN ADRENAL
EN EL CONEJO NZW**

TESIS DOCTORAL

**ALFREDO GONZÁLEZ GIL
2004**

**“EFECTOS DE LA ANESTESIA
INHALATORIA SOBRE LA
RESPUESTA ORGÁNICA Y LA
FUNCIÓN ADRENAL EN EL CONEJO NZW”**

MEMORIA presentada para la colación
del Grado de Doctor, por el Licenciado
en Veterinaria Don Alfredo González Gil

ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA
BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Prof. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal

Licenciado Don Alfredo González
Gil, aspirante al grado de Doctor
en Veterinaria

Madrid, Febrero, 2004

AGRADECIMIENTOS

Aún a riesgo que quede por citar alguna de las personas que han contribuido en la realización de este trabajo quiero agradecer profundamente a:

- A mi director de Tesis, Prof. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal, por sus conocimientos y experiencia aportados, y por poner a mi disposición los medios para realizar esta Tesis.

- Al Ilmo Prof. Dr. D. Mariano Illera Martín, porque sus buenos y valiosos consejos siempre perdurarán en mí y porque su dedicación al trabajo ha supuesto un ejemplo a seguir para cualquier investigador.

- A la Prof. Dra. Dña. Gema Silván Granado, por su gran ayuda en la realización de la técnica ELISA.

- A Maria del Mar, a Rosana y a Fernando, por su ayuda en los momentos más difíciles de la Tesis, y a todos mis compañeros de Departamento.

- A Rafael Cediél por sus valiosísimos consejos sobre anestesia y por la ayuda prestada, y a Ana Nieto, Laura Peña, Eugenio Jiménez y Pedro por su colaboración y ayuda.

- A mis padres y a mi hermano, por soportar mis nervios.

- Y, por supuesto, a Beatriz, por su paciencia demostrada en todo momento y por dejarme tiempo para la realización de esta Tesis.

ACRÓNIMOS

α: Alfa – *Alfa* (alfabeto griego)

ACTH: Adrenocorticotrophic Hormone - *Hormona adrenocorticotropa*

a.m.: ante meridiem - *antes del mediodía*

AMPA: Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid - *Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-4-propionato*

ANOVA: *Análisis de la varianza*

ARNm: Ribonucleic Acid messenger – *Ácido ribonucleico mensajero*

ATP: Adenosine Triphosphate – *Trifosfato de adenosina*

AVP: Arginine vasopressin – *Arginina vasopresina*

β: Beta – *Beta* (alfabeto griego)

BSA: Bovine Serum Albumine - *Albúmina sérica bovina*

CAM: Minimum alveolar concentration - *concentración alveolar mínima*

CEE: *Comunidad Económica Europea*

CEEA: *Comité de Ética de Experimentación Animal*

cm: Centimetre - *Centímetro(s)*

CRH: Corticotrophin Releasing Hormone - *Hormona liberadora de corticotropina*

D.C.I.: *Denominación Común Internacional*

EEG: Electroencephalogram - *Electroencefalograma*

EIA: Enzyme-immuno Assay - *Enzimo inmunoanálisis*

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay - *Análisis enzimático ligado a un inmunoabsorbente*

esm: Standard Error - *Error estándar de la media*

FDA: Food and Drug Administration – *Administración de alimentos y drogas*

G: Gauge - *Graduada*

g: Gram - *Gramo(s)*

GABA: Gamma-hydroxybutyric acid - *Ácido gamma-hidroxibutírico*

GMP: Guanosin 5'-monophosphat - *Guanosina 5-monofosfato*

h: Hour - *Hora(s)*

HHA: Hypothalamic-hypophyseal-adrenal - *Eje hipotálamo hipófisis adrenal*

HPLC: High Performance Liquid Chromatography - *Cromatografía líquida de alta resolución*

HT: Hydroxytryptamine - *Hidroxitriptamina*

l: Liter - *Litro(s)*

IRC: *Instalación Radiactiva Central*

IRMA: Immunoradiometric Assay - *Análisis inmunoradiométrico*

KBq: Kilo-Becquerel (*desintegraciones por segundo*)

kg: Kilogram - *Kilogramo(s)*

M: Molar - *Molar*

mg: Miligram - *Miligramo(s)*

min: Minute - *Minuto(s)*

ml: Mililiter - *Mililitro(s)*

μCi: Microcuries – *Microcurio(s)*

μl: Microliter - *Microlitro(s)*

mm: Milimetre - *Milimetro(s)*

mV: Milivolt - *Milivoltio(s)*

ng: Nanogram - *Nanogramo(s)*

nm: Nanometre - *Nanometro(s)*

NMDA: N-methyl-D-aspartate – *N-metil-D-aspartato*

NPV: Paraventricular Núcleus - *Núcleo paraventricular*

NZW: New Zealand White - *Blanco de Nueva Zelanda*

Pa: Arterial Pressure - *Presión arterial*

pg: Picogram - *Picogramo(s)*

POD: Horseradish peroxidase – *peroxidasa del rábano*

PSI: Pounds per Square Inch - *Libras por pulgada cuadrada*

RD: *Real Decreto*

RIA: Radio Immuno Assay - *Radio inmuno análisis*

r.p.m.: Revolutions per Minute - *Revoluciones por minuto*

SAS: Statistical Analysis System - *Sistema de análisis estadístico*

seg: Second - *Segundo(s)*

SNA: Autonomic Nervous System - *Sistema Nervioso Autónomo*

SNC: Central Nervous System - *Sistema Nervioso Central*

TMB: Timidil Benzidine - *Timidilbencidina*

U.C.M.: *Universidad Complutense de Madrid*

USA: United States of America - *Estados Unidos de América*

CONTENIDO

JUSTIFICACIÓN	13-17
INTRODUCCIÓN	18-71
1. HISTORIA DE LA ANESTESIA.	19-24
2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANESTÉSICOS GENERALES.	25-29
3. FUNDAMENTOS DE LA ANESTESIA.	30-52
3.1. Concepto y tipos de anestesia.	
3.2. Etapas de la anestesia general.	
3.3. Anestesia inhalatoria.	
3.3.1. Principios básicos de la anestesia inhalatoria.	
3.3.2. Propiedades del anestésico inhalatorio ideal.	
3.3.3. Clasificación de los anestésicos inhalatorios.	
3.3.4. Ventajas e inconvenientes de la anestesia inhalatoria.	
3.3.5. Anestesia inhalatoria en el conejo.	
4. FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS.	53-68
4.1. Concepto de estrés.	
4.2. Rutas del estrés.	
4.3. Bases neurofisiológicas del estrés.	
4.3.1. Activación neurológica central.	
4.3.2. Activación autónoma	
4.3.3. Activación neuroendocrina.	
4.3.4. Serotonina y estrés.	
5. INFLUENCIA DE LA ANESTESIA SOBRE EL ESTRÉS.	69-71

MATERIAL Y MÉTODOS	72-112
1. ANIMALES.	73-75
2. PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN.	75-85
3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS Y MODOLOGÍA UTILIZADA.	85-112
3.1. Evaluación de la profundidad anestésica, de la función cardio-respiratoria y de la temperatura rectal.	
3.2. Determinación de las concentraciones de ACTH.	
3.3. Determinación de las concentraciones de corticosterona y cortisol.	
3.4. Determinación de las concentraciones de epinefrina y norepinefrina.	
3.5. Determinación de las concentraciones de serotonina.	
3.6. Análisis estadístico de los resultados.	
RESULTADOS	113-162
DISCUSIÓN	163-208
RESUMEN	209-212
SUMMARY	213-216
CONCLUSIONES	217-219
BIBLIOGRAFÍA	220-245

JUSTIFICACIÓN

El manejo de los animales se ve en ocasiones dificultado por el carácter nervioso e incluso agresivo, de forma que se hace necesaria la contención de éstos por métodos farmacológicos, tanto para intervenciones quirúrgicas mayores como menores, así como en inmobilizaciones para realizar determinados procedimientos diagnósticos como radiografías, endoscopias, etc.

Numerosos trabajos han tratado la acción de distintos anestésicos sobre la función cardiovascular y pulmonar. Aún considerando estas funciones como primordiales a la hora de valorar un procedimiento anestésico, creemos que conviene profundizar, aún más, en el conocimiento de los distintos anestésicos y acercarnos más a ese anestésico ideal que nos permita lograr el mayor bienestar animal, reduciendo al mínimo el estrés de los animales de experimentación. Pensamos que es escasa la bibliografía existente a este respecto, por lo que consideramos que es necesario conocer la posible influencia de determinados anestésicos sobre la función adrenal.

Por otra parte, también son escasos los trabajos realizados sobre los efectos de la anestesia en el conejo, especie que consideramos de gran importancia en la investigación y que pensamos, no se le ha asignado la relevancia que requiere. Además, es un animal que presenta especiales dificultades durante el proceso anestésico como es su difícil intubación debido a sus particularidades anatómicas, su estrecho margen entre el nivel de anestesia quirúrgica y la parada respiratoria, la gran variación de respuesta entre individuos de la misma especie, etc.

Nuestra justificación se deriva de las necesidades que implica la anestesia en estos animales.

- Por un lado tenemos las necesidades de tipo humanitario (ético), en el cual se busca el mayor bienestar posible del animal, evitando, en

lo que se pueda, la percepción del dolor, sufrimiento y el estrés en el animal de laboratorio. Con el fin de evaluar una posible reacción de estrés, se han seleccionado una serie de parámetros de los que pueden dar una idea aproximada de esta reacción. En primer lugar, para evaluar la reacción del eje hipotálamo-hipófisis-corticoadrenal, hemos seleccionado como parámetros, la hormona adrenocorticotropa o ACTH, indicándonos la activación de la hipófisis por el estrés y los glucocorticoides corticosterona, principalmente, y cortisol, para evaluar la activación de la corteza adrenal. En segundo lugar, para monitorizar la respuesta de la médula adrenal, se evaluaron las concentraciones séricas de las catecolaminas, epinefrina y norepinefrina. Finalmente, también hemos decidido medir las concentraciones séricas de serotonina, ya que como se ha visto en los últimos años está directamente relacionada con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Además, con el fin de conocer la respuesta orgánica a los anestésicos, evaluamos la frecuencia cardíaca y respiratoria, la temperatura rectal y distintos reflejos para comprobar el nivel de anestesia alcanzado.

- Por otro lado, necesidades de tipo legal: un principio que es reconocido en la legislación europea y nacional. Así, la Directiva del Consejo 86/609/CEE, aprobada el 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, pretende garantizar que se les conceda un trato que evite al máximo el dolor, el sufrimiento, el estrés o la lesión prolongados innecesariamente. El Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo obliga al uso de anestesia en sus diversas variantes (local, general, analgesia) en los animales utilizados para experimentación y otros

fines científicos, siempre y cuando ésta no sea más traumática para el animal que el experimento en sí.

- Por último, existe una necesidad de eficiencia técnica, puesto que la mayoría de los procedimientos experimentales únicamente es posible llevarlos a cabo con el animal inmóvil e inconsciente.

En estudios previos realizados en el Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, U.C.M., hemos investigado la influencia de la anestesia inyectable sobre la función adrenal en el conejo. Pensamos que es necesario ampliar estos conocimientos e investigar la influencia, en este caso, de la anestesia inhalatoria sobre esa función adrenal.

Como anestésicos inhalatorios, empleamos aquellos más frecuentemente utilizados en el conejo, aunque también en muchas otras especies. Los anestésicos inhalatorios elegidos para nuestro trabajo fueron el halotano (Fluothane®) y el isoflurano (Forane®).

Por último, indicar que para la evaluación de los distintos parámetros hormonales, las técnicas empleadas fueron las siguientes: EIA de Competición, para corticosterona, cortisol, epinefrina, norepinefrina y serotonina, y RIA para la medición de los niveles de ACTH. Estas técnicas, consideramos que, permiten medir eficazmente las concentraciones de dichas hormonas, siendo además un método económico, fiable y versátil.

En resumen, podemos afirmar que los objetivos fundamentales de este experimento fueron los siguientes:

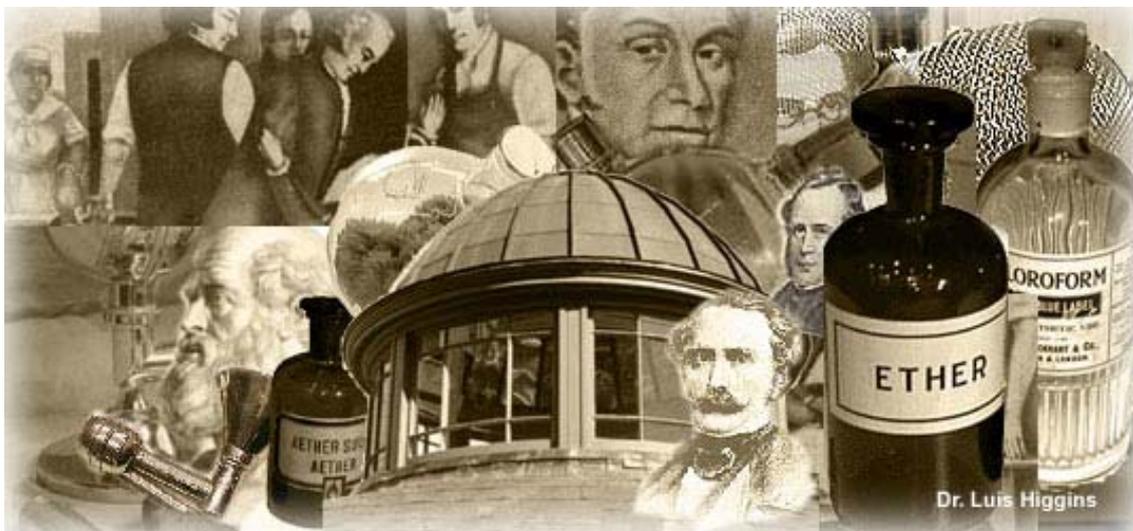
- Ayudar a la búsqueda de un mejor y más seguro protocolo de anestesia y del anestésico de elección, en una especie con particulares dificultades anestésicas, pero fundamental en la experimentación animal, como es el conejo.

- Evaluar la respuesta orgánica en el conejo a la administración de dos de los anestésicos inhalatorios más empleados en esta especie, como son el halotano y el isoflurano.
- Investigar la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-corticoadrenal a la administración de estos dos anestésicos inhalatorios.
- Comprobar la posible relación de los niveles de serotonina en sangre con la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.
- Evaluar la respuesta de la médula adrenal a estos anestésicos, conociendo de esta manera la respuesta del Sistema Nervioso Autónomo.
- Acercarnos más a ese bienestar animal, mediante la evaluación de determinados parámetros que nos permitan conocer la respuesta estresante de los animales a la anestesia, durante la inducción, el mantenimiento y la recuperación de la misma.
- Contribuir al conocimiento de los mecanismos de acción de la anestesia inhalatoria.

INTRODUCCIÓN

1. HISTORIA DE LA ANESTESIA

El rápido desarrollo del mundo moderno ha llevado al hombre a la permanente búsqueda de respuestas científicas en todos los órdenes. Se buscan respuestas que permitan combatir, neutralizar o superar muchas enfermedades. Igualmente, la búsqueda de nuevos fármacos que contribuyen a ese propósito, es incesante. Y en ese marco, las acciones médicas quirúrgicas demandan nuevos fármacos anestésicos que hagan dicha actividad más segura y efectiva.



La anestesia como Ciencia y como Práctica tiene el objetivo principal de que el paciente sea intervenido quirúrgicamente con éxito. Se debe asegurar el “plano ideal para operar”, que implica que el paciente “esté sedado, con analgesia, con anestesia, con relajación muscular y un control neuroendocrino”. Dicho control significa la existencia de condiciones donde no hay liberación de sustancias vasoactivas producidas por el estrés operatorio. Se busca el anestésico ideal que cumpla con determinados requisitos. Según Chavarría (1999), este ideal de anestesia es el que poco a poco comienza a forjarse y de la que seguramente será testigo el nuevo siglo y sus habitantes.

En las últimas décadas se han logrado niveles de conocimientos suficientes para contemplar el apasionante capítulo de los fármacos activos sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) con perspectivas bien distintas a las de hace unos años, pues son tantos los datos disponibles y tan importantes los hallazgos, que bien podemos decir que la cosecha de problemas resueltos es muy grande, pero todavía promete ser mayor. En la búsqueda incesante de principios activos no ha habido una línea de continuidad, sino más bien altibajos muy pronunciados (Esplugues, 1981). Recordaremos los hechos más significativos basándonos en los datos históricos indicados por Lumb y Jones (1981) y otros autores:

Los primeros intentos efectuados para producir anestesia parece que se llevaron a cabo en la especie humana. Aparentemente, las ventajas para su utilización en animales no fueron reconocidas.

Hacia el 3000 a.C., los asirios conocían un método eficaz para causar "anestesia", aunque no exento de peligro, comprimiendo la carótida a nivel del cuello con la consiguiente isquemia cerebral y la aparición de un estado comatoso, lo cual era aprovechado para la cirugía. En las civilizaciones ribereñas del Tigris y del Eúfrates comenzaron a usarse algunos vegetales de efecto narcótico, como la adormidera, la mandrágora y el *cannabis indica*, que se cultivaban en Persia o en la India. Del 3000 al 1000 a.C., a los niños del antiguo Egipto se les administraba adormidera por las noches para que dejaran descansar a sus padres. Existe constancia documental de que los sacerdotes médicos del antiguo Egipto realizaron intervenciones difíciles, como trepanaciones craneales en cirugía humana y cirugía intra-abdominal en animales domésticos como en los équidos, y que en ellas utilizaban bebidas alcohólicas y opio para paliar el dolor (Orden *et al.*, 1996). En otras civilizaciones antiguas como la china, además de la acupuntura, se describe la utilización de la marihuana para producir inconsciencia y evitar el dolor.

Pero en estas culturas antiguas y en las tribus primitivas actuales de Oceanía, Sudamérica e incluso de África, no sólo se sirven de diversas drogas para paliar o evitar el dolor, sino que emplean métodos físicos para conseguir insensibilizaciones temporales, tales como: la asfixia controlada; la conmoción cerebral, golpeando un cuenco de madera colocado sobre la cabeza, con lo que se produce más de un accidente mortal; la compresión de los nervios superficiales de las extremidades para producir pérdida de sensibilidad en las porciones distales; frío; derivación del dolor, etc. (Orden *et al.*, 1996).

En el 460-377 a.C., Hipócrates usa la "esponja soporífera", impregnada con una preparación de opio, beleño y mandrágora.

El origen primario de la palabra anestesia en su significado moderno corresponde a Dioscórides, médico griego, en el año 50. Al describir los efectos de la mandrágora empleó la palabra exactamente como se usa en la actualidad.

En 1540, Paracelso produjo éter y encontró que tenía un efecto soporífero en las aves. A pesar de esto, no se progresó más hasta que se desarrolló la química y el dióxido de carbono (Black, 1754) y fueron descubiertos otros gases, incluyendo el oxígeno (Priestley, 1770-1780). En 1800, Sir Humphrey Davy sugirió que el óxido nitroso pudiera tener propiedades anestésicas. Poco tiempo después, Hickman (1824) demostró, por medio de la experimentación en los animales, que el dolor de la operación quirúrgica podría ser aliviado por la inhalación del dióxido de carbono. A pesar de esto, no fue hasta 1842 cuando se empleó el éter para producir anestesia en el hombre, tanto por Clarg como por Long, separados por dos meses de diferencia. Sin embargo, este descubrimiento no fue ampliamente publicado, y el empleo de éter no se generalizó hasta que Morton indujo la anestesia con éter en una persona, en 1846.

Entre tanto, el Dr. Horace Wells (1844) descubrió las propiedades anestésicas del óxido nitroso. Hasta 1850, los médicos veterinarios tenían que confiar mucho en la capacidad de soporte del dolor de los animales. Los procedimientos quirúrgicos se efectuaban muy pocas veces y eran raramente exitosos y, sobre todo, muy angustiosos y dolorosos para los pacientes. Las herramientas básicas utilizadas en esa época como preanestesia por los cirujanos veterinarios, nos muestran las dificultades que éstos tuvieron que afrontar.

A pesar de que el cloroformo fue descubierto por Liebig en 1831, no fue hasta 1847 cuando se empleó para la anestesia general en animales por Fluorens y, en el hombre, por el Dr. Simpson. Estas primeras intervenciones se caracterizaron por el uso de anestesia por inhalación y los equipos que se usaron constaban de: una máscara de cuero conectada a un tubo de acero que a su vez era enroscado a un recipiente que tenía una válvula. Este estaba marcado con medidas en mililitros que se ajustaban a las necesidades del animal.



En unas pocas semanas, el cloroformo casi había desplazado al éter como anestésico general en muchas instituciones.

En 1875, Ore publicó la primera monografía de la anestesia intravenosa utilizando el hidrato de cloral. Las distintas vías de administración de anestésicos generales a los animales fueron establecidas a finales del siglo XIX.

Después del aislamiento inicial de la cocaína por Albert Niemann en 1860, Anrep, en 1878, sugirió la posibilidad de utilizar la cocaína para anestesia local después de inyectarse él mismo en el brazo una solución débil. En 1898 August Bier produjo verdadera anestesia espinal en animales.

Mientras que el empleo de anestesia por infiltración (infiltración de un anestésico en la zona quirúrgica) fue fomentado por Reclus en 1890, y Schleich en 1892, la anestesia por conducción (inyección de un anestésico local en el trayecto de uno o varios nervios) fue introducida por Halstead y Hall en 1884. Estas técnicas se hicieron más populares con la introducción de sustitutos de la cocaína tóxica al terminar el siglo. Con estos avances fue posible la inducción de la anestesia subaracnoidea en caballos, ganado y perros por Cuille y Sendrail (1901). Mientras que Cathelin (1901) describió el uso de la anestesia epidural en el perro, Retzgen, Benesch y Brook aplicaron las técnicas de la anestesia epidural en grandes animales en 1920. A pesar de que la anestesia paralumbar fue introducida en el hombre por Sellheim en 1909, no fue hasta la década de los cuarenta cuando Farquharson y Formston desarrollaron estas técnicas en el ganado.

La anestesia general en pequeños animales domésticos se tornó más común después de la introducción de los barbitúricos, a finales de los años veinte y, en particular, con el desarrollo y la introducción del pentobarbital sódico en 1930. La anestesia barbitúrica recibió un impulso adicional con la introducción de los tiobarbitúricos y, en forma especial, con el tiopental sódico en 1934. El desarrollo de la anestesia de los grandes animales tuvo que esperar a la introducción de agentes preanestésicos, tales como los derivados de la fenotiacina, por Charpentier, en 1950.

En años recientes, los hidrocarburos fluorados han revolucionado la anestesia por inhalación en la práctica veterinaria, tanto en pequeñas como en grandes especies. En 1956, Johnson utilizó en clínica el halotano y 3 años más tarde Artusio y Van Poznak emplearon el metoxifluorano. Eger, en 1961,

introduce el concepto de "concentración alveolar mínima" (CAM). Terrel sintetiza el enflurano, en 1963, y el isoflurano, en 1965. En 1966 se hace el primer uso clínico del enflurano. En 1980, la FDA (Food and Drugs Administration) aprueba el uso en los Estados Unidos del isoflurano. Los estudios clínicos de este halogenado se habían iniciado en 1970, pero tardó en salir al mercado por los problemas de carcinogénesis que se habían obtenido de él. En 1981 ya se comenzó a utilizar isoflurano en clínica. Finalmente, desde 1992, se utiliza el desflurano.

De igual manera, la anestesia parenteral se ha visto desarrollada en los últimos años con la aparición de anestésicos disociativos, como la ketamina con distintas combinaciones de fármacos que permiten reducir las dosis de anestésicos, o con nuevos anestésicos, como el propofol, etc.

Por último, el objetivo de lograr un mayor bienestar animal, está potenciando aún más la búsqueda de un anestésico que cumpla con la mayor parte de los requisitos del anestésico ideal y que cause el menor trastorno posible en los pacientes.

2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANESTÉSICOS GENERALES

Para llevar a cabo intervenciones quirúrgicas en animales, debe suprimirse por completo la percepción de dolor. Esto puede conseguirse tanto mediante anestesia general, que produce pérdida de conciencia, como con anestesia local o regional.

Algunos anestésicos causan una estimulación y activación excesiva en el cerebro durante la inducción de la anestesia, pero la gran mayoría de los anestésicos reducen y detienen la actividad eléctrica en el cerebro, disminuyendo el consumo de oxígeno del mismo. Esta propiedad caracteriza a los agentes anestésicos como depresores del SNC (Steffey, 1995).

Durante décadas se ha investigado el mecanismo de acción de los anestésicos, sin que se haya encontrado todavía una explicación satisfactoria para todas esas sustancias. Por ello, existen diversas teorías que aportan elementos válidos, demostrables hasta cierto grado y que permiten partir de hechos sólidos de carácter científico. Resulta muy probable que el mecanismo de acción de los anestésicos se fundamente, parcial o completamente, en algunos elementos de las explicaciones que se ofrecen seguidamente.

Si buscáramos una hipótesis unitaria al respecto del mecanismo de acción de los anestésicos generales, no la encontraríamos en la acción de éstos sobre la transmisión sináptica. Según los datos hasta ahora acumulados, la teoría al respecto de la deformación de las biomembranas a través de la expansión, los cambios volumétricos y la fluidificación parece explicar mejor el mecanismo de acción de los agentes anestésicos (Booth y McDonald, 1988). Las distintas estructuras químicas de los anestésicos son un problema cuando se intenta establecer una teoría de acción común.

Por otro lado, una característica físico-química de los anestésicos inhalatorios es su solubilidad lipídica, una propiedad que se correlaciona con la

potencia anestésica. Esta correlación es conocida como **Teoría de las correlaciones** ó Teoría de Meyer y Overton. En 1900 Meyer y Overton informaron, independientemente, de sus investigaciones acerca de las propiedades físicas y químicas de cientos de compuestos con variado efecto depresivo sobre el SNC. Overton y Meyer sostuvieron que para que un fármaco sea anestésico habrá de ser soluble en ambas fases: acuosa y lipídica y cuanto mayor sea su solubilidad lipídica mayor será su potencia anestésica. Esto es parcialmente cierto, pues sí existe dicha correlación, pero no todas las sustancias liposolubles son anestésicos (Sumano y Ocampo, 1997). Se piensa que su presencia distorsiona la estructura de la membrana, lo que causa oclusión de los poros a través de los cuales pasan iones (también es llamada *teoría de expansión de la membrana*) (Steffey, 1995). Los datos acerca de los primeros anestésicos volátiles, éter y cloroformo, encajaban convenientemente en estas hipótesis, pero hoy en día existen muchas objeciones a la teoría de Meyer y Overton. En primer lugar, muchos compuestos muestran efectos de desestabilización de membrana similares a los anestésicos pero que no son tales. En segundo lugar, muchos anestésicos están presentados como enantiómeros y muestran una gran selectividad en su potencia; sin embargo, esta selectividad no está reflejada en su coeficiente de partición de membrana (Thompson y Wafford, 2001).

En 1961, Pauling y Miller introdujeron, de forma independiente, las teorías moleculares sobre la anestesia general (**Teoría de los hidratos cristales hidratados o clatratos**). En ella, advirtieron que podría existir algún tipo de relación entre los anestésicos y áreas cerebrales específicas. La teoría de Pauling y Miller afirma que moléculas sencillas se unen, mediante puentes de hidrógeno, como resultado de fuerzas dipolares instantáneas, formándose clatratos, celdas o enrejados y ocupándose sus cavidades o intersticios por otras moléculas, como gas o anestésicos volátiles que forman microcristales hídricos que la teoría denomina "icebergs". Los microcristales así formados atraparían las moléculas del anestésico dentro de una compleja red de uniones de hidrógeno de moléculas de agua, cuyo origen es estructural y pertenece a

las proteínas de membrana. Los clatratos disminuyen la permeabilidad selectiva de las neuronas por obstrucción de los poros de las membranas y causan pérdida de dinamismo de los fosfolípidos de aquella (Sumano y Ocampo, 1997). Es decir, podrían interrumpir la movilidad iónica, la carga eléctrica y la actividad enzimática química del cerebro.

De todas formas, la teoría de los microcristales hídricos no explica, al menos directamente, el mecanismo de acción de la anestesia inducida por barbitúricos y otros compuestos químicos.

Es posible que la **Teoría del volumen crítico** sea una de las teorías más lógicas. Se basa en la supuesta capacidad de los anestésicos de aumentar el volumen de la membrana celular. Esto lo logran, probablemente, formando clatratos y desnaturalizando parcial y reversiblemente las proteínas de la membrana (Sumano y Ocampo, 1997).

El aumento de volumen evitará el intercambio iónico y provocará una pérdida de la excitabilidad y conductibilidad de las neuronas. Este postulado es apoyado por varias evidencias experimentales, entre las que destacan la medición del volumen de membranas sedimentadas con y sin anestesia y la inversión del efecto anestésico al aumentar la presión atmosférica. Es el volumen de la membrana, y no el de la célula, el que se altera. Este aumento del volumen está influido, además, por la temperatura del organismo ya que, a menor temperatura, se requerirá menor concentración o presión parcial de anestésico y aumentará más rápidamente el volumen de la membrana (Sumano y Ocampo, 1997). Coincide también con este planteamiento el hecho de que a menor temperatura, mayor será el coeficiente de partición lípido/gas de los anestésicos. Esto significa que a menor temperatura el anestésico se encontrará más en la proporción lípida del SNC.

Los mecanismos de expansión de la membrana por los anestésicos todavía no son del todo conocidos, pero parecen atribuibles a factores como los que siguen señalados por Booth y McDonald (1988):

- a) La expansión de membrana es debida a los microcristales inducidos por la anestesia, como se sugirió previamente por la teoría de Pauling.
- b) Se sabe que los anestésicos producen cambios morfológicos en las proteínas. Es posible que cuando la membrana se expande se produzca una distorsión de las proteínas de la misma.
- c) Quizás sea responsable de la expansión de membrana la alteración del calcio.
- d) Quizás sea inducida por una inhibición anestésica de la ATP-asa asociada a la membrana contráctil.

La hipótesis más reciente es que los anestésicos interactúan con proteínas específicas, particularmente sobre receptores de neurotransmisores, lo que facilita o inhibe su actividad para producir muchos de los elementos fisiológicos asociados con la anestesia. Esta hipótesis es validada por el hecho de que la selectividad de los distintos enantiómeros se correlaciona con la potencia anestésica, y los compuestos no anestésicos que alteran la membrana, no tienen efecto sobre estos receptores. Además, las interacciones con sinapsis específicas en el SNC nos permite sacar conclusiones racionales respecto a su mecanismo de acción (Thompson y Wafford, 2001).

Diversos autores han descrito la influencia de distintos anestésicos sobre varios tipos de receptores, como sobre los ácido gamma-hidroxibutírico ó GABA (Metha y Ticku, 1999; Antkowiak, 1999; Jenkins *et al.*, 1999; Nishikawa y

Maclver, 2001), alfa-2 adrenérgicos (Kagawa *et al.*, 1997), opioides (Tao y Auerbach, 1994; Karuri *et al.*, 1998b), dopaminérgicos (Segal *et al.*, 1990; Mantz *et al.*, 1994; Adachi *et al.*, 1999), colinérgicos (Tonner y Miller, 1992; Forman, 1998; Nietgen *et al.*, 1998; Flood y Role, 1998), histaminérgicos (Mammoto *et al.*, 1997), NMDA (Irifune *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1995), aspartato y glutamato (Watanabe *et al.*, 1993).

Habitualmente, la anestesia general puede realizarse a través de distintos mecanismos e incluso, los distintos procedimientos para realizar la anestesia pueden perfeccionarse mediante la combinación de determinados agentes en óptimas concentraciones según su mecanismo de acción (Guertin y Hounsgaard, 1999). También, algunos autores observaron, en vías hipocampales de la rata, que los anestésicos volátiles modulan tanto la transmisión sináptica excitatoria como inhibitoria, mientras que los anestésicos intravenosos producen acciones más específicas sobre acontecimientos sinápticos inhibitorios (Wakasugi *et al.*, 1999). Por tanto, afirman que, los distintos agentes anestésicos inducen efectos específicos y distintos sobre determinadas vías en el SNC.

En los últimos años, ha habido un gran progreso en la comprensión de los mecanismos de acción de los anestésicos. Con la reciente aplicación de las técnicas de biología molecular y los avances en la biología estructural de los receptores, se han abierto nuevas puertas. Es previsible que en los próximos años estas técnicas se combinen con la tecnología transgénica y ayuden a conocer el papel desempeñado por los distintos canales iónicos en la anestesia, así como los efectos colaterales de estos anestésicos (Thompson y Wafford, 2001).

3. FUNDAMENTOS DE LA ANESTESIA

3.1. CONCEPTO Y TIPOS DE ANESTESIA

Los anestésicos son agentes empleados para someter al paciente a insensibilidad absoluta. El término anestesia significa sin sensación, o con pérdida de ella, como acompañamiento reversible de la depresión del tejido nervioso, sea una depresión local o general (Sumano y Ocampo, 1997). El término fue propuesto por Wendell Holmes (1846) para describir el proceso reversible de depresión del SNC por un fármaco que produce inconsciencia y reducción o ausencia de la respuesta a los estímulos externos, de manera que el paciente no responde a ellos (Jones, 2001).

La investigación biomédica se acompaña de una amplia gama de actividades científicas, con el objetivo general de mejorar y acrecentar nuestros conocimientos sobre el binomio salud-enfermedad del hombre y los animales. Históricamente se han estudiado una gran variedad de especies animales como modelos experimentales. Este empleo de las especies de laboratorio con fines científicos requiere, la mayoría de las ocasiones, un manejo del anestésico efectivo y seguro. La anestesia animal es un amplio y variado tema, considerando el gran número de modelos animales, cada uno de los cuales tiene unas características específicas de tolerancia y reacción a la anestesia, y peculiaridades especiales de comportamiento. Es frecuente que los investigadores no presten suficiente atención a la preparación de la anestesia animal durante el protocolo de investigación, obteniéndose muchas veces resultados difíciles o imposibles de interpretar (Mack *et al.*, 1994).

La mejora de las técnicas anestésicas debe considerarse un aspecto esencial del refinamiento de los métodos experimentales. Es importante tener en cuenta que una incorrecta técnica anestésica puede ocasionar efectos adversos sobre la calidad de los resultados obtenidos en el transcurso de la experimentación animal. Por lo tanto, es responsabilidad de todos los

investigadores relacionados con el uso del animal de laboratorio, la de revisar sus métodos anestésicos, para introducir cuantas mejoras sean necesarias. Además, se debe prestar especial atención a los cuidados pre y post operatorios. Por otro lado, proporcionar una cobertura adecuada a las necesidades del animal en cuanto a alimentación, alojamiento, horas de luz, etc., debe considerarse parte integral de las responsabilidades del anestesista (Cruz y Lasaosa, 1996)

Básicamente, podemos agrupar los diferentes tipos de anestesia en dos grandes grupos:

1. Anestesia loco-regional: el animal permanecerá despierto y con sólo parte de su cuerpo protegido contra el dolor. Se puede realizar de las siguientes maneras:

- Aplicación tópica.
- Infiltración.
- Bloqueos nerviosos (inyección perineural, bloqueo espinal).

2. Anestesia general: el animal tendrá una pérdida general de la conciencia (con excepciones como la anestesia disociativa). Se puede inducir:

- Por agentes fijos.
- Disociativa.
- Por agentes volátiles.

En lo que respecta a la anestesia general, la podríamos definir como un proceso reversible por el cual se logra la inconsciencia completa del paciente mediante el empleo de un agente o el uso combinado de varios (Pereira *et al.*, 1996). Todos los métodos de prevención de la conciencia del dolor, que implican pérdida de conciencia e incapacidad de responder a acontecimientos traumáticos de los procedimientos de diagnóstico o de cirugía, se incluyen en la

anestesia general (Jones, 2001). Los principales objetivos de la anestesia general están encaminados a conseguir lo siguiente:

- Hipnosis (sueño inducido), indiferencia al entorno.
- Relajación muscular.
- Analgesia.
- Ausencia o reducción de los reflejos protectores.

A su vez, dentro de la anestesia general podemos distinguir dos tipos:

- a) Anestesia general parenteral: utiliza agentes inyectables.
- b) Anestesia general inhalatoria: utiliza agentes que son administrados vía respiratoria.

3.2. ETAPAS DE LA ANESTESIA GENERAL

Para describir mejor cómo se produce la anestesia general se han dividido en cuatro etapas, dependiendo de los signos neuromusculares reconocidos en el paciente. No hay una división clara entre las etapas al pasar de una a otra. La respuesta puede ser diferente, según el paciente y el tipo de anestésico empleado (Lumb y Jones, 1981).

Las cuatro etapas o estadios de la anestesia son las siguientes:

ETAPA I: EXCITACIÓN VOLUNTARIA O ESTADIO DE ANALGESIA

Los rasgos más característicos son la excitación motora o agitación y la ataxia del paciente (Winters, 1976). La ataxia que aparece en esta etapa traduce un aumento de la actividad del SNC y no una depresión. La última parte de esta etapa se caracteriza por la analgesia. La conciencia está presente durante toda la etapa I. Si el anestésico es un gas, habrá forcejeo, chillidos, excitación y paro voluntario de la respiración, seguido de inspiraciones

profundas. La tensión induce liberación de catecolaminas, por lo que habrá aumento de la frecuencia cardíaca, midriasis y emisión de heces y orina (Sumano y Ocampo, 1997).

ETAPA II: EXCITACIÓN INVOLUNTARIA O DELIRIO

Comienza con la pérdida de conciencia y del control de la voluntad. Además, la excitación del SNC o el aumento de estimulación, en vez de la depresión del SNC, caracterizan esta etapa. El animal aún reacciona a estímulos fuertes del medio, y presenta taquipnea e hiperventilación. Las pupilas están dilatadas, hay chillidos, salivación y movimientos deglutorios (Sumano y Ocampo, 1997).

Winters (1976), divide a la etapa II en tres componentes IIA, IIB y IIC. Las dos primeras se caracterizan por posturas bizarras y un comportamiento inapropiado tal como alucinaciones mientras que la etapa IIC representa el estado cataleptoide de la etapa II. Durante la etapa IIC, así como en la etapa III, el sujeto no responde a estímulos dolorosos. En la etapa IIC el sujeto no reconoce y no puede evocar la memoria (Winters, 1976). Las etapas I y II constituyen juntas el período referido como inducción.

ETAPA III: ANESTESIA QUIRÚRGICA

Durante esta fase la acción depresora del anestésico se extiende desde el córtex y mesencéfalo hasta la médula espinal. Los reflejos espinales se hallan abolidos así como la conciencia y las sensaciones dolorosas. Aparece relajación muscular y desaparecen los movimientos coordinados. Esta etapa ha sido dividida en cuatro planos para dar una diferenciación más precisa. Otros autores han sugerido la simple clasificación de ligera, media y profunda. La anestesia ligera persiste hasta que el movimiento ocular desaparece, la anestesia media está caracterizada por una parálisis intercostal progresiva y en la profunda por una respiración diafragmática. En la anestesia quirúrgica ligera

los párpados permanecen semiabiertos y aún se detectan los reflejos palpebral y corneal, mientras que reflejo pedal desaparece. En la anestesia quirúrgica profunda desaparecen los reflejos corneal y palpebral, la respiración se hace corta y superficial y hay hipotermia por inactivación del centro termorregulador en el hipotálamo (Sumano y Ocampo, 1997).

ETAPA IV: PARALISIS BULBAR O DEPRESIÓN EXTREMA DEL SNC

Se caracteriza por una parálisis de los centros reguladores vitales del bulbo, lo que origina la muerte del paciente si no se instauran rápidamente procedimientos de recuperación, aunque suelen ser infructuosos en sujetos de alto riesgo. Lo más característico de esta etapa es la parada respiratoria y la caída de la presión arterial hasta niveles de shock, aunque el corazón late débilmente por un corto espacio de tiempo después de cesar la respiración, deteniéndose hasta parar a medida que se incrementa la hipoxia. Así mismo, todos los reflejos se hallan abolidos con dilatación pupilar máxima y relajación de los esfínteres anal y uretral (Booth y McDonald, 1988).

ETAPA DE RECUPERACIÓN DE LA ANESTESIA GENERAL

La finalización del estado anestésico general implica la eliminación del fármaco o fármacos empleados de la sangre y de los tejidos. El período de recuperación se define generalmente como el tiempo entre el cese de la administración del anestésico y la reaparición de todos los reflejos protectores, incluyendo su capacidad de levantarse y soportar su peso (Warren, 1986). Con los anestésicos intravenosos la duración de este período depende principalmente del tiempo que necesita el animal para metabolizar y eliminar la porción activa del fármaco anestésico. El metabolismo de estas drogas depende de factores tales como: actividad enzimática del hígado, temperatura corporal y funcionamiento renal.

La anestesia por vía intravenosa produce un período de recuperación más largo que la anestesia por inhalación. La mayor parte de estos últimos anestésicos se eliminan de la corriente sanguínea con la ventilación pulmonar normal. Otros se metabolizan en el hígado y se eliminan por vía renal. En general, cuanto más largo es el período de administración del anestésico mayor será la saturación o concentración corporal y más largo el período de recuperación, independientemente del fármaco administrado (Warren, 1986).

Cuando un animal se recupera de la anestesia general, muestra signos característicos de reanimación, ya que va pasando de un plano más profundo a otro más ligero de inconsciencia.

Los anestésicos que necesitan muchas horas para ser eliminados de la corriente sanguínea, producen recuperaciones más complicadas que las de los que se eliminan rápidamente.

Los signos típicos de recuperación son: aumento de la frecuencia respiratoria y del volumen de aire basal, rotación medial del globo ocular, recuperación de los reflejos protectores, temblor y movimientos espásticos de la lengua.

3.3. ANESTESIA INHALATORIA

3.3.1. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA ANESTESIA INHALATORIA

Al ser la anestesia inhalatoria un proceso dinámico de inhalación y expulsión de gases, el concepto de dosis no es tan obvio como en la anestesia con agentes fijos. Además, el anestésico en forma de gas tendrá que pasar por varias barreras y distribuirse en todo el organismo.

La mayoría de las teorías que explican el mecanismo de acción de los anestésicos inhalatorios se basan en que el cerebro es el primer órgano implicado en la producción de la inconsciencia, de la depresión del SNC y de la analgesia, y por lo tanto, para anestésiar a un animal se requiere una concentración cerebral mínima efectiva. Esta, a su vez, dependerá de la CAM o concentración alveolar mínima de un anestésico a una atmósfera de presión que produce inmovilidad en el 50 % de los sujetos expuestos a un estímulo nocivo máximo (Steffey, 1996). También es una medición estándar que se aplica a todos los anestésicos inhalatorios y que hace posible equiparar dosis equipotentes de anestésicos inhalatorios en términos de sus efectos, y cuantificar factores que influyen en las necesidades de los anestésicos (Ludders, 2001). Aplicado a la clínica, debe tenerse en cuenta que el concepto CAM suele determinarse en los animales sanos no medicados y que varios factores no relativos al paciente pueden aumentar o disminuir la CAM.

Los valores de CAM de un anestésico en particular pueden cambiar debido a cierto número de factores físicos y ambientales. Una disminución de la CAM significa que un animal es más sensible a un anestésico y se necesitará una concentración menor para producir la anestesia. Los factores que pueden disminuir la CAM son: hipotensión grave, hipotermia y vejez. La especie, el sexo, la duración de la anestesia o los trastornos ácidos-básicos no afectan a la CAM (Lasaosa y Laredo, 1996).

El anestésico deberá pasar de los alvéolos a sangre y de ésta a los diversos compartimentos orgánicos, por lo cual la CAM del anestésico también dependerá del grado de solubilidad del anestésico en el torrente sanguíneo (coeficiente de solubilidad sangre / gas), ya que un anestésico muy soluble en sangre tenderá a permanecer en ésta y de ahí se difundirá a los tejidos, creando un gradiente de concentración adecuado para que el alvéolo retenga anestésico del aire inspirado. Cuanto mayor sea el coeficiente de solubilidad menor será la CAM requerida, ya que el anestésico se concentra en sangre y difunde lentamente a los tejidos, por lo que también se toma lentamente del

alvéolo al retener éste el anestésico del aire inspirado, con lo cual la velocidad de inducción será más lenta (Lasaosa y Laredo, 1996).

La *potencia* no está relacionada con la solubilidad en la sangre, sino con la solubilidad en los lípidos, y es independiente de la velocidad con que se induce la anestesia. Esta liposolubilidad está directamente relacionada con la CAM. Los anestésicos se concentran en los tejidos con alto contenido lipídico o graso.

La cantidad de un anestésico que se distribuye en un tejido depende del grado de perfusión sanguínea de éste último y de la solubilidad del anestésico en él. Así el grupo de tejidos de alta perfusión o grupo rico en vasos está formado por cerebro, corazón, hígado, riñones, tracto digestivo y pulmones.

Otro aspecto importante es el del *volumen tidal*: cantidad de aire que normalmente entra y sale de los pulmones en cada respiración. Debido a la anatomía del tracto respiratorio, una cantidad importante de aire inhalado con cada volumen tidal no alcanza los alvéolos. El aire contenido en boca, nariz, laringe, tráquea, bronquios y bronquiólos no toma parte en el intercambio gaseoso y forma el llamado *espacio muerto anatómico*. Además hay siempre algunos alvéolos que no reciben riego sanguíneo pero que contienen aire y forman el *espacio muerto fisiológico*. Durante la anestesia general, el aire del espacio muerto se convierte en un problema importante cuando se trata de conseguir una ventilación adecuada. El espacio muerto anatómico puede reducirse usando un tubo endotraqueal de tamaño adecuado (Lasaosa y Laredo, 1996).

3.3.2. PROPIEDADES DEL ANESTÉSICO INHALATORIO IDEAL

Las características generales del anestésico inhalatorio ideal son, según Sumano y Ocampo (1997) los siguientes:

1. Desde el punto de vista del paciente.
 - Rápida inducción.
 - Que no irrite el tracto respiratorio.
 - Inodoro.

2. Desde el punto de vista del cirujano.
 - No explosivo.
 - Que induzca buena relajación muscular.
 - Que no aumente el sangrado capilar.

3. Desde el punto de vista del anestesista.
 - Que permita amplio margen de seguridad.
 - Inerte y no metabolizable.
 - Atóxico.
 - Potente para lograr una oxigenación óptima.
 - De adecuada solubilidad en sangre.

4. Desde el punto de vista del fabricante.
 - Fácil de producir.
 - Fácil de purificar.
 - Estable y no explosivo.
 - Elaboración a bajo precio.

3.3.3. CLASIFICACIÓN DE LOS ANESTÉSICOS INHALATORIOS

De acuerdo con Flecknell (1998) y Lasaosa y Laredo (1996), los distintos agentes anestésicos volátiles se pueden clasificar en gaseosos y líquidos.

1. GASEOSOS

1.1. Óxido nitroso

- ☺ *Efectos deseables*: el óxido nitroso causa una depresión cardiovascular y del sistema respiratorio mínimas. Incoloro, inodoro, no irrita las mucosas y no es inflamable.

- ☹ *Efectos no deseables*: presenta una potencia anestésica baja y no puede ser utilizado sólo para producir anestesia, o incluso inconsciencia, en la mayoría de las especies. Se considera que los animales no pueden ser anestesiados sólo con una mezcla de óxido nitroso y oxígeno sin que se produzca hipoxia.

- ☺ *Comentarios especiales*: puede utilizarse para reducir la concentración necesaria de otros agentes.

1.2. Ciclopropano

- ☺ *Efectos deseables*: de olor suave y no irritante. De acción rápida y fácil para cambiar de plano quirúrgico. Gran potencia y escasa toxicidad. Buen analgésico y relajación muscular aceptable.

- ⊖ *Efectos no deseables*: si se profundiza la anestesia, produce disminución del volumen tidal, con taquipnea superficial. Efecto depresor sobre aparato cardiovascular.

- ☺ *Comentarios especiales*: muy explosivo. Al mezclarse con aire y oxígeno, una chispa accidental puede provocar una fuerte explosión.

2. LÍQUIDOS

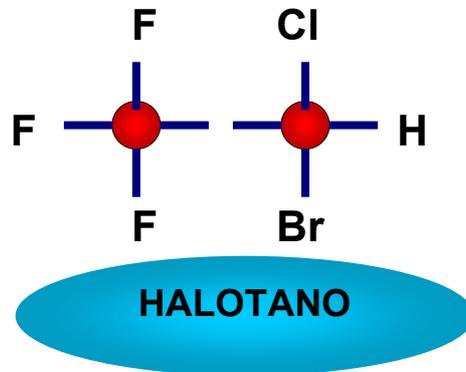
2.1 Éter

- ☺ *Efectos deseables*: fácil de vaporizar con un aparato sencillo. Es muy difícil matar a un animal con una sobredosis de éter.

- ⊖ *Efectos no deseables*: inducción desagradable para el animal; las propiedades irritantes pueden causar tos, secreciones bronquiales y salivares profusas y, ocasionalmente, laringoespasma. Es inflamable y forma mezclas explosivas tanto con oxígeno como con aire.

- ☺ *Comentarios especiales*. La inducción y recuperación son relativamente lentas. También estimula la producción de catecolaminas, lo que contrarresta el efecto depresor que ejerce el anestésico sobre el corazón, aunque también provoca un moderado aumento en las concentraciones sanguíneas de glucosa, y una amplia variedad de otros cambios metabólicos, los cuales pueden interferir con algunos experimentos.

2. 2. Halotano



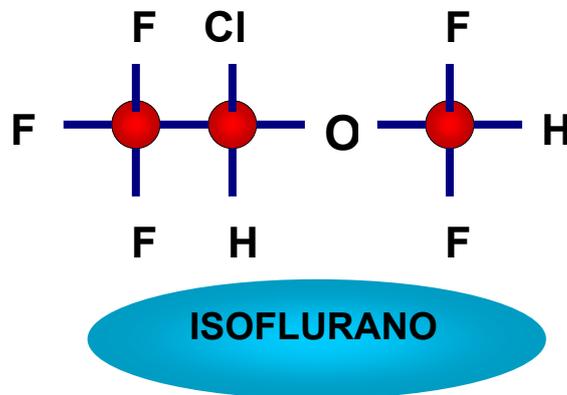
- ☺ *Efectos deseables*: relativa rápida inducción y recuperación buena. Es un anestésico potente, no irritante, ni inflamable, ni explosivo. La profundidad anestésica se controla fácilmente con la respiración, debido a su volatilidad, a su solubilidad y a que tiene una concentración mínima alveolar moderada. La recuperación varía de 15 a 30 minutos, dependiendo de la cantidad y del tipo de sedación preanestésica que se utilice, así como del tiempo quirúrgico. Es el más utilizado en la actualidad.

- ☹ *Efectos no deseables*: efecto depresor sobre el sistema cardiovascular. A niveles quirúrgicos de anestesia se produce una moderada hipotensión debido a la reducción del gasto cardíaco y a una vasodilatación periférica. Produce bradicardia y da lugar a frecuentes alteraciones del ritmo cardíaco. También ocurre una depresión de la respiración dependiente de la dosis. El halotano sufre un cierto grado de metabolismo hepático, produciéndose una marcada inducción de enzimas microsomales tras la anestesia. Es hepatotóxico, aunque es

raro que se produzca una necrosis hepática. La analgesia es moderada o escasa y la relajación muscular no es buena.

- ☹ *Comentarios especiales:* excelente agente para mantenimiento de la anestesia en la mayoría de las especies. Debe administrarse con un vaporizador calibrado.

2.3. Isoflurano



- ☺ *Efectos deseables:* inducción y recuperación muy rápidas y la profundidad de la anestesia puede alterarse fácil y rápidamente. Su gran volatilidad y su baja solubilidad hacen del isoflurano el anestésico de más rápida y suave inducción y recuperación, además de permitir controlar fácilmente la profundidad de la anestesia. No es irritante, ni explosivo ni inflamable. La relajación muscular que produce es buena.
- ☹ *Efectos no deseables:* es un potente depresor respiratorio, mayor que el halotano. Al aumentar la dosis, disminuye la frecuencia respiratoria y se va deprimiendo la ventilación. Sin embargo, produce menor depresión del sistema cardiovascular. Causa hipotensión por disminución de la resistencia periférica. La rapidez de la inducción está limitada por su olor penetrante.

- ☹ *Comentarios especiales:* es casi completamente eliminado en el gas exhalado. Esto sugiere que tiene poco efecto sobre las enzimas microsomales hepáticas y, por tanto, una interferencia mínima en el metabolismo de fármacos o en estudios toxicológicos. Con una potencia entre el halotano y el enflurano, es el menos soluble y el más estable de todos los anestésicos volátiles.

2.4. Enflurano

- ☺ *Efectos deseables:* no inflamable, no irritante y estable. Inducción y recuperación rápidas, por lo que la profundidad de la anestesia puede alterarse de manera fácil y rápida. No es inflamable, ni explosivo ni irritante.
- ☹ *Efectos no deseables:* es un fuerte depresor respiratorio y algo cardiovascular. Durante la inducción se produce una hipotensión pasajera.
- ☹ *Comentarios especiales:* se elimina en una gran cantidad por los pulmones y se metaboliza muy poca cantidad en el hígado. Es de los anestésicos más recientes.

2.5. Metoxiflurano

- ☺ *Efectos deseables:* no es irritante, ni inflamable ni explosivo. Posee un potente efecto analgésico y tiene algo de acción analgésica post-operatoria.
- ☹ *Efectos no deseables:* depresión del sistema respiratorio y cardiovascular. Su metabolismo da lugar a la liberación de ión fluoruro, el cual puede causar fallo renal.

- ☹ *Comentarios especiales:* debido a su lenta velocidad de inducción puede utilizarse con seguridad en pequeños animales, aunque en las especies más grandes es preferible usar este compuesto para mantenimiento de la anestesia tras la inducción con agentes inyectables de acción corta.

2.6. Sevoflurano y desflurano

Son potentes agentes anestésicos similares al isoflurano. El desflurano sufre el menor grado de metabolismo y la inducción y la recuperación de la anestesia son las más rápidas de los anestésicos volátiles. Necesita de un vaporizador presurizado de nuevo diseño para proporcionar concentraciones estables de anestésico. El sevoflurano sufre un grado de metabolismo similar al del isoflurano. El alto coste inicial de ambos agentes y la ausencia de ventajas significativas comparados con el isoflurano, sugieren que probablemente no tengan un uso extendido en anestesia de animales de laboratorio.

3.3.4. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA ANESTESIA INHALATORIA

Las principales ventajas e inconvenientes de la anestesia inhalatoria, respecto a la parenteral, son las siguientes según Lasaosa y Laredo (1996):

- ***Ventajas de la anestesia inhalatoria***
 1. Buenos resultados y gran capacidad de control de la profundidad anestésica.
 2. La absorción y la eliminación de los anestésicos es muy rápida.
 3. Estimula activamente los centros circulatorios debido a la buena oxigenación de la sangre arterial.

4. Reducción de los riesgos de accidentes por aspiración de sustancias al tener la necesidad de intubación del animal.

- ***Inconvenientes de la anestesia inhalatoria***

1. La mayoría de los anestésicos suele producir un período de excitación muy violento durante la inducción.
2. Se requiere mucho tiempo para alcanzar el período de anestesia quirúrgica.
3. Cabe la posibilidad de accidentes reflejos.
4. Es necesaria una persona que controle en todo momento al animal.
5. Se pueden producir intoxicaciones ya que, casi siempre, el anestésico es exhalado al medio ambiente del quirófano

3.3.5. ANESTESIA INHALATORIA EN EL CONEJO

Los animales de laboratorio se anestesian tanto para proporcionar una sujeción humanitaria mientras se realizan procedimientos relativamente no traumáticos, como para eliminar la percepción de dolor durante las intervenciones quirúrgicas. Cuando se selecciona un método de anestesia, la preocupación por el bienestar del animal requiere que la administración del anestésico cause un malestar mínimo.

Los conejos se estresan fácilmente por el manejo pre-operatorio inexperto y durante la inducción con agentes anestésicos volátiles. Los efectos combinados del estrés y de la anestesia pueden provocar un fallo cardiaco y respiratorio. Además, la posible presencia de lesiones pulmonares pre-existentes causadas por la infección con *Pasteurella multocida* pueden dar lugar a fallo respiratorio durante la anestesia. Cuando se examinan los conejos antes de la anestesia, debería prestarse una atención especial a los ojos y la

nariz, ya que la presencia de cualquier secreción anormal sugiere infección del tracto respiratorio. Un dato diferencial en esta especie es que no es necesario retirar la comida y el agua antes de inducir la anestesia, puesto que en el conejo no se producen vómitos durante la inducción o la recuperación. El gran ciego existente en esta especie y la coprofagia también hacen relativamente ineficaz el ayuno pre-operatorio para reducir la masa de las vísceras abdominales antes de la cirugía abdominal (Flecknell, 1998).

- *Administración de agentes inhalatorios en el conejo*

- a. *Máquina anestésica*

Los aparatos de anestesia están diseñados para suministrar oxígeno, gases anestésicos y agentes anestésicos volátiles al animal. El diseño de los diferentes aparatos de anestesia varía considerablemente. El suministro de gas puede realizarse mediante bombonas montadas en el aparato anestésico o desde un sistema central por medio de tuberías. Las bombonas de gas o los conectores de manguera presurizados liberan el gas hasta un medidor de flujo, a través de un regulador de presión, permitiendo el control de los flujos individuales de gas y de las velocidades de flujo (Flecknell, 1998). Los rotámetros miden e indican el gas que fluye alrededor de ellos. Un flujo de gas ascendente soporta un “flotador” de movimiento libre, ya sea de bola o de tapón, en un cono de vidrio o tubo de plástico transparente. La frecuencia de flujo (en litro por minuto), marcada en el tubo, se lee desde el punto más alto de las bobinas y desde el ecuador de las esferas. Los rotámetros están calibrados específicamente para cada gas (Clutton, 2001). Los gases pasan desde el medidor de flujo a través de un vaporizador, el cuál está lleno con un agente anestésico volátil. El vaporizador diluye el vapor saturado de los anestésicos volátiles para producir un rango de concentraciones útiles (Clutton, 2001). Ésta concentración no debe verse afectada por cambios en la velocidad de salida del gas o en la temperatura del mismo. Los vaporizadores calibrados están diseñados para su uso con un agente anestésico volátil en particular y es

importante asegurarse que solamente se utiliza el agente apropiado (Flecknell, 1998).

b. Métodos de administración

b.1. Cámaras anestésicas

Son receptáculos de cristal donde se coloca al animal y se introduce el gas fresco. Son muy útiles para inducir la anestesia en animales que no toleran el manejo físico (Clutton, 2001). La concentración de anestésico que puede conseguirse con estos contenedores es impredecible por lo que es preferible la inducción con mascarilla, puesto que permite un mejor control de la administración y la realización de la resucitación de emergencia si es necesaria. Las cámaras anestésicas tienen la desventaja añadida de que durante la inducción puede producirse excitación involuntaria capaz de ocasionar lesiones (Flecknell, 1998). También hay que tener en cuenta que, cuando los conejos se ponen en una cámara anestésica, hacen tentativas de evitar la inhalación del vapor (Flecknell, 2001).

b.2. Circuitos anestésicos

Con estos sistemas se suministra suficiente cantidad de gases anestésicos para satisfacer las necesidades de ventilación del animal, así como para retirar los gases exhalados, que contienen dióxido de carbono. Para comprender su funcionamiento conviene tener claro los términos de espacio muerto y de resistencia del circuito. El *espacio muerto* de un circuito anestésico es la parte del circuito que permanece llena con el aire expulsado al final de la espiración. Este gas es rico en dióxido de carbono y se inhala de nuevo por el animal, aumentando la concentración de dióxido de carbono en la sangre. La *resistencia de un circuito* anestésico influye en el esfuerzo que debe realizar el animal para mover gas dentro y fuera del circuito. Los circuitos con componentes estrechos, con ángulos agudos o con válvulas, crearán un mayor

resistencia a la salida de gas y, por tanto, requerirán un esfuerzo respiratorio mayor por parte del animal.

Los circuitos anestésicos pueden ser abiertos, semiabiertos o cerrados. En el conejo los sistemas recomendados son los semiabiertos (o semicerrados en el Reino Unido) en los que no se utilizan absorbentes de CO₂ y cuentan con frecuencias de flujo de gas elevadas para limpiar el CO₂ espirado de manera que no puede haber reinspiración del mismo gas en la siguiente respiración (Clutton, 2001). Los dos sistemas semiabiertos más recomendados en el conejo son el sistema T de Ayre y el circuito coaxial de Bain, dependiendo del peso del animal.

b.2.1. *Sistema T de Ayre*

Fue descrito por Ayre en 1956 y pretendía ser un circuito con resistencia baja y poco espacio muerto. Consiste en un tubo en el que se introduce la mezcla de gas anestésico a través de un pequeño tubo de entrada, colocado en ángulo recto con el brazo principal. Un extremo de la pieza en T está conectado al animal, mientras que el otro se deja abierto al aire. Un tramo de tubo se conecta a este extremo abierto, proporcionando un pequeño depósito para los gases anestésicos que, de otro modo, escaparían al exterior. Durante la inspiración, se introduce el gas fresco tanto desde el brazo lateral como desde el depósito. En la espiración, el gas exhalado llena el depósito y, durante la fase anterior a la inspiración siguiente, se sustituye por el gas fresco procedente del brazo lateral. Para que se pueda controlar precisamente la presión suministrada a los pulmones para la ventilación, es preferible unir al extremo espiratorio un depósito en forma de bolsa con un extremo abierto. Presionando la bolsa con el extremo cerrado se insufla gas a los pulmones y la exhalación se produce a través del extremo abierto de la bolsa (Flecknell, 1998). A esta variación del sistema se le conoce como Sistema T de Ayre con modificación de Jackson-Rees. Las ventajas del Sistema T de Ayre son que el espacio mecánico muerto y la resistencia del sistema son mínimos y ello lo

hace ideal para animales pequeños (< de 5 kg). Es sencillo, económico y fácil de esterilizar (Clutton, 2001).



b.2.2. Circuito coaxial de Bain

Es una pieza en T coaxial con conducto de inspiración interno rodeado por un tubo de espiración externo que puede acabar en balón de reserva y válvula de espiración, en un tubo abierto o en un balón abierto por el final (Clutton, 2001). Se diseñó para proporcionar un circuito de poco peso, reduciendo el riesgo de que el tubo se salga inadvertidamente, en el que cualquier válvula o bolsa respiratoria estuviera situada a cierta distancia del paciente y cerca de la máquina anestésica, para realizar ventilación asistida fácilmente sin interferir con el campo quirúrgico. El circuito de Bain funciona igual que una pieza en T. Durante la inspiración, el gas se extrae del suministro central de gas fresco y también del tubo de depósito externo. Durante la espiración, el gas exhalado llena el tubo de depósito y, durante la pausa anterior a la siguiente inspiración, éste es reemplazado con gas fresco, con tal de que la velocidad de salida de éste sea adecuada (Flecknell, 1998).

c. Mascarillas faciales y tubos endotraqueales

Las mascarillas fabricadas para uso veterinario tienen forma de cono o embudo, y un tamaño apropiado para que se ajuste perfectamente alrededor del hocico; no deben obstruir la boca o la nariz, pero deben proporcionar el mínimo espacio muerto. Pueden ser opacas o transparentes, con el fin de controlar mejor su aplicación y la respiración (Flecknell, 1998).

Los tubos endotraqueales pueden ser reutilizables o de un solo uso. Los primeros generalmente están hechos de goma y son opacos. Son preferibles los de un solo uso, de polietileno claro que tienen la ventaja de que, la condensación que aparece en el tubo indica que se halla correctamente colocado en las vías aéreas. Pueden ser con neumotaponamiento (balón hinchable situado en el extremo distal que asegura un sellado hermético entre el tubo y la tráquea) o sin él (Flecknell, 1998).

d. Intubación endotraqueal en el conejo

Es bien conocida la dificultad para intubar a los conejos mediante control visual. Los obstáculos son una boca estrecha, el grosor de la lengua y los grandes incisivos (Krüger *et al.*, 1994). La visualización de la laringe en el conejo es difícil y es necesario utilizar, o una hoja de laringoscopio Wisconsin (tamaño 1 en conejos de más de 3 kg ó tamaño 0 en conejos más pequeños), o un otoscopio si la intubación se va a realizar bajo visión directa. En este último caso, se pasa un introductor por debajo del espéculo hacia la tráquea. Se hace pasar el tubo endotraqueal a través del introductor y, entonces, se saca el introductor y se fija el tubo en la zona. La laringe debe rociarse con lidocaína antes de la intubación para evitar un posible laringoespasma (Flecknell, 1998).

Existen distintas técnicas alternativas para la intubación, muchas de las cuales necesitan de equipo especial. En una de ellas no se requiere la visualización de la laringe. El conejo se coloca en decúbito esternal, con la

cabeza y el cuello extendidos y se hace avanzar el tubo endotraqueal por encima de la lengua, lentamente hacia la faringe. El anestesista escucha los sonidos de la respiración del final del tubo, o bien si se utiliza un tubo de polietileno claro, se observa la presencia de condensación. A medida que el conejo inspira, se hace avanzar el tubo suavemente. Si el tubo entra en la laringe, el animal producirá a menudo una tos blanda y los sonidos respiratorios se continuarán oyendo (Flecknell, 2001). Otros autores prefieren guiarse más por la condensación del tubo a causa de la respiración que por el ruido (Krüger, 1994), y argumentan tres razones: primero, si hay mucho ruido en la habitación pueden no escucharse los ruidos respiratorios; segundo, mientras se escucha, no puede verse el tubo y la boca; y tercero, si se quiere enseñar la técnica a una persona sin experiencia, es obvio que dos personas no pueden escuchar al mismo tiempo a través del tubo. Hay otras técnicas en las que se recomienda la utilización de la endoscopia para visualizar la laringe y la posterior intubación (Macrae y Guerreiro, 1989; Tran *et al.*, 2001) o bien la intubación retrógrada a través de una cervicotomía (Corleta *et al.*, 1992).

e. Agentes inhalatorios en el conejo

La inducción de la anestesia en conejos es posible empleando sólo agentes inhalatorios, aunque conviene tener en cuenta que normalmente son estresantes para el paciente y para el anestesista. Además, pueden ocurrir períodos de apnea incluso a bajas concentraciones de halotano e isoflurano. Por esto, muchas veces se recomienda la inducción con un agente inyectable y mantenimiento con un anestésico inhalatorio.

La inducción con mascarilla es preferible a la cámara anestésica, puesto que permite un mejor control de la administración y la resucitación de emergencia si es necesaria (Flecknell, 1998). El halotano y el isoflurano son los dos anestésicos inhalatorios más empleados en el conejo. La CAM del halotano para el conejo es de $0,8 \pm 0,3$ % (Davis *et al.*, 1975), mientras que la CAM del isoflurano es de 1,38 % (Flecknell, 1998).

El metoxiflurano también es un anestésico seguro y eficaz en el conejo, produciendo una depresión cardiovascular y respiratoria algo menor que la observada con isoflurano o halotano. El éter no es un agente adecuado para conejos por su naturaleza irritante que puede inducir laringoespasma.

4. FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS

4.1. CONCEPTO DE ESTRÉS

La palabra “estrés” se deriva del griego *STRINGERE*, que significa provocar tensión. Hace 25 siglos, Hipócrates distinguió dos fenómenos de la enfermedad: el sufrimiento y el trabajo de la enfermedad. El trabajo de la enfermedad se opone al sufrimiento, es una reacción que se encuentra en todas las enfermedades, por lo tanto no es específico. Por tanto, Hipócrates tenía una idea bastante precisa de lo que hoy entendemos por estrés.

Estrés es un concepto difícil de definir. El diccionario de la Real Academia Española define al estrés como “situación de un individuo o de alguno de sus órganos o aparatos, que, por exigir de ellos un rendimiento superior al normal, los pone en riesgo próximo de enfermedad”. El Dr. Hans Selye, pionero en las investigaciones sobre el estrés, lo define como "una respuesta corporal no específica ante cualquier demanda que se le haga al organismo (cuando la demanda externa excede los recursos disponibles) (Mainieri, 1999). Esta respuesta es parte normal de la preparación del organismo para el enfrentamiento o para la huida. Así, por ejemplo, las pupilas se agrandan para mejorar la visión y el oído se agudiza, los músculos se tensan para responder al desafío, las frecuencias cardíaca y respiratoria aumentan de manera que la sangre es bombeada en forma más abundante y rápida para aumentar la llegada de oxígeno a las células y favorecer la demanda de las respuestas al peligro. Para ello la sangre es dirigida hacia áreas prioritarias, como lo son corazón, pulmones, riñones, hígado, músculos grandes y el cerebro. Funciones no prioritarias en ese momento, como la digestión y circulación periférica son disminuidas de forma dramática (Mainieri, 1999).

Conviene tener claro además, un concepto asociado al estrés: el distrés. Se define como un estado en el que el animal tiene que realizar un sustancial

esfuerzo para adaptarse a los cambios debidos a la situación experimental (FELASA, 1994). El estrés actúa como factor de motivación para vencer y superar obstáculos. Este nivel normal y deseable podría denominarse simplemente como estrés. No obstante ese nivel puede ser superado llegando a ser potencialmente perjudicial; pudiéndose diferenciar tal estado con el nombre de distrés. La diferenciación entre estrés y distrés se basa en comparar entre una condición necesaria y normal frente a otra que excede estos límites.

El Dr. Selye identificó tres fases en el estrés: (1) se da una reacción de alarma en respuesta a un factor de tensión que activa el sistema nervioso autónomo, (2) la fase de resistencia ocurre mientras el cuerpo se aclimata y ajusta al factor de estrés, y (3) la fase de fatiga, si la tensión persiste por mucho tiempo, agregándose factores residuales que pueden llevar a la enfermedad y hasta la muerte (Mainieri, 1999).

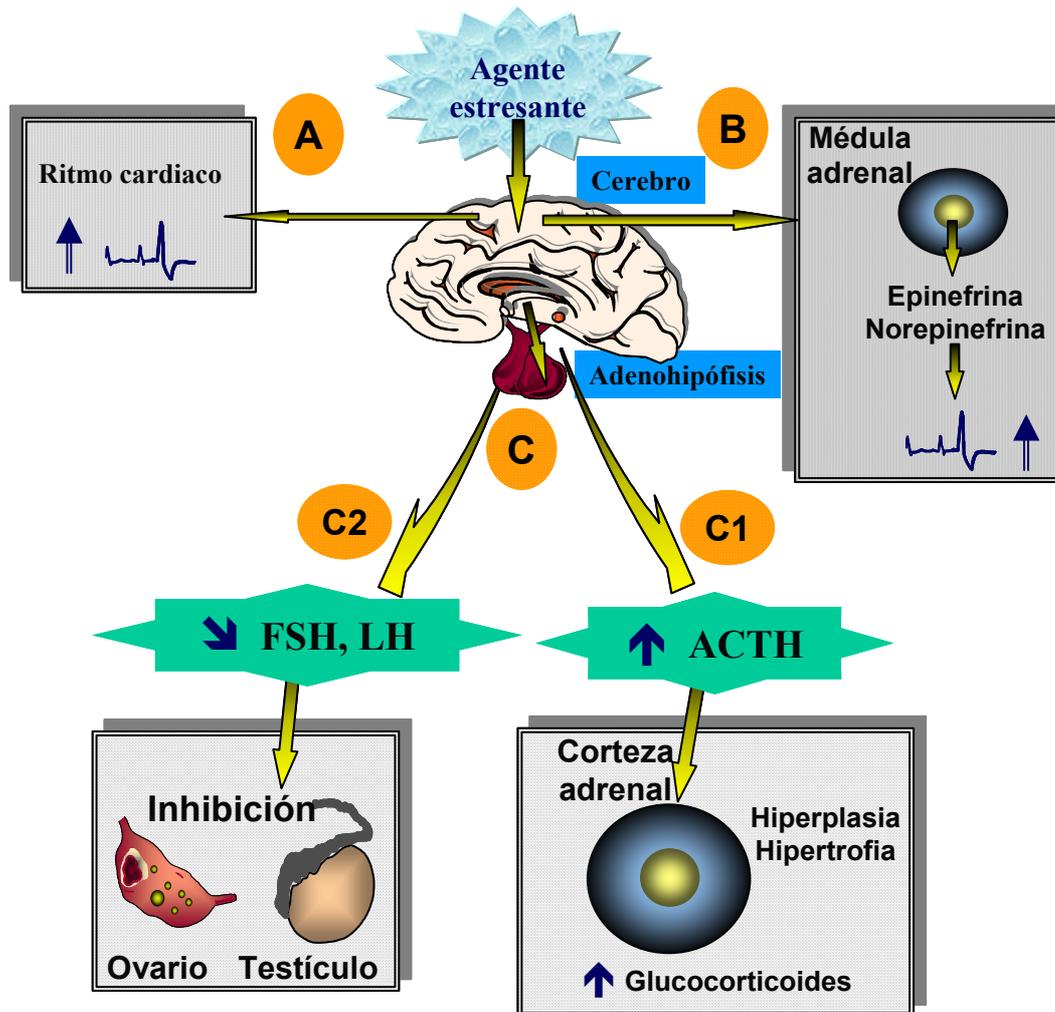
Podemos distinguir dos tipos de estrés:

1. Estrés agudo: es el producto de una agresión intensa ya sea física o emocional, limitada en el tiempo pero que supere el umbral del sujeto, da lugar a una respuesta también intensa, rápida y muchas veces violenta.
2. Estrés crónico: se presenta de forma prolongada en el tiempo, continuo, no necesariamente intenso, pero exigiendo adaptación permanente, se llega a sobrepasar el umbral de resistencia del sujeto para provocar las llamadas enfermedades de adaptación. Es decir, que cuando el organismo se encuentra sobreestimulado, agotando las normas fisiológicas del individuo, el estrés se convierte en distrés. El estrés crónico puede darse ya sea por una exposición prolongada y continua a factores estresantes externos o por condiciones crónicas o prolongadas de la respuesta al estrés (Mainieri, 1999).

4.2. RUTAS DEL ESTRÉS

Básicamente, encontramos 3 rutas, mediante las cuales el organismo inicia la respuesta al estrés (Illera, 2000).

- a) La llamada ruta neutra (ruta A) responde casi de inmediato. La sangre se desvía desde órganos no esenciales para el ejercicio físico hacia órganos importantes como el corazón, el músculo y el cerebro. Estas modificaciones se consiguen mediante constricciones y dilataciones de determinados vasos sanguíneos y el aumento del ritmo cardíaco. La vasoconstricción produce aumento de la presión sanguínea, disminuye la temperatura superficial del cuerpo y aumenta el ritmo cardíaco y respiratorio.
- b) La ruta endocrina (ruta B) puede presentar un retraso de varios segundos. Las concentraciones de catecolaminas en sangre, se consideran como la medida más precisa de la activación, inducida por estrés, del sistema medular simpático. Además, cuando actúa el estresante hay una liberación de corticoides adrenales que puede, incluso, llegar a vaciar los depósitos de estas hormonas en la corteza adrenal.
- c) La ruta C está relacionada con el estrés a más largo plazo ya que, para que aparezcan los síntomas característicos, se requiere un período mínimo de 48 horas, después de haberse producido el estímulo. Al verse alteradas las concentraciones de gonadotropinas es muy posible que tengan lugar diversas alteraciones reproductoras.



4.3. BASES NEUROFISIOLÓGICAS DEL ESTRÉS

Antes de describir el funcionamiento de los sistemas involucrados en la respuesta estresante hay que tener en cuenta lo siguiente:

En primer lugar, dado que en el desarrollo del estrés se encuentra implicada la percepción del sujeto, se requiere del funcionamiento de las estructuras cerebrales para el procesamiento de la información potencialmente estresante. Por tanto, el proceso de activación necesario para desarrollar un estado de estrés tiene lugar, primero, por procesos nerviosos centrales (Valdés y de Flores, 1990).

En segundo lugar, como consecuencia de ese procesamiento de la información, el organismo se va a preparar y va a elaborar una respuesta a partir de un sistema de respuesta rápida (sistema autonómico) y posteriormente de un sistema de respuesta lenta o tardía (sistema neuroendocrino).

Y, por último, existe un sistema constante de retrofuncionalidad sobre la respuesta del SNC, autonómica y endocrina que incrementa, mantiene o disminuye la respuesta al estrés.

4.3.1. ACTIVACIÓN NERVIOSA CENTRAL

Inicialmente, un estímulo aversivo excita a un receptor conduciendo dicha información hacia el cerebro bajo la forma de impulsos nerviosos. La información sensorial se proyecta en los núcleos asociativos del tálamo quien cumple funciones como estación de relevo sensitivo. Los impulsos nerviosos hacen una escala a nivel talámico, estableciendo sinapsis antes de proseguir su recorrido hacia el córtex cerebral (Ganong, 1992). Luego pasan a la corteza cerebral que se encarga de modular la fidelidad del procesamiento sensorial e identificar si se trata de un estímulo amenazante o no. La activación es promovida por la acción de la formación reticular quien pone en marcha la excitación general (Humber, 1986).

Las consecuencias endocrinas o periféricas del estrés apenas difieren según el estímulo que provoque la respuesta; sin embargo hay evidencias experimentales que sugieren que distintos circuitos del cerebro regulan la respuesta, o la adaptación, a los factores estresantes. Resulta difícil saber qué regiones del cerebro están envueltas en la respuesta estresante. Una determinada respuesta a un agente estresante puede representar la suma de varios pasos en el circuito (López *et al.*, 1999).

Por tanto, son muchas las regiones cerebrales relacionadas con la respuesta estresante: la corteza prefrontal, hipocampo, núcleo *accumbens*,

septo lateral, varios núcleos hipotalámicos, especialmente el núcleo paraventricular (NPV), núcleo medial y cortical de la amígdala, rafe dorsal, *locus coeruleus*, y varios núcleos del tronco encefálico (Herman y Cullinan, 1997; López *et al.*, 1999). La activación de estas regiones depende del tipo de agente estresante. La respuesta integradora del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales ocurre a través de interacciones entre circuitos cerebrales sensibles al estrés y neuronas neuroendocrinas del núcleo paraventricular hipotalámico.

Existen numerosos trabajos que implican a distintos neurotransmisores en la respuesta estresante (Herman y Cullinan, 1997; Van de Kar y Blair, 1999). Así, la mayoría de las regiones relacionadas con el estrés, presentan cantidades sustanciales de neuronas que contienen GABA. Los estresantes que manifiestan una respuesta fisiológica inmediata (estresantes sistémicos) son relanzados directamente al NPV; probablemente, a través de proyecciones catecolaminérgicas del tallo encefálico. Sin embargo, los estresantes que requieren de la interpretación de estructuras cerebrales superiores (estresantes procesivos) parecen estar canalizados a través de circuitos del sistema límbico. Ciertas regiones de éste se conectan con el NPV a través de neuronas que contienen GABA. Por tanto, la elaboración final de la respuesta al estrés procesivo parece que está modulada por el tono gabaérgico del núcleo paraventricular (Herman y Cullinan, 1997). El neurotransmisor GABA es conocido por inhibir la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH) y corticosterona *in vivo* y reducir la liberación de hormona liberadora de corticotropina (CRH) del hipotálamo, sugiriendo que el GABA interactúa directamente con neuronas hipofisiotróficas del NPV. Las acciones directas del GABA en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) está más apoyada por la presencia de terminales GABA inmunoreactivos en neuronas parvocelulares del NPV, y por la evidencia de la localización de receptores de GABA en neuronas del NPV parvocelular medial.

Además de sistemas gabaérgicos, también se ha relacionado con la regulación del estrés a: sistemas adrenérgicos (Zelena *et al.*, 1999; Feldman *et*

al., 2000), opioides (Vaccharino y Kastin, 2000; Drolet *et al.*, 2001), serotoninérgicos (Feldman *et al.*, 2000, Emerson *et al.*, 2000), dopaminérgicos (Hawkins *et al.*, 2000), histaminérgicos (Ito, 2000) y glutamaérgicos (Cratty y Birkle, 1999), en los que, dependiendo del agente estresante que actúe, se activarán unos sistemas u otros. Esta especificidad del factor estresante sobre la activación del eje HHA ha sido indicada por algunos autores. Así, Pàcak, en el año 2000, señaló la existencia de vías centrales específicas de estresantes que participan diferencialmente en la regulación de la activación simpato neuronal y adrenomedular, así como en la activación del eje HHA.

La respuesta del cuerpo al estrés no sólo es a nivel del cerebro, sino que también intervienen otros sistemas, como el endocrino, autónomo y el inmunológico. De hecho, estos sistemas conectan circuitos cerebrales y sistemas más periféricos que constituyen las bases para que la respuesta de un organismo al agente estresante sea o no adaptativa (López *et al.*, 1999).

Por tanto, como indicábamos anteriormente, existen distintos circuitos cerebrales y neuroendocrinos específicos implicados en la respuesta de un organismo al estrés.

4.3.2. ACTIVACIÓN AUTÓNOMA

La activación autónoma actúa por medio del sistema simpático adrenal, encargado de mantener el medio interno en estado uniforme (homeostasis) y de facilitar las respuestas de lucha o huida. Una vez que la formación reticular ha iniciado el proceso de activación general, el hipotálamo se excita a través de la corteza cerebral y el tálamo (Humber, 1986). A su vez, éste órgano se encarga de controlar las funciones del sistema nervioso autónomo (SNA) y del sistema endocrino, organiza las conductas de supervivencia tales como pelear, alimentarse, huir y reproducirse (Carlson, 1996). Cuando la activación nervioso-central parece haber alcanzado su punto máximo, el sistema simpático-adrenal es el encargado de preparar al organismo para afrontar la situación de

mantener el medio interno del organismo en estado uniforme y de facilitar respuestas de lucha o de huida (Valdés y de Flores, 1990; Carlson, 1996). Este sistema está compuesto por el sistema nervioso simpático (que cumple funciones activadoras o de alerta) y por la médula adrenal.

Las discrepancias entre las percepciones de circunstancias internas o externas y las expectativas innatas o adquiridas conducen a un modelo de respuesta al estrés que implica a varios sistemas homeostáticos, de los que el sistema simpático-adrenomedular es uno de ellos. Las amenazas graves y generalizadas, como hipoglucemia, hipoxia, hemorragia, colapso circulatorio y situaciones de lucha/huida, provocan la activación generalizada del sistema simpático-adrenomedular, que incluye la estimulación cardíaca, vasoconstricción esplácnica, cutánea y renal y, normalmente, la conservación del flujo sanguíneo al músculo esquelético (Hadley, 1997).

Por otro lado, cuando llega la información al hipotálamo, habiéndose realizado ya los procesos cognitivos que fueron atribuidos o evaluados como peligrosos, esa primaria y veloz respuesta provocará la liberación, a partir del hipotálamo y por vía simpática, de catecolaminas: norepinefrina y epinefrina.

El sistema adrenérgico se ha relacionado muchas veces con la regulación de la respuesta estresante. Por ejemplo, los primeros experimentos de Cannon revelaron que el ladrido de un perro era un estímulo para la secreción de epinefrina desde la glándula adrenal de un gato (Hadley, 1997). Las células efectoras autónomas pueden poseer α (alfa) y β (beta) adrenoceptores o sólo β , además de los receptores colinérgicos. Los β -adrenoceptores generalmente son estimuladores de la secreción celular, mientras que los α -adrenoceptores suelen ser inhibidores.

Algunos autores señalaron que las catecolaminas estaban implicadas en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, particularmente durante el estrés, a través de los α -2 adrenoceptores (Herman y Cullinan, 1997; Pasqualli

et al., 2000). Para ello, se estudió el efecto de agonistas α -2 adrenérgicos (clonidina) y antagonistas (yohimbina) sobre las concentraciones sanguíneas de ACTH, cortisol, norepinefrina y epinefrina. La distribución y naturaleza de estos receptores determinará la respuesta generada más apropiada (adaptativa) bajo condiciones de estrés.

Las concentraciones de catecolaminas en sangre, se consideran como la medida más precisa de activación, inducida por estrés, del sistema medular simpático. En general, los niveles plasmáticos de norepinefrina reflejan la actividad de los nervios simpáticos, mientras que los de epinefrina son una medida de la secreción de la médula adrenal.

La **norepinefrina** es segregada a nivel de la médula adrenal y de las estructuras cerebrales como el hipotálamo, el sistema límbico, el hipocampo y en el córtex cerebral. Al parecer, aunque la producción de norepinefrina tiene lugar en todas estas regiones, es el hipotálamo el único que absorbe norepinefrina (Valdés y de Flores, 1990).

La liberación de norepinefrina a nivel cerebral y periférico debido al estrés, se fundamenta probablemente en varias respuestas neuroendocrinas y neurocirculatorias y la norepinefrina puede tener influencia sobre su propia síntesis, liberación e inhibición mediante un sistema de retrofuncionalidad negativo, a través de los α -2 adrenoceptores en los nervios simpáticos (Tjurmina *et al.*, 1999). Se cree que no actúan a nivel del núcleo paraventricular y sí a nivel de la amígdala. Según Flugge, en 1999, en los centros noradrenérgicos del cerebro, los α -2 adrenoceptores funcionan como auto-receptores regulando la liberación de norepinefrina. Tanto la estimulación de los nervios simpáticos como las situaciones de estrés físico, agudo, o crónico, en estados de cólera (Ax, 1953), de agresividad, de interacción social difícil y en conductas de alto riesgo, aumentan su producción (Valdés y de Flores, 1990).

La norepinefrina se ha usado como indicador de la capacidad adaptativa, así sus concentraciones fluctúan según las apreciaciones que el organismo hace de la situación y de los recursos para afrontarla.

La **epinefrina**, casi en su totalidad, es producida por la médula adrenal. Se ha considerado como el indicador bioquímico emocional del sujeto. Se incrementa en el estrés y en los estados de ansiedad e incertidumbre (Ax, 1953). La estimulación de los nervios simpáticos como las situaciones de estrés aumentan su producción. Una disminución rápida de los niveles de epinefrina se ha considerado un correlato de bienestar físico y psicológico (Valdés y de Flores, 1990)

Como la norepinefrina tiene unos efectos fisiológicos diferentes a los de la epinefrina, cabe preguntarse si la secreción de una y otra no está en relación con la naturaleza de la emoción producida por el agente estresante. En trabajos realizados en la especie humana, se ha podido comprobar que existe un aumento de secreción de epinefrina en los estados de ansiedad, sobre todo cuando la situación agresiva es de naturaleza incierta y el individuo se ve incapacitado para hacer los reajustes necesarios ante la nueva situación; por el contrario, la secreción de norepinefrina predomina en los estados de cólera o de irritación, o cuando, en la agresión, están controladas sus consecuencias, con lo que se presentan respuestas activas y apropiadas frente al o los estresantes (Illera, 2000).

Hasta hace relativamente poco tiempo, era muy difícil determinar las concentraciones plasmáticas de norepinefrina y epinefrina, dadas sus exiguas concentraciones. Sin embargo, con la introducción de los métodos inmunoenzimáticos, ya es posible determinar sus concentraciones, además con mucha exactitud, tanto en condiciones basales como en situaciones de estrés. En general, los niveles plasmáticos de norepinefrina reflejan la actividad de los nervios simpáticos, mientras que los de epinefrina son una medida de la secreción de la médula adrenal (Illera, 2000).

4.3.3. ACTIVACIÓN NEUROENDOCRINA

La respuesta neuroendocrina es relativamente lenta puesto que se pone en marcha al cabo de segundos o minutos, y además decrece con el tiempo cuando es repetida ante estímulos que promueven una activación estresante (Valdés y de Flores, 1990).

La activación neuroendocrina se inicia cuando las neuronas neurosecretoras situadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo segregan un péptido llamado Hormona Liberadora de Corticotropina o CRH que inicia la cadena de neurotransmisiones. La CRH y otras hormonas relacionadas, como arginina-vasopresina (AVP), entran en la circulación portal hipofisaria que une el hipotálamo con la hipófisis anterior (Carlson, 1996; Leng y Russell, 1998). La secreción de CRH desde el núcleo paraventricular hipotalámico hacia la circulación portal hipofisaria es modulada por determinadas neuronas aferentes. Además, se ha observado una relación dosis dependiente entre la acetilcolina y la elevación de CRH portal, una inhibición por el GABA y un aumento de la concentración de CRH portal por la epinefrina, a través de mecanismos alfa1- y beta adrenérgicos (Plotsky *et al.*, 1987). En apenas segundos, la CRH activa la hipófisis, que se encarga de liberar corticotropina, también conocida como hormona adrenocorticotropa o ACTH.

La **ACTH** se localiza en las células corticotropas de las *pars distalis*. Es la hormona peptídica más pequeña de la hipófisis anterior y está compuesta de una única cadena lineal que contiene 39 aminoácidos. El papel de la ACTH es estimular la biosíntesis de esteroides en el tejido esteroideogénico adrenal. El cortisol y la corticosterona son los principales glucocorticoides producidos por la glándula adrenal en respuesta a la estimulación por ACTH.

La ACTH una vez liberada, se introduce en el flujo sanguíneo y, a través del sistema circulatorio, estimula a la corteza adrenal para que libere glucocorticoides: cortisol, corticosterona e hidrocortisona. La liberación de

glucocorticoides en situaciones de estrés persigue elevar el nivel de glucosa en la sangre, ayudar a que las grasas se conviertan en energía, aumentar el flujo sanguíneo, estimular las respuestas conductuales al tiempo que inhibe actividades vegetativas innecesarias en tales momentos (Munck *et al.*, 1984; Carlson, 1996).

Los efectos de los **glucocorticoides** ante la respuesta al estrés son importantes y necesarios, sin embargo, su activación a largo plazo puede generar efectos dañinos en la salud tales como aumento de la presión sanguínea, daño en el tejido muscular, diabetes esteroidea, infertilidad, inhibición del crecimiento, de las respuestas inflamatorias e inmunológicas (Carlson, 1996) e incluso daños en estructuras cerebrales como el hipocampo (McEwen, 1999).

Mediante las acciones permisivas de los glucocorticoides se produce un incremento de la actividad simpatoadrenal. De hecho, la actividad simpatoadrenal se encuentra generalmente deprimida en su ausencia, lo que puede conducir a la muerte del individuo. Los glucocorticoides estimulan la acción lipolítica de las catecolaminas en el tejido adiposo. Las acciones de los glucocorticoides son más lentas sobre los procesos metabólicos que las acciones rápidas de las catecolaminas, pero proporcionan la respuesta secundaria (resistencia) imprescindible para la continuidad de la acción simpatoadrenal y la gluconeogénesis hepática (Hadley, 1997).

Además, según Hadley (1997) los glucocorticoides intervienen en:

- Metabolismo de lípidos, proteínas y glúcidos: además de incrementar la síntesis de varias enzimas clave en la vía gluconeogénica dentro de los hepatocitos, también intervienen en la proteólisis muscular y lipólisis de las grasas.

- Papel en la reproducción: involucradas en el proceso del parto en animales domésticos, especialmente en ovejas. En este sentido, los niveles plasmáticos de corticosterona se elevan en el feto de oveja varios días antes del nacimiento.
- Efectos en el sistema nervioso: esteroides adrenales de origen fetal o materno pueden desempeñar un papel importante en la primera “impresión” del SNC.
- Acciones antiinflamatorias e inmunosupresivas.

La magnitud de la respuesta estresante del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, está limitada tanto por mecanismos neuronales como hormonales para mantener los niveles de glucocorticoides dentro de los límites tolerables (Herman y Cullinan, 1997). La retrofuncionalidad negativa de los glucocorticoides se produce tanto a nivel de hipófisis e hipotálamo, como a nivel de otros centros cerebrales superiores (Hadley, 1997).

Por otro lado, es importante tener en cuenta que los niveles de cortisol siguen un ritmo circadiano (Singh *et al.*, 1975; Illera *et al.*, 1993a) con lo que las concentraciones basales pueden variar según el momento en el que se haga la toma de sangre.

La corticosterona es el principal corticosteroide secretado *in vivo* en el conejo. Normalmente el ratio corticosterona/cortisol, en la sangre venosa adrenal, es de 20:1. Sin embargo, hay autores que señalan que el principal glucocorticoide en el conejo es el cortisol (De Paolo y Masono, 1989).

En resumen, desde el punto de vista neurofisiológico se han descrito tres sistemas involucrados en la respuesta al estrés:

- Sistema nervioso central (procesador de la información): es quien se encarga de reconocer y procesar la información que puede ser estresante o no.
- Sistema autonómico: que se encarga de generar la primera respuesta al estrés. Esta respuesta se caracteriza por la liberación de catecolaminas: Norepinefrina y Epinefrina.
- Sistema neuroendocrino: que genera una respuesta más lenta en el tiempo y, básicamente, se encarga de liberar los glucocorticoides quienes contribuyen en la activación general del sistema nervioso y en la preparación al organismo para reaccionar.

Estos sistemas siguen un mecanismo de feedback constante que tiene como consecuencia un incremento, mantenimiento o disminución de la activación producida por el estrés.

4.3.4. SEROTONINA Y ESTRÉS

Durante los últimos años, se está estudiando la posible influencia de la serotonina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, comprobándose la interacción entre ambos a múltiples niveles. Hay una evidencia farmacológica que indica que los receptores de serotonina en el cerebro pueden activar el eje HHA en ratas (Fuller, 1990). El papel fisiológico de la influencia serotoninérgica sobre la función hipófisis-adrenocortical no está todavía claro, pero la serotonina puede desempeñar un papel importante en el ritmo circadiano de la secreción adrenocortical y en la activación hipófisis-adrenocortical por ciertos tipos de estrés (Szafarczyk *et al.*, 1980; Fuller, 1992). Entre los múltiples receptores de serotonina que existen en el cerebro, al menos dos (5-HT_{1A} Y 5-HT₂) parecen mediar la activación de la función hipófisis-adrenocortical (Fuller, 1992).

Los sistemas monoaminérgicos centrales se activan con condiciones estresantes. Se cree que estos cambios resultan en modificaciones en el comportamiento así como en la cascada de liberación de hormonas desde el eje adrenal. Los sistemas serotoninérgicos son activados rápidamente (30 segundos) o lentamente (1 semana) tras los acontecimientos estresantes. La rápida inactivación de la respuesta del eje HHA, presumiblemente vía hipocampal y por retrofuncionalidad, contrasta con la lenta y crónica activación de la reacción serotoninérgica en la amígdala medial en animales subordinados, una respuesta que es intensificada por la corticosterona periférica.

La reacción serotoninérgica puede ser de dos tipos: por un lado, hay una regulación negativa del eje HHA, rápida y corta, a través de determinadas regiones del cerebro, como el hipocampo. Por otro, existe una regulación positiva de este eje, lenta y crónica, a través de la amígdala (Emerson *et al.*, 2000).

En general, podemos hablar de conexiones neuroanatómicas directas o indirectas entre el sistema serotoninérgico y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. En primer lugar tenemos las conexiones neuroanatómicas directas. Así, se conoce que algunas de las neuronas serotoninérgicas van desde el núcleo del rafe hacia el núcleo paraventricular y hacen sinapsis con neuronas CRH (Fuller, 1992). Otra conexión directa entre el circuito serotoninérgico y el eje límbico-hipotálamo-hipófisis-adrenal ocurre en el hipocampo, el cual parece desempeñar un papel importante en la modulación de la respuesta hormonal al estrés (López *et al.*, 1999).

Además de estas conexiones directas, el sistema serotoninérgico también puede influir dicho eje a través de circuitos indirectos. También se dirigen hacia otras áreas del cerebro, tales como la amígdala y el núcleo supraquiasmático, los cuales modulan la función del núcleo paraventricular y juegan un papel importante en la respuesta al estrés (López *et al.*, 1999).

Feldman *et al.*, en el 2000, demostraron que la estimulación directa de norepinefrina y serotonina en la amígdala, activa el eje HHA y que este efecto depende de la presencia de estos neurotransmisores excitatorios a nivel hipotalámico.

La estimulación farmacológica con agentes serotoninérgicos, como precursores, inhibidores de su eliminación, estimulantes de su liberación y agonistas directos, puede activar la liberación de ACTH, CRH y corticosterona en ratas (Fuller, 1992). Muchas áreas del cerebro que expresan receptores 5-HT tienen gran cantidad de receptores corticosteroides; por ejemplo, el hipocampo tiene altas concentraciones de 5-HT en las mismas neuronas que contienen altos niveles de receptores para glucocorticoides (López *et al.*, 1999).

Pero la serotonina y los receptores corticosteroides no sólo interactúan anatómicamente, sino también funcionalmente. Se ha demostrado que la administración de serotonina puede regular los receptores glucocorticoides, y que la destrucción farmacológica de proyecciones serotoninérgicas disminuye los niveles de ARNm de glucocorticoides en el hipocampo (Seckl *et al.*, 1990). Algunos estudios indican acciones excitatorias de 5-HT sobre la liberación de ACTH y corticosterona, mientras otros indican que dependiendo de la concentración facilitará o inhibirá efectos en el tono del eje HHA (Herman y Cullinam, 1997). En el otro sentido, también ha sido demostrado que la adrenalectomía y administración de corticosteroides regulan el número de receptores 5-HT_{1a} en el hipocampo (Chalmers *et al.*, 1993, 1994).

También se ha observado que la unión a receptores 5HT-2 puede ser regulado por glucocorticoides y por el estrés. También hay evidencia que CRH puede influir la liberación de serotonina. Por tanto, la simultánea hipersecreción de componentes centrales y periféricos del eje HHA puede tener un impacto aditivo en la función serotoninérgica (López *et al.*, 1999).

5. INFLUENCIA DE LA ANESTESIA SOBRE EL ESTRÉS

Existe un deseo humano de reducir al mínimo el dolor y estrés en animales de laboratorio, un principio que es reconocido en la legislación europea y nacional. Otro requerimiento incluido en la mayoría de las leyes europeas y nacionales es que debe utilizarse una analgesia, sedación o anestesia apropiada en aquellos procedimientos que causen un sufrimiento en los animales (FELASA, 1994).

En este sentido, el 24 de noviembre de 1986 se aprobó la Directiva del Consejo 86/609/CEE, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, garantizando que se les conceda un trato que evite al máximo el dolor, el sufrimiento, el estrés o la lesión prolongados innecesariamente.

En España, el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos señala, en su artículo 12, que los experimentos deberán llevarse a cabo con anestesia general o local, salvo que se considere que ésta es más traumática para el animal que el experimento en sí o que sea incompatible con los fines del experimento. En definitiva, se trata de lograr el mayor bienestar animal y reducir al mínimo el estrés de los animales de experimentación.

Sin embargo, habría que plantearse la posibilidad de que el mismo anestésico fuese capaz de desencadenar una respuesta estresante. En este sentido, estudios previos realizados en nuestro Departamento han demostrado que el empleo de determinados anestésicos inyectables puedan desencadenar por sí solos una respuesta estresante (Illera *et al.*, 2000).

Aunque el origen del mecanismo molecular responsable de las potencias relativas de varios anestésicos inhalatorios permanece oscuro, las diferencias

significativas en sus capacidades para alterar las concentraciones de varios neurotransmisores del SNC ha sido documentada suficientemente (Forman, 1998; Metha y Ticku, 1999). De esta manera ha sido observado la influencia de distintos anestésicos sobre determinados receptores y neurotransmisores, como hemos señalado anteriormente en los mecanismos de acción.

La mayoría de estos neurotransmisores están implicados en la respuesta del organismo al estrés. Por tanto, es posible que los distintos anestésicos pudiesen actuar sobre estos mismos neurotransmisores modificando esa respuesta al estrés, estimulándola, inhibiéndola, o no afectando a dicha respuesta.

Existen numerosos trabajos que muestran distintas respuestas endocrinas debidas a la anestesia tanto inhalatoria como parenteral (Traynor y Hall, 1981; Oyama y Wakayama, 1988). Así, se ha observado la influencia del anestésico inhalatorio halotano sobre las concentraciones sanguíneas de corticosterona en ratas (Carlberg *et al.*, 1995), de cortisol en ovejas (Green y Moor, 1977) o en perros (Fox *et al.*, 1994), de ACTH en équidos (Luna y Taylor, 1995; Brodbelt *et al.*, 1998) y sobre catecolaminas, cortisol y ACTH en humanos (Crozier *et al.*, 1992; García-Sánchez *et al.*, 1993). Karuri *et al.*, en 1998a, señalaron la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal tras la administración de halotano en ratas.

Otros anestésicos inhalatorios, como isoflurano o sevoflurano, también se han visto implicados en la respuesta endocrina en humanos (Crozier *et al.*, 1992; García-Sánchez *et al.*, 1993; Castillo *et al.*, 1997; Hase y Meguro, 2000; Özkan *et al.*, 2001) observándose cambios significativos tras la administración del anestésico. Tohei *et al.*, en 1997, observó una activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal tras la administración repetida de éter en ratas.

Este efecto anestésico sobre los parámetros mencionados anteriormente, no sólo ha sido documentado con anestésicos inhalatorios sino

también tras la administración de distintos anestésicos parenterales, como ketamina-díacepam en cerdos, ponies y en humanos (Gerard *et al.*, 1996; Luna *et al.*, 1997b; Adams *et al.*, 1994 y Adams, 1997), tras la administración de tiopental en ratas, en cerdos y en ponies (Pesotto *et al.*, 1995; Dalin *et al.*, 1993; Taylor, 1990) y tras la inyección de pentobarbital en cabras, caballos, ovejas y pollos (Mohamed y Cox, 1987, Sanhoury *et al.*, 1990; Taylor, 1990; Green y Moor, 1977; Nir *et al.*, 1976).

En nuestro Departamento, hemos investigado recientemente la influencia de anestésicos intravenosos sobre las concentraciones sanguíneas de corticosterona y de cortisol en el conejo NZW. Observamos un aumento significativo en las concentraciones de estos glucocorticoides tras la administración de ketamina-díacepam y de tiopental, mientras que hubo un descenso significativo tras la inyección de pentobarbital y de fentanilo-droperidol, no observándose diferencias significativas tras la administración de ketamina-xilacina (González Gil *et al.*, 2001a,b).

MATERIAL Y MÉTODOS

I. ANIMALES

1. - Especie Animal utilizada

Para la realización de nuestro estudio se han utilizado un total de 30 conejos hembras de la estirpe Blanco de Nueva Zelanda (NZW). El peso de los animales estaba comprendido entre 3,2 y 4,5 kg. Todos los animales procedían de la Granja Cunicula San Bernardo, S.A. (Tulebras, Navarra), calificada y registrada como Centro de Cría y Centro Suministrador de Animales de Laboratorio. Se certificó que los animales cumplían los requisitos de la normativa sanitaria vigente para ser transportados, no habiendo sido detectado en su colonia de origen síntoma alguno de enfermedad en el momento de la expedición del pedido.



2. - Criterios de selección de la población estudiada

La población fue seleccionada al azar, pero siguiendo unos criterios determinados.

En primer lugar, se tuvo en cuenta la estirpe eligiendo Blanco de Nueva Zelanda. Creímos oportuno utilizar esta estirpe dada la gran difusión que tiene como animal de experimentación. Además, el efecto de la anestesia sobre los perfiles hormonales y bioquímicos no está bien determinado en esta especie y las referencias bibliográficas son escasas (Bito y Eakins, 1969; Collado *et al.*, 1987).

En segundo lugar, se dispuso de una población control, con las mismas características, alojada bajo las mismas condiciones y recibiendo idéntico manejo y alimentación para favorecer la homogeneidad de los resultados y que

éstos pudieran ser representativos del efecto de los distintos anestésicos sobre las concentraciones de los distintos parámetros analizados, al no aplicarse a los animales seleccionados ningún tipo de tratamiento anestésico.

Se comprobó, además, el estado sanitario de los animales analizados, para asegurar que éste era el adecuado. Los animales no mostraron evidencia serológica de patología y estaban libres de patógenos reconocidos (*Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Trichophyton microsporum*, *Escherichia Coli*, coccidios, ectoparásitos y endoparásitos).

3. - Condiciones de alojamiento

Los animales fueron alojados en las habitaciones destinadas para esta especie en el animalario del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, U.C.M., que reúne los requisitos exigidos por la Comunidad de Madrid (número de registro EX – 011 – U) y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Animalario registrado con el número 28079-26A).

Las condiciones de alojamiento fueron las siguientes: se utilizaron jaulas individuales de acero inoxidable de 48 x 61 x 46 cm, con un recipiente de recolección debajo, que se vacía y limpia diariamente. La comida se administró en forma de pellet comercial específico de lagomorfos (Purina Lab Rabbit Chow, Purina, Barcelona) a razón de 150 g/día y el agua de bebida se administró “*ad libitum*”, con la utilización de bebederos automáticos.

La habitación se mantuvo con ambiente controlado, a una temperatura de 20-22 °C; la humedad relativa del aire fue de 50-55 % y 10-15 renovaciones de aire por hora. La iluminación de la habitación se reguló automáticamente utilizando un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h durante toda la experimentación. En estas condiciones permanecieron los animales durante el período de aclimatación de 15 días y el período experimental. Todos los animales fueron explorados y examinados diariamente comprobando su buen estado de salud.

La experimentación con estos animales se realizó según lo estipulado en el RD 223/1988 del 14 de Marzo, que regula la protección de los animales utilizados en experimentación y siguiendo la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*) (National Research Council, 1996).

II. PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN

El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M. (01/2004/TD).

1. - División en Grupos

Los animales se dividieron en los siguientes grupos:

1.1. - Grupo Control (C)

Este grupo estuvo constituido por un total de 10 animales. Se les administró 100 % oxígeno pero no recibieron ningún tratamiento anestésico.

1.2. - Grupo Halotano (H)

Este grupo estuvo formado por 10 animales. Se les administró halotano/oxígeno.

1.3. - Grupo Isoflurano (I)

Estuvo formado por un total de 10 animales. Se les administró isoflurano/oxígeno.

Todos los animales fueron identificados adecuadamente en una placa de identificación situada en cada jaula.

2. - Fases de la Experimentación

2.1. - Etapas en los grupos problema (H, I)

2.1.1. - Etapa Inicial

Durante esta etapa se procede a la monitorización de la frecuencia cardiaca y respiratoria, temperatura rectal y a la toma de sangre previa a la administración del anestésico/oxígeno. Para la toma de sangre, los animales fueron situados en cepos o jaulas de inmovilización (B&K Universal Limited, Barcelona, España). Además, se hizo pasar un flujo de 4 litros/minuto de oxígeno durante 2 minutos para limpiar el circuito anestésico y asegurarse que no quedaban residuos de agentes anestésicos.



2.1.2. - Etapa de pre-oxigenación

En esta etapa todos los grupos de tratamiento anestésico recibieron oxígeno 100 % a un flujo de 4 litros/minuto, durante 2 minutos, previamente a la administración del anestésico. El animal fue inmovilizado manualmente, sujetándolo suave pero firmemente. Cuando fue necesario, esta inmovilización fue mayor. El sistema anestésico empleado fue el Sistema en T de Ayre con modificación de Jackson-Rees. Este sistema es recomendado para animales pequeños de peso inferior a 5 kg, debido a su mínimo espacio mecánico muerto y la resistencia del sistema (Clutton, 2001). Se utilizó una mascarilla facial (Anaesthesia-Small, McCulloch Medical, Nueva Zelanda) que se ajustaba perfectamente alrededor del hocico, sin obstruir la boca ni la nariz, y que proporcionaba un espacio muerto mínimo.



2.1.3. - *Inducción de la anestesia*

Esta etapa consta de la administración del oxígeno junto al anestésico con mascarilla facial hasta la pérdida de los reflejos pedal, auricular y de enderezamiento. El reflejo palpebral y corneal tan sólo se pierden en estados de anestesia quirúrgica profunda (Sumano y Ocampo, 1997). En estos grupos, la concentración del anestésico comenzó con 0,5 % y fue aumentando en incrementos de 0,5 % en el vaporizador cada 30 segundos con el fin de evitar períodos prolongados de apnea que son frecuentes cuando la inducción es más rápida (Hedenqvist *et al.*, 2001). En caso de que se observase un episodio de apnea en el animal, procederíamos a retirar la mascarilla y volver a colocarla cuando el animal volviese a respirar. La concentración anestésica fue mantenida a su máximo nivel hasta que la inducción fuese completa. Los períodos de apnea fueron anotados. Durante esta etapa el animal se mantuvo fuera de la jaula de inmovilización, sobre la mesa del quirófano con el fin de poder evaluar la pérdida o no de los distintos reflejos. Al igual que la etapa anterior, el animal fue inmovilizado manualmente y cuando fue necesario, esta inmovilización fue mayor, sobre todo en los intentos de escapada del animal al colocar la mascarilla. Se empleó un vaporizador específico para el halotano (Fluotec Mark 2, Cyprane LTD, Keighley, Reino Unido) en el grupo H, y otro específico para el isoflurano (Isotec 3, Ohmeda, West Yorkshire, Reino Unido) en el grupo I. El flujo de oxígeno fue de 4 litros/minuto.



2.1.4. - Etapa de intubación

Una vez que se comprobó que el animal no respondía a la estimulación de los reflejos de enderezamiento, auricular y, sobre todo, pedal, se procedió a la intubación de los animales. Se situó al animal en decúbito dorsal sobre la mesa de quirófano y con el cuello extendido hacia atrás. Para la visualización directa de la laringe utilizamos un otoscopio (Riedle, Alemania) con un cono lo suficientemente largo y ancho para permitir la localización directa de esta zona. Una vez localizada la laringe, se roció con un spray de lidocaína (Xilonibsa, Lidocaína base, Laboratorios Inibsa S.A., Barcelona, España). A continuación se hizo pasar una sonda urinaria de gato, sin la estructura de fijación (de manera que se pueda pasar a través del espéculo del otoscopio), de tamaño apropiado, a través del otoscopio. Una vez que la sonda pasó a través de la laringe, se retiró el otoscopio y luego se hizo pasar el tubo endotraqueal sobre la sonda en dirección a la tráquea. El tubo endotraqueal (Ruschelit, Kern, Alemania) era de polietileno claro y tenía un diámetro de 3 o de 3,5 mm

según el tamaño del animal. Se le aplicó gel de lidocaína (Xylocaina Gel Acordeon, Laboratorios Inibsa, Barcelona, España) en el extremo del tubo. Después se retiró la sonda y el tubo se fijó en la mandíbula con una cinta.



2.1.5. - Mantenimiento de la anestesia

Durante este período se administró el anestésico/oxígeno correspondiente a cada grupo a través del tubo endotraqueal. Se realizaron tomas de sangre, monitorización de la frecuencia cardiaca y respiratoria, temperatura rectal y de los distintos reflejos a determinados intervalos de tiempo. La duración de esta etapa fue de 30 minutos en todos los grupos, y el animal se

mantuvo fuera de la jaula de inmovilización, sobre la mesa de quirófano.



2.1.6. - Etapa post-anestésica



Durante esta etapa se retiró el suministro del anestésico y se le administró únicamente oxígeno hasta que el animal fue recuperando los reflejos pedal y auricular. En este momento, se le retiró cuidadosamente el tubo endotraqueal. Una vez que los animales recuperaron el reflejo de enderezamiento e intentaban ponerse por si mismos en decúbito esternal desde el decúbito dorsal, fueron llevados a su jaula de alojamiento. Se comprobó que su recuperación de la anestesia fuese total. Sólo se

pasaron a las jaulas de inmovilización cuando se les monitorizó la frecuencia cardíaca, respiratoria, temperatura rectal y se les tomó las distintas muestras de sangre a los 60 y 120 minutos y a las 24, 48 y 72 horas de la intubación del animal.

2.2. - Etapas en el grupo control (C)

Con el fin de que el grupo control fuese lo más homogéneo posible y estuviese en las mismas condiciones que los grupos problemas, intentamos reproducir las etapas llevadas a cabo en estos últimos grupos, sustituyendo la administración del anestésico/oxígeno por la administración únicamente de oxígeno 100 %. Además, no se llevó a cabo la intubación endotraqueal ya que el animal no recibió ningún tratamiento anestésico y sería muy traumático. Intentamos que los grupos controles, a los que sólo se les administró oxígeno como tratamiento, recibiesen este oxígeno el mismo tiempo durante el cual los grupos problemas recibieron el tratamiento anestésico. De esta manera tuvieron 2 minutos de preoxigenación (4 litros/minuto) al igual que en los grupos controles. Posteriormente se les administró otros 8 minutos de oxigenación (4 litros/minuto), que coincide aproximadamente con el tiempo de inducción de la anestesia en los grupos problemas. Por último, se les administró también 30 minutos de oxígeno (2 litros/minuto), al igual que el tiempo de mantenimiento de la anestesia en los grupos problemas. Por tanto, la duración total de la administración del oxígeno fue de 40 minutos. La administración fue a través de mascarilla facial durante todo el tiempo. Los animales fueron alojados en las jaulas de inmovilización durante las distintas tomas de sangre. Después de la administración del oxígeno, los animales fueron trasladados a sus jaulas de alojamiento, excepto cuando se introdujeron en

las jaulas de inmovilización para realizar las tomas de sangre o la monitorización de la temperatura rectal, frecuencia cardíaca y respiratoria.

3. - Tratamiento de los Grupos

Los distintos porcentajes de anestésico administrado, flujo de oxígeno y duración de los distintos períodos en cada grupo están representados en la siguiente tabla:

Tabla 1: Flujo de oxígeno, tiempo y porcentaje de anestésico administrado durante la preoxigenación, inducción anestésica y mantenimiento de la anestesia.

PREOXIGENACIÓN INDUCCIÓN ANESTESIA MANTENIMIENTO ANESTESIA

Grupo	Flujo de O2	Tiempo/min	Anestésico %	Flujo de O2	Anestésico %	Flujo de O2	Tiempo
CONTROL	4 l/min	2 min	-	4 l/min	-	2 l/min	30 min
HALOTANO	4 l/min	2 min	3-4%	4 l/min	1-2%	2 l/min	30 min
ISOFLURANO	4 l/min	2 min	4-5%	4 l/min	2-3%	2 l/min	30 min

HALOTANO: (Fluothane®) Halotano (D.C.I.), 250 ml.

Zéneca Farma, S.A.; Porriño, Pontevedra, España.

ISOFLURANO: Isoflurano (D.C.I.), 250 ml.

Laboratorios Inibsa, S.A.; Llicá de Vall, Barcelona, España.

4. - Extracción Sanguínea y Procesado de las Muestras

Nuestro estudio fue realizado, siempre, entre las 11:00-14:00 horas a.m. con el fin de que existiese la menor variación posible en los parámetros evaluados debido a cambios por los ritmos circadianos. En primer lugar se hizo una toma previa a la administración de la anestesia. Posteriormente se administró el anestésico/oxígeno y se hicieron las sucesivas tomas de sangre a los 1, 10, 30, 60 y 120 minutos y a las 24, 48, y 72 horas de la intubación del animal.

La extracción sanguínea se realizó en la arteria central de la oreja. Para la obtención de la sangre se utilizaron agujas de 21G utilizando el método de Illera *et al.* (1990), mediante el cual se consiguen cantidades suficientes de sangre evitando la lesión del vaso y sin forzar la salida de la sangre para no provocar hemolisis. Para obtener suero, dejamos la sangre coagular, unas dos horas a temperatura ambiente (20-22 °C) en tubos estériles de vidrio. Se conoce que cuanto más tiempo se deja para que la retracción del coágulo tenga lugar, hasta alrededor de 2 horas, mayor cantidad de suero se obtendrá, aunque la cantidad de suero nunca será mayor de un 40% del volumen original de sangre. La retracción del coágulo ocurre uniformemente en los tubos de vidrio, puesto que el coágulo no se adhiere a las paredes del tubo, como ocurre a menudo en los recipientes de plástico (Bush, 1982). La cantidad recogida en cada toma fue de aproximadamente de 5 ml.

Posteriormente se llevaron las muestras a centrifugar en una centrífuga Minifuge RF (Heraeus, Hannover, Alemania) a 3.500 r.p.m. y a 4 °C durante 20 minutos. Se separó el suero utilizando una pipeta y se alicuotó en tubos de plástico de 15 x 50 mm, taponados y sellados con parafilm (American National Can, Greenwich, USA). Cada tubo y cada alícuota se identificó y etiquetó con el número de animal, nombre del anestésico utilizado, toma de sangre y fecha de recogida. El plasma se almacenó y conservó a -30 °C en un congelador, hasta su posterior análisis.

III. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS Y METODOLOGÍA UTILIZADA

1. - EVALUACIÓN DE LA PROFUNDIDAD ANESTÉSICA, DE LA FUNCIÓN CARDIO-RESPIRATORIA Y DE LA TEMPERATURA RECTAL

1.1. REFLEJOS

La profundidad de la anestesia fue monitorizada por la pérdida o no de los reflejos palpebral, corneal, pedal, auricular y de enderezamiento. Cualquier pequeño movimiento fue considerado como positivo. Los distintos reflejos fueron monitorizados durante la inducción de la anestesia y a los 1, 10, 30, 60 y 120 minutos, y a las 24, 48 y 72 horas de la intubación del animal. Además, la monitorización de estos reflejos fue más frecuente en el momento de la inducción y recuperación de la anestesia con el fin de obtener los tiempos de inducción y recuperación de la misma.

El reflejo palpebral fue anotado como ausente cuando no hubo respuesta al aplicar una torunda de algodón en la parte dorsal del párpado. Igualmente, el reflejo corneal fue considerado negativo cuando no hubo respuesta al tocar la córnea con una torunda de algodón húmedo. El reflejo auricular y pedal fueron testados al aplicar una presión al cerrar unas pinzas mosquito en la parte distal de la oreja izquierda o en el tercer dedo en la pata izquierda trasera, respectivamente (Hellebrekers *et al.*, 1997). El reflejo fue considerado como negativo cuando no hubo movimiento de la oreja o de la pata. Para el reflejo de enderezamiento (righting reflex) se valoró el intento o no para ponerse por si mismo de decúbito dorsal a esternal, siendo negativo cuando no hay intención por parte del animal de recuperar la posición de decúbito esternal.

1.2. FRECUENCIA CARDÍACA Y RESPIRATORIA

Para la determinación de la frecuencia cardiaca se utilizó un electrocardiógrafo (Bexgraph, Bexen-Osatu, Vizcaya, España). Se empleó la derivación II, situando los electrodos en la parte anterior de las patas delanteras y en la parte anterior de la pata trasera izquierda, zonas que fueron previamente rasuradas para lograr un mejor contacto del electrodo con la piel. La velocidad de salida del papel fue de 50 mm/seg y la amplitud de 1 cm/mV. Se contaron las ondas R comprendidas en el espacio de papel del electrocardiograma equivalentes a 10 segundos y se multiplicó por 6, obteniéndose la frecuencia cardiaca/minuto.

Para la determinación de la frecuencia respiratoria, se observaron los movimientos respiratorios torácico-abdominales durante 15 segundos y a continuación se multiplicó ese valor por 4, obteniéndose la frecuencia respiratoria/minuto.

Ambas frecuencias fueron monitorizadas antes de la anestesia y a los 1, 10, 30, 60 y 120 minutos, y a las 24, 48 y 72 horas de la intubación del animal.

1.3. TEMPERATURA RECTAL

Para determinar la temperatura rectal durante el proceso anestésico, se usó una sonda adecuada para uso rectal (Thermometer 0331, Panlab, Barcelona, España). Se insertó unos 4 cm en el recto. La temperatura rectal también fue monitorizada a los mismos tiempos que la frecuencia cardiaca y respiratoria.

2. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ACTH

Para la evaluación de las concentraciones séricas de ACTH se utilizó el Kit DSL-5100 ACTIVE® Adrenocorticotropic Hormone (ACTH) Coated-Tube Immunoradiometric Assay (IRMA) Kit (DSL Diagnostic System Laboratories, Inc., Webster, Texas, USA). El kit RIA es un ensayo no competitivo, del tipo “sandwich” (entre dos anticuerpos). El primer anticuerpo es inmovilizado en las paredes interiores de los tubos. El otro anticuerpo está marcado con una sustancia radiactiva para su posterior detección. La sustancia a detectar, en nuestro caso la ACTH presente en las muestras, estándares y controles, se une a los anticuerpos formando un complejo “sandwich”. Los reactivos que no se unen son eliminados por decantación y lavado de los tubos.

2.1. Contenido del kit

- ⇒ Estándares de ACTH.
Siete viales, de 1 ml cada uno, marcados desde A-G, contienen concentraciones de aproximadamente 0, 6, 20, 55, 225, 750 y 2000 pg/ml de ACTH. La T^a de mantenimiento es de 2-8 °C.
- ⇒ Reactivo Anti-ACTH [I-125].
Un vial, de 5,5 ml, que contiene < 10 µCi (370 kBq) de anti-ACTH marcado con [I-125] en un tampón con ázida sódica. La T^a de almacenamiento es de 2-8 °C .
- ⇒ Tubos marcados con anti-ACTH.
100 tubos de plástico marcados con el anticuerpo de ACTH en el interior de las paredes de cada tubo. La T^a de almacenamiento es de 2-30 °C.
- ⇒ Controles de ACTH.

2 viales de 1 ml cada uno, que contienen una concentración baja (control 1) y alta (control 2) de ACTH en un tampón con ázida sódica. La T^a de almacenamiento es de 2-8 °C.

⇒ Solución de lavado concentrada.

Un bote de 18 ml, que contiene la solución de lavado concentrada. Hay que diluirla 50 veces con agua desionizada o destilada antes de usar.

Materiales necesarios no provistos en el kit

- . Tubos de plástico de 12 x 75 mm.
- . Gradilla para tubos de 12 x 75 mm.
- . Agua desionizada o destilada.
- . Pipeta de precisión: 200 µl.
- . Pipeta de repetición: 50 µl y de 2,5 ml.
- . Vórtex.
- . Absorbente o similar para decantación de los tubos.
- . Papel absorbente.
- . Contador gamma.
- . Agitador (180 r.p.m).

2.2. Preparación de los reactivos

Solución de lavado: Diluir el contenido total de la solución de lavado concentrada (18 ml) en agua destilada hasta un volumen total de 900 ml.

2.3. Realización del test

Todos los reactivos y muestras deben de alcanzar la T^a del laboratorio (≈ 25 °C).

- 2.3.1. Preparar la Solución de lavado como se ha descrito anteriormente.
- 2.3.2. Marcar 2 tubos para el Contaje Total. Marcar los tubos por duplicado para los Estándares, Controles y muestras.
- 2.3.3. Pipetear 200 μ l de los Estándares, Controles y muestras en los tubos apropiados.
- 2.3.4. Inmediatamente añadir 50 μ l de reactivo anti-ACTH en todos los tubos.
- 2.3.5. Vortear durante 1-2 segundos.
- 2.3.6. Incubar todos los tubos a T^a ambiente durante 18-22 horas (preferiblemente en un agitador a 180 r.p.m).
- 2.3.7. Aspirar o decantar todos los tubos, excepto los de Contaje Total, simultáneamente sobre un receptáculo de residuos radiactivos. Golpear los tubos sobre material absorbente para facilitar el drenaje completo y luego permitir este drenaje sobre material absorbente durante 1-2 minutos.
- 2.3.8. Lavar todos los tubos, excepto los de Contaje Total, añadiendo 2,5 ml de Solución de lavado, empleando una pipeta de repetición.
- 2.3.9. Repetir paso 2.3.7.
- 2.3.10. Repetir pasos 2.3.8. y 2.3.9. dos veces, para un total de 3 lavados.

2.4. Lectura de los tubos

Una vez realizado los distintos pasos para la realización del test, se procede al contaje de todos los tubos en un contador gamma durante un minuto. Para ello empleamos un contador gamma (Wallac 1470, WIZARD®, Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Life Sciences; Turku, Finland). Toda la realización del test fue llevada a cabo en la Instalación Radiactiva Central (IRC) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

2.5. Cálculo de los resultados

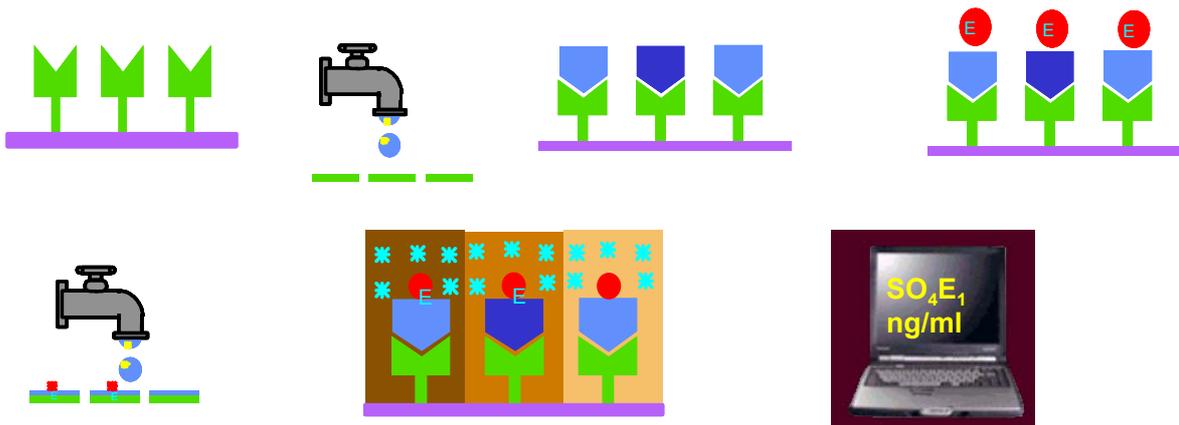
El procesado de los resultados obtenidos en el análisis hormonal, se realizó también con la ayuda del programa informático diseñado, especialmente para ello, en el Departamento de Informática de la Universidad de California (Davis, USA).

En este caso calcula la curva patrón enfrentando las concentraciones estándar de cada una de las hormonas con sus respectivas diluciones (eje de abcisas) y el porcentaje de unión de las muestras estándar con el anticuerpo (E/E_0) (eje de ordenadas).

A continuación, el programa calcula las concentraciones de las muestras problema tomando como referencia las curvas patrón. Para expresar estas concentraciones en las unidades correctas es necesario la introducción de un factor de corrección en función de la dilución que hayamos utilizado.

3. - DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE CORTISOL Y CORTICOSTERONA

3.1. - Fundamento de la Técnica EIA de Competición



La técnica EIA (Enzyme Immuno Assay) de competición se basa en la competición que se establece entre la hormona sin marcar (problema o estándar) y la hormona marcada con una enzima, por unirse a los sitios de unión de un anticuerpo que se ha fijado previamente a una fase sólida. A continuación se mide la fracción unida al anticuerpo mediante la reacción del sustrato con la enzima, lo cuál se traduce en una reacción de oxidación con un cromógeno que lleva incorporado el sustrato, produciéndose una reacción coloreada. Posteriormente se lee la absorbancia del color desarrollado el cual será inversamente proporcional a la cantidad de hormona marcada que se ha unido al anticuerpo.

3.2. - Materiales y Reactivos Utilizados

3.2.1. - Material:

- ⇒ Microplacas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano y con una capacidad 350 μ l por pocillo (Dynatech).
- ⇒ Puntas desechables, para pipetas Eppendorf, de 10-200 μ l y de 100-1000 μ l (Comfortips, Eppendorf).
- ⇒ Puntas de pipeta multicanal, 25-250 μ l (Costar).
- ⇒ Pipetas automáticas Eppendorf (Merck) de 10-100 μ l y 100-1000 μ l.
- ⇒ Pipeta multicanal de ocho canales, de 50-250 μ l (Costar).
- ⇒ Agitador (Vórtex) Reax 2.000 (Heindolph).
- ⇒ Pipetas de cristal de doble enrase de 5 y 10 ml (Protón).
- ⇒ Selladores adhesivos de acetato para placas (ICN Biomedical Inc.).
- ⇒ Tubos de ensayo de cristal de 16 x 100 mm (Beckson Dickinson).
- ⇒ Lector automático de placas (Bio-Tek Instruments).

3.2.2. - Reactivos:

- ⇒ Ácido ortofosfórico: H_3O_4P (Merck).
- ⇒ Agua purificada, calidad HPLC (Departamento Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, U.C.M.).
- ⇒ Albúmina sérica bovina, fracción V: BSA (Cohn, Sigma & Co.).
- ⇒ Anticuerpos policlonales obtenidos y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria, U.C.M.): anticortisol y anticorticosterona (Illera *et al.*, 1992; Illera *et al.*, 1993b; Illera *et al.*, 1997).
- ⇒ Conjugados hormona-peroxidasa, preparados y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria, U.C.M.) para las hormonas anteriormente mencionadas (Illera *et al.*, 1993; Silván *et al.*, 1993; Illera *et al.*, 1997).
- ⇒ Fosfato di-sodio hidrógeno anhidro (HNa_2O_4P) (Merck).
- ⇒ Etanol absoluto: C_2H_5OH (Prolabo).
- ⇒ Hormonas estándar (Steraloids Inc., N.H. USA):
 - 11,17,21-Trihidroxipregn-4-eno-3,20-diona: cortisol.
 - (11 β)-11,21-Dihidroxipregn-4-eno-3,20-diona:
corticosterona.
- ⇒ Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) (Merck).

- ⇒ Cloruro de Sodio (NaCl) (Probus).
- ⇒ Fosfato de Sodio dihidrógeno monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck).
- ⇒ Carbonato de Sodio hidrógeno (NaHCO_3) (Merck).
- ⇒ Tetrametilbenzidina Substrato K: TMB (Labsystems).
- ⇒ Thimerosal: Acido 2- (etilmercurio) benzoico, sal sódica (Merck).
- ⇒ Tween-20 (Merck).

3.2.3. - Soluciones tampón

3.2.3.1. - Carbonato-Bicarbonato: pH: 9,6.

Para 1.000 ml de solución:

Na_2CO_3 : 1,59 g.

NaHCO_3 : 2,93 g.

Thimerosal 1%: 5 ml.

Conservar a 4°C.

3.2.3.2. - Solución Tampón EIA: pH: 7,0.

Para 1.000 ml de solución:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 5,421 g.

Na_2HPO_4 : 8,662 g.

NaCl: 8,7 g.

Albúmina sérica bovina: 1,0 g.

Thimerosal 1%: 5 ml.

Conservar a 4°C.

3.2.3.3. - Solución de Lavado: Solución concentrada.

Para 1.000 ml de solución:

NaCl 1,5 M: 87,66 g.

Tween-20 0,5%: 5 ml.

Conservar a temperatura ambiente.

Se utiliza diluída en una proporción

1:10.

3.2.3.4. - Solución de Frenado: Ácido fosfórico 1M.

Para 500 ml de solución:

H₃PO₄: 28,65 ml.

3.3. - Condiciones del Ensayo

Una vez puesta a punto la técnica EIA de competición, para la determinación de cortisol y corticosterona, se analizan las muestras de plasma de los distintos animales según el criterio de Silván (1991):

3.3.1. - Fase sólida:

Se utilizaron microplacas de poliestiereno de 96 pocillos y fondo plano con selladores de acetato.

3.3.2.- Condiciones de incubación:

- ⇒ Inmovilización del anticuerpo a la fase sólida: 16 horas a 4°C.
- ⇒ Reacción de competición: 2 horas a temperatura ambiente.
- ⇒ Hidrólisis del sustrato: media hora en oscuridad a temperatura ambiente.

La temperatura ambiente no debe superar los 24 °C ya que las reacciones enzimáticas no serían estables pudiendo aparecer variaciones en las medidas de absorbancia.

3.4. - Determinación de las Diluciones Óptimas de Trabajo

Para determinar la dilución óptima de anticuerpo y conjugado para las hormonas debemos enfrentar diluciones diferentes de anticuerpo y conjugado.

Las diluciones de anticuerpo empleadas para cortisol son 1/2.000, 1/4.000, 1/6.000 y 1/12.000 y para el conjugado 1/20.000, 1/40.000, 1/60.000 y 1/120.000. Para corticosterona las diluciones enfrentadas son 1/4.000, 1/8.000, 1/16.000 y 1/32.000 para el anticuerpo y para el conjugado de 1/40.000, 1/80.000, 1/160.000 y 1/320.000.

A continuación se seleccionan las diluciones que presenten una densidad óptica de 0,6 a 0,8 a 450 nm (Munro y Stabenfeldt, 1984), eligiéndose las siguientes:

- Cortisol: 1/8.000 de anticuerpo y 1/80.000 de conjugado.
- Corticosterona: 1/8.000 de anticuerpo y 1/80.000 de conjugado.

3.5. - Determinación de las Curvas Estándar

Para trazar la curva patrón ó estandar de cada una de las hormonas se parte de una solución madre de concentración conocida: 2 mg/ml en etanol absoluto, la cual se va diluyendo sucesivamente hasta obtener un margen de 1 pg a 1 ng utilizando un total de 10 estándares.

Las diluciones se realizan en tubos de vidrio de 10 x 50 mm en etanol absoluto, el alcohol se evapora utilizando un evaporador por corriente continua de nitrógeno (Turbo Vap LV Evaporator, Zymak) a 40 °C y 6 PSI de presión de nitrógeno. A continuación se añade el conjugado, a la dilución de trabajo óptima, a los distintos estándares. Posteriormente se desarrolla la técnica EIA de competición, obteniéndose las diferentes absorbancias medidas a 450 nm. Con dichas determinaciones, se traza la curva estándar que permitirá calcular la concentración de cada hormona de las muestras problemas.

El margen de la curva patrón varía en función de la concentración esperada de la hormona a determinar. En el caso del cortisol y de la corticosterona es de ng/ml.

3.6. - Desarrollo de la Técnica EIA de Competición

Comprende las siguientes etapas:

3.6.1. - Tratamiento de la muestra:

Para la determinación de la hormona cortisol se precisó de un tratamiento previo de las muestras de suero para separar los esteroides que están unidos a las proteínas de transporte. Para ello, se toman 100 µl de suero y se disuelven en 1 ml de etanol absoluto. Dicha mezcla, se agita y centrifuga a 3.500 r.p.m durante 20 minutos a 4 °C. Del sobrenadante se cojerán 100 µl para la determinación de la hormona así procesada y se evapora como en el caso anterior.

3.6.2. - Adsorción de los Anticuerpos a la Fase Sólida:

Diluímos el anticuerpo en tampón carbonato/bicarbonato hasta llegar a la dilución correspondiente. A continuación se tapizan los pocillos con 100 µl excepto el pocillo A1 que se deja como blanco.

Se sellan las placas y se incuban a 4 °C durante 16 horas.

Seguidamente, la placa se lava tres veces con solución de lavado (200 µl por pocillo) para eliminar el exceso de anticuerpo que no se ha fijado a la placa y se seca enérgicamente mediante volteo, en papel de filtro.

3.6.3. - Reacción de Competición:

La reacción se produce entre la hormona libre, ya sea de la muestra ó estandar, y la hormona conjugada a la enzima.

Se diluyen los conjugados en solución tampón EIA convenientemente y se mezclan tanto la muestra problema como la estándar con la dilución apropiada de conjugado. A continuación se procede a diluir las muestras en la solución de conjugado en la siguiente proporción: 50 µl de muestra se diluyen en 150 µl de conjugado en un tubo de ensayo de cristal de 25 x 70 mm y se homogeiniza cuidadosamente mediante un vórtex. Se utilizan 60 µl de esta solución junto con 40 µl de tampón EIA para tapizar los pocillos de la placa de poliestireno.

El tiempo que transcurre desde la dilución de las muestras hasta el tapizado del último pocillo no debe sobrepasar los 10 minutos, debido a que las variaciones de absorbancia observadas en la determinación de una misma muestra, pueden alterar la repetibilidad de la técnica de análisis.

Las placas se sellan, incubándose durante un período de dos horas a temperatura ambiente.

3.6.4. - Separación de las Fracciones de Hormona Libre y Unida a los Anticuerpos Adsorbidos en la Fase Sólida:

Se realiza por volcado de las placas y posterior lavado con 200 μ l de solución de lavado por pocillo (tres veces).

3.6.5. - Adición del Sustrato y del Cromógeno:

En todos los pocillos de la placa se añaden 100 μ l de TMB, se sella y se incuba veinte minutos a temperatura ambiente.

3.6.6. - Frenado de las Placas:

Tras el tiempo necesario para que se desarrolle el color del cromógeno, se produce el frenado de la reacción añadiendo 100 μ l de solución de frenado.

3.6.7. - Lectura de las Placas:

Una vez frenada la reacción del sustrato, se procede a la lectura de la densidad óptica del color desarrollado. Para ello empleamos un lector automático EIA (Bio-Tek), el cual mediante filtros de 450 y 600 nm, realiza una lectura bicromática eliminando el color producido por una posible reacción inespecífica de fondo.

3.6.8. - Procesado de los Resultados:

Igual que en Procesado de los Resultados de la ACTH.

4. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE CATECOLAMINAS

Para la evaluación de las concentraciones séricas de epinefrina y de norepinefrina se utilizó el Kit BI-CAT-ELISA (DLD Diagnostika GmbH, Hamburgo, Alemania). El kit ELISA de competición se basa en la competición por unirse al anticuerpo, entre las catecolaminas de la muestra y las catecolaminas fijadas a la fase sólida.

La epinefrina o la norepinefrina están unidas a la fase sólida de la microplaca. Las catecolaminas aciladas de la muestra y las catecolaminas unidas a la fase sólida compiten por los sitios de unión de los anticuerpos. Cuando el sistema está en equilibrio, el antígeno libre y los complejos antígeno-anticuerpo libres son eliminados por lavado. El anticuerpo unido a la fase sólida es detectado por la anti-IgG/peroxidasa. La reacción sustrato TMB/peroxidasa es medida a 450 nm. La cantidad de anticuerpo unido a las catecolaminas de la fase sólida es inversamente proporcional a la concentración de catecolaminas en la muestra.

4.1. Contenido del Kit

4.1.1. Reactivos para la extracción:

- ⇒ Macroplaca de 48 pocillos (2 placas).
- ⇒ Tampón de extracción (2 viales): 4 ml.
- ⇒ HCl (0,025 M): 20 ml.
- ⇒ Tampón de medición (HCl 1M) (2 viales): 4 ml.
- ⇒ Estándares (A-F) (6 viales): 1 ml cada uno.

Estándar	A	B	C	D	E	F
Epinefrina (ng/ml)	0	1	4	16	64	256
Norepinefrina(ng/ml)	0	4	16	64	256	1024

⇒ Control 1 y 2 (2 viales): 1 ml cada uno.

Control 1: 8,3 ng/ml.

Control 2: 33 ng/ml.

⇒ Reactivo de acilación (2 viales): 1,5 ml.

⇒ Tampón de acilación: 20 ml.

4.1.2. Reactivos para ELISA:

⇒ Enzima (4 viales): 1 ml cada uno, liofilizada. Catecol-O-metiltransferasa.

⇒ Coenzima (2 viales): 0.75 ml. S-adenosil-metionina.

⇒ Tampón enzimático: 4 ml.

⇒ Anticuerpo Epinefrina: 6 ml.

⇒ Anticuerpo Norepinefrina: 6 ml.

⇒ Placa de 96 pocillos (una placa para epinefrina: color azul; y otra para norepinefrina: color amarillo).

⇒ Conjugado POD (2 viales): 11 ml.

- ⇒ Solución de lavado (3 viales): 50 ml, concentrado (diluir el contenido con agua destilada a un volumen total de 500 ml).
- ⇒ Sustrato (2 viales): 11 ml solución TMB.
- ⇒ Solución de frenado (2 viales): 11 ml, preparado para uso. Contiene ácido sulfúrico 0,5 M, no corrosivo.

4.2. Extracción

4.2.1. Preparación de Solución de lavado: diluir el contenido con agua destilada a un volumen total de 500 ml.

4.2.2. Procedimiento:

- 4.2.2.1. Pipetear 10 μ l de estándares A-F, 10 μ l Control 1 y 2 y añadir 250 μ l de agua destilada a estos pocillos para corregir el volumen. Pipetear 300 μ l de la muestras en cada pocillo.
- 4.2.2.2. Pipetear 50 μ l de Tampón de medición y otros 50 μ l de Tampón de Extracción en todos los pocillos.
- 4.2.2.3. Incubar 30 min a T^a ambiente en un agitador (600-900 r.p.m).
- 4.2.2.4. Después eliminar el contenido y secar enérgicamente mediante volteo, en papel de filtro.

- 4.2.2.5. Pipetear 1 ml de Solución de lavado en todos los pocillos e incubar 5 min a T^a ambiente en un agitador.
- 4.2.2.6. Repetir los dos pasos anteriores de nuevo.
- 4.2.2.7. Pipetear 150 µl de Tampón de acilación y 25 µl de Reactivo de acilación en todos los pocillos.
- 4.2.2.8. Incubar la placa 15 min a T^a ambiente en un agitador.
- 4.2.2.9. Eliminar el líquido residual como antes y pipetear 1 ml de Solución de lavado en todos pocillos.
- 4.2.2.10. Incubar la placa 10 min a T^a ambiente en un agitador.
- 4.2.2.11. Eliminar el líquido residual y pipetear 150 µl HCl en todos los pocillos.
- 4.2.2.12. Incubar 10 min en un agitador a T^a ambiente.
- 4.2.2.13. Tomar 100 µl del sobrenadante para medir epinefrina y/o 20 µl para medir norepinefrina.

4.3. Procedimiento del test

4.3.1. Preparación de los reactivos:

⇒ Solución enzimática.

NOTA: Para preparar la Solución Enzimática se reconstituye el contenido del vial "Enzima" con 1 ml de agua destilada y se mezcla. Se añade 0.3 ml de Coenzima y 0,7 ml de Tampón enzimático, justo antes de realizar el test (no más de 10-15 minutos).

4.3.2. Test de ELISA para Epinefrina y Norepinefrina:

- 4.3.2.1. Todos los reactivos y muestras a T^a ambiente. Se recomiendan duplicados.
- 4.3.2.2. Se pipetea 25 µl de Solución enzimática en todos los pocillos.
- 4.3.2.3. En la placa de Epinefrina, pipetear 100 µl de Estándares, Controles y Muestras extraídas en los respectivos pocillos. En la placa de Norepinefrina, pipetear 20 µl de Estándares, Controles y Muestras extraídas en los respectivos pocillos.
- 4.3.2.4. Incubar a 37 °C durante 30 min.
- 4.3.2.5. Pipetear 50 µl de Anticuerpo-Epinefrina o de Anticuerpo-Norepinefrina, según la placa, en todos los pocillos.
- 4.3.2.6. Incubar 2 horas a T^a ambiente en un agitador.
- 4.3.2.7. Eliminar el contenido de los pocillos y lavar con 300 µl de Solución de lavado.

- 4.3.2.8. Eliminar el contenido por volteo de la placa sobre papel absorbente. Repetir el lavado 3 veces.
- 4.3.2.9. Pipetear 100 μ l de Conjugado-POD en todos los pocillos.
- 4.3.2.10. Incubar 30 min a T^a ambiente en un agitador (600-900 r.p.m.).
- 4.3.2.11. Lavado: repetir paso 4.3.2.7.
- 4.3.2.12. Pipetear 100 μ l de Sustrato en todos los pocillos.
- 4.3.2.13. Incubar 30-45 min a T^a ambiente en un agitador, preferiblemente en oscuridad.
- 4.3.2.14. Pipetear 100 μ l de Solución de Frenado en todos los pocillos.
- 4.3.2.15. Leer la densidad óptica a 450 nm en un lector de placas dentro de los 10 min.

4.4. Procesado de resultados:

Igual que en Procesado de los Resultados de la ACTH.

5. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE SEROTONINA

Para la evaluación de las concentraciones séricas de serotonina se utilizó el Kit Serotonin-ELISA (DLD Diagnostika GmbH, Hamburgo, Alemania). El kit ELISA de competición se basa en la competición entre la serotonina de la muestra y la serotonina fijada a la fase sólida, por unirse al anticuerpo.

La serotonina está fijada a la fase sólida de la microplaca. La serotonina acilada de las muestras y la serotonina unida a la fase sólida compiten por los sitios de unión de los anticuerpos. Cuando el sistema está en equilibrio, el antígeno libre y los complejos antígeno-anticuerpo libres son eliminados por lavado. El anticuerpo unido a la fase sólida es detectado por otro anticuerpo unido a la peroxidasa. La reacción sustrato TMB/peroxidasa es medida a 450 nm. La cantidad de anticuerpo unido a la serotonina de la fase sólida es inversamente proporcional a la concentración de serotonina que hay en la muestra.

5.1. Contenido del kit

- ⇒ Placa de 96 pocillos, divididos en 12 tiras de 8 pocillos, con serotonina fijada.
- ⇒ Estándares A-F (6 viales): 4 ml cada una.

Estandar	A	B	C	D	E	F
ng/ml	0	15	50	150	500	2.500

- ⇒ Control 1 y 2 (2 viales): 4 ml cada uno.
Control 1: 129 ng/ml.
Control 2: 366 ng/ml.

Igual que en Procesado de los Resultados de la ACTH (página).

- ⇒ Tampón de acilación: 1 bote de 30 ml.
- ⇒ Reactivo de acilación: 1 vial de 3 ml.
- ⇒ Anticuerpo: 1 vial de 6 ml (rabbit-anti-N-acylserotonin).
- ⇒ Conjugado enzimático: 1 vial de 11 ml (goat anti-rabbit-IgG-peroxidase).
- ⇒ Solución de lavado: 1 bote de 50 ml, concentrado. Diluir el contenido con agua destilada a un volumen total de 500 ml.
- ⇒ Sustrato: 1 vial de 11 ml de solución TMB.
- ⇒ Solución de frenado: 1 vial de 11 ml, que contiene 0,25 M de ácido sulfúrico, no corrosivo.
- ⇒ Placa de reacción, para la acilación.

5.2. Preparación de los reactivos y muestras

5.2.1 Preparación de las muestras (acilación):

- 5.2.1.1. Pipetear 10 μ l estándares A-F, 10 μ l de los controles y 10 μ l de las muestras en los respectivos pocillos de la placa de reacción.
- 5.2.1.2. Pipetear 250 μ l de Tampón de acilación en todos los pocillos.

5.2.1.3. Pipetear 25 μ l de Reactivo de acilación en todos los pocillos.

5.2.1.4. Incubar 15 minutos a T^a ambiente (aprox. 20 °C) en un agitador.

5.2.1.5. Coger 10 μ l para ELISA.

5.2.2. Solución de lavado:

Diluir el contenido con agua destilada a un volumen total de 500 ml. Almacenar a 2-4 °C.

5.3. Realización del test de ELISA

5.3.1. Incubación de las muestras.

Pipetear 10 μ l de los estándares A-F, controles y muestras en los respectivos pocillos (se recomienda duplicados).

Pipetear 50 μ l de Anticuerpo en todos los pocillos.

Incubar durante 60 minutos a T^a ambiente en un agitador.

5.3.2. Lavado.

Eliminar el contenido de los pocillos y lavar con 250 μ l de Solución de lavado. Repetir el proceso 3 a 4 veces. Eliminar el contenido por volteo de la placa sobre papel absorbente.

5.3.3. Incubación con el conjugado.

Pipetear 100 μ l del conjugado enzimático en todos los pocillos e incubar 30 min a T^a ambiente en un agitador.

5.3.4. Lavado.

Repetir proceso 5.3.2.

5.3.5. Incubación con el sustrato.

Pipetear 100 μ l del sustrato en todos los pocillos e incubar 20-30 min a T^a ambiente en un agitador.

5.3.6. Frenado de la placa.

Pipetear 100 μ l de solución de frenado en todos los pocillos.

5.3.7. Lectura de la placa.

Leer a densidad óptica a 450 nm en un lector de placas.

5.4. Cálculo de los resultados

Igual que en Procesado de los Resultados de la ACTH.

IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de nuestros resultados se realizó utilizando el paquete estadístico The SAS System (SAS Institute Inc, NC, USA) en el Centro de Cálculo de Moncloa, de la Universidad Complutense de Madrid. Los datos de frecuencia cardíaca y respiratoria, temperatura rectal, concentraciones séricas de corticosterona, cortisol, ACTH, epinefrina, norepinefrina y serotonina fueron analizados mediante análisis de la varianza.

Los distintos test realizados para el análisis estadístico de los datos fueron los siguientes:

1. **Análisis de la varianza (ANOVA) bifactorial de medidas repetidas.** Este análisis nos permite determinar la influencia de los factores grupo y tiempo, así como la interacción de los mismos sobre los parámetros estudiados. Al análisis se le aplicaron las correcciones de *Greenhouse-Geisser Epsilon* y *Huynh-Feldt Epsilon*. De esta forma se determinaron:
 - a. - *Efecto grupo o tratamiento*: nos indica si existen diferencias, estadísticamente significativas, entre los grupos de animales de nuestra experimentación, es decir, determinamos el efecto del tratamiento anestésico/oxígeno.
 - b. - *Efecto tiempo*: nos indica si existe una diferencia, estadísticamente significativa, entre los diferentes momentos de la experimentación, es decir, antes de la anestesia, durante el mantenimiento de la

anestesia, y en el periodo de recuperación a corto o a largo plazo.

- c. - *Interacción* entre efecto grupo y efecto tiempo: ya que determinadas combinaciones pueden potenciarse o anularse. Por tanto, determina la interacción entre el efecto de los distintos tratamientos y el efecto tiempo, es decir, antes y durante la anestesia, y en el periodo de recuperación de la misma.

Cuando observamos un efecto del tratamiento o de la interacción tratamiento-tiempo, procedimos a realizar un análisis de la varianza de una vía para determinar la posible influencia del tratamiento sobre un parámetro en particular, a un determinado tiempo.

2. **Análisis de la varianza (ANOVA) unifactorial para la comparación entre grupos.** Éste análisis permite determinar si un factor, en nuestro caso el tratamiento administrado, influye sobre un parámetro evaluado. De esta forma, comparamos, entre dos grupos, el efecto del tratamiento utilizado sobre un parámetro, a un determinado tiempo. Con la finalidad de averiguar cuál o cuáles de los diferentes grupos son los que difieren entre sí, realizamos un test *post hoc* a posteriori: el **Test de Duncan**. Además de los parámetros anteriormente citados, también los distintos tiempos de pérdida y recuperación de reflejos fueron sometidos a este análisis.

El nivel de significación de los análisis estadísticos utilizados fue del 95%, correspondiente a una $p < 0,05$.

RESULTADOS

TIEMPO DE PÉRDIDA Y RECUPERACIÓN DE LOS REFLEJOS PALPEBRAL, CORNEAL, AURICULAR, PEDAL Y DE ENDEREZAMIENTO

En la evaluación de los distintos reflejos, hemos tenido en cuenta, en primer lugar, el tiempo que tardaron en perderse, a partir del comienzo de la administración del anestésico. En segundo lugar, el tiempo empleado en recuperarse, una vez que cesó la administración del anestésico. Cualquier movimiento que tuviese lugar al evaluar los distintos reflejos, se consideró como una respuesta positiva del reflejo monitorizado.

En las **Gráficas 1 y 2**, y las **Tablas 2 y 3** representamos los tiempos de pérdida y recuperación de los distintos reflejos, según el grupo.

Así, la pérdida del reflejo de enderezamiento ocurrió hacia los 406 ± 56 segundos del comienzo de la administración del halotano y a los 255 ± 58 segundos del isoflurano. También, la pérdida del reflejo pedal fue significativamente más prolongada con el halotano (516 ± 78 segundos) que con el isoflurano (360 ± 64 segundos). El reflejo auricular fue perdido a los 502 ± 78 segundos en el grupo halotano y a los 328 ± 68 segundos en el grupo isoflurano. Además, el reflejo palpebral fue perdido a los 575 ± 102 segundos en el grupo halotano, mientras que en el grupo isoflurano se perdió a los 460 ± 98 segundos. Por último, el reflejo corneal fue el último en perderse y fue a los 592 ± 120 segundos del comienzo de la inhalación de halotano y a los 494 ± 122 segundos del isoflurano (Gráfica1).

En cuanto a la recuperación de los distintos reflejos (Gráfica 2), el primero en recuperarse, en ambos grupos de anestesia, fue el reflejo corneal, que se consideró positivo a los 178 ± 58 segundos en el grupo halotano y a los 132 ± 68 segundos en el grupo isoflurano. El reflejo palpebral se recuperó poco después, a los 192 ± 60 segundos, en el grupo halotano y a los 140 ± 50 segundos en el grupo isoflurano. El siguiente reflejo en recuperarse, una vez

que se cerró el vaporizador, fue el auricular, que fue evaluado como positivo a los 259 ± 87 segundos en el grupo anestesiado con halotano y a los 212 ± 69 segundos en el grupo anestesiado con isoflurano. A continuación, se recuperó el reflejo pedal a los 232 ± 56 segundos en el grupo halotano y a los 194 ± 54 segundos en el grupo isoflurano. El último reflejo en recuperarse tras el cese de la administración de anestesia fue el de enderezamiento o recuperación del decúbito esternal, que duró hasta los 334 ± 60 segundos en el grupo anestesiado con halotano y hasta los 270 ± 64 segundos en el grupo anestesiado con isoflurano.

También, habría que tener en cuenta que, la exposición al halotano causó un cierto grado de aversión en los animales de este grupo, de forma que los intentos de escape fueron de unos 5 ± 2 intentos de media por animal. En el grupo isoflurano, también se observó una cierta aversión al anestésico, con aproximadamente una frecuencia media de escapes de unos 4 ± 3 intentos. En ambos casos estos intentos de escape sucedieron dentro de los 3 primeros minutos de la inducción con la mascarilla.

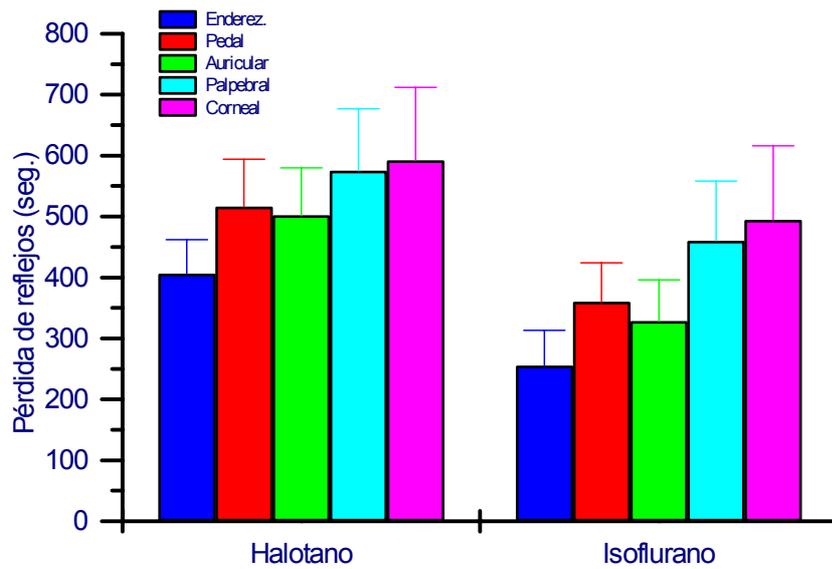
Además, los períodos de apnea fueron anotados dentro de los 420 segundos siguientes al inicio de la inducción en ambos grupos. Dentro del grupo halotano, a dos animales no se les apreció ninguna fase de apnea, mientras que, en el grupo isoflurano fueron seis los animales a los que se apreciaron períodos de apnea. La duración de estos períodos apneicos fue variable, entre los 30 segundos y el minuto, aproximadamente.

Tabla 2.- Tiempos (seg.) de **pérdida** de los distintos **reflejos** durante la experimentación con los diferentes tratamientos anestésicos

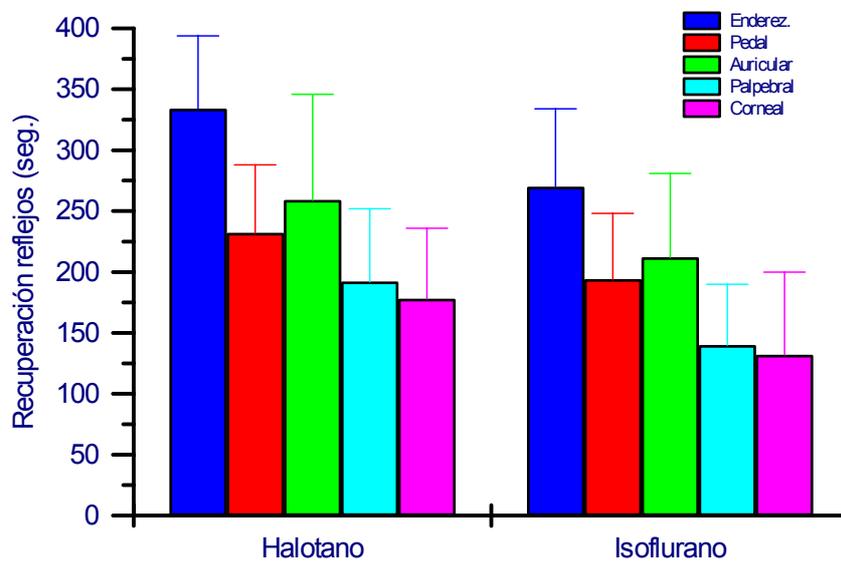
	Enderez.	Pedal	Auricular	Palpebral	Corneal
HALOTANO	406 ± 56	516 ± 78	502 ± 78	575 ± 102	592 ± 120
ISOFLURANO	255 ± 58	360 ± 64	328 ± 68	460 ± 98	494 ± 122

Tabla 3.- Tiempos (seg.) de **recuperación** de los distintos **reflejos** durante la experimentación con los diferentes tratamientos anestésicos

	Enderez.	Pedal	Auricular	Palpebral	Corneal
HALOTANO	334 ± 60	232 ± 56	259 ± 87	192 ± 60	178 ± 58
ISOFLURANO	270 ± 64	194 ± 54	212 ± 69	140 ± 50	132 ± 68



Gráfica 1.- Tiempo de pérdida (seg.) de los distintos reflejos tras la administración del halotano y del isoflurano.



Gráfica 2.- Tiempo de recuperación (seg.) de los distintos reflejos tras la administración del halotano y del isoflurano.

FRECUENCIA RESPIRATORIA

En la **Gráfica 3** y la **Tabla 4** representamos las medias (\pm ESM) de las distintas frecuencias respiratorias por minuto según el grupo.

La frecuencia respiratoria experimentó variaciones tanto con el anestésico utilizado ($p < 0,05$) como en los distintos tiempos ($p < 0,05$). Se observó una interacción ($p < 0,05$) entre el anestésico y el tiempo durante el periodo de anestesia. Por ello, en determinados tiempos, se encontró un efecto significativo del anestésico sobre la frecuencia respiratoria.

Dentro del grupo Control, no se observaron diferencias ($p > 0,05$) en los distintos tiempos.

Sin embargo, en el grupo halotano, encontramos una disminución ($p < 0,05$) de la frecuencia respiratoria respecto a los niveles basales (tiempo 0), un minuto después de la intubación, alcanzándose una frecuencia de $49,6 \pm 2,17$ respiraciones/minuto por las $108,8 \pm 6,74$ respiraciones/minuto observadas a los 0 minutos (**Gráficas 4 y 6**). Este descenso continuó durante todo el mantenimiento de la anestesia (30 minutos), siendo de $54 \pm 3,74$ respiraciones/minuto a los 30 minutos. Durante la recuperación de la anestesia, esta frecuencia fue subiendo gradualmente, de modo que, a los 60 minutos, aunque permanecía por debajo de esos niveles basales, ya no era estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Los resultados de frecuencia respiratoria obtenidos en el grupo Isoflurano fueron muy similares a los del grupo halotano, observándose un descenso ($p < 0,05$) al minuto de la intubación (de las $99,1 \pm 5,96$ respiraciones/minuto a los 0 minutos, pasamos a $48,4 \pm 6,20$ respiraciones/minuto) (**Gráficas 5 y 6**). Ese descenso, también se mantuvo durante toda la fase de anestesia, siendo la frecuencia de $56,8 \pm 5,12$ respiraciones/minuto a los 30 minutos.

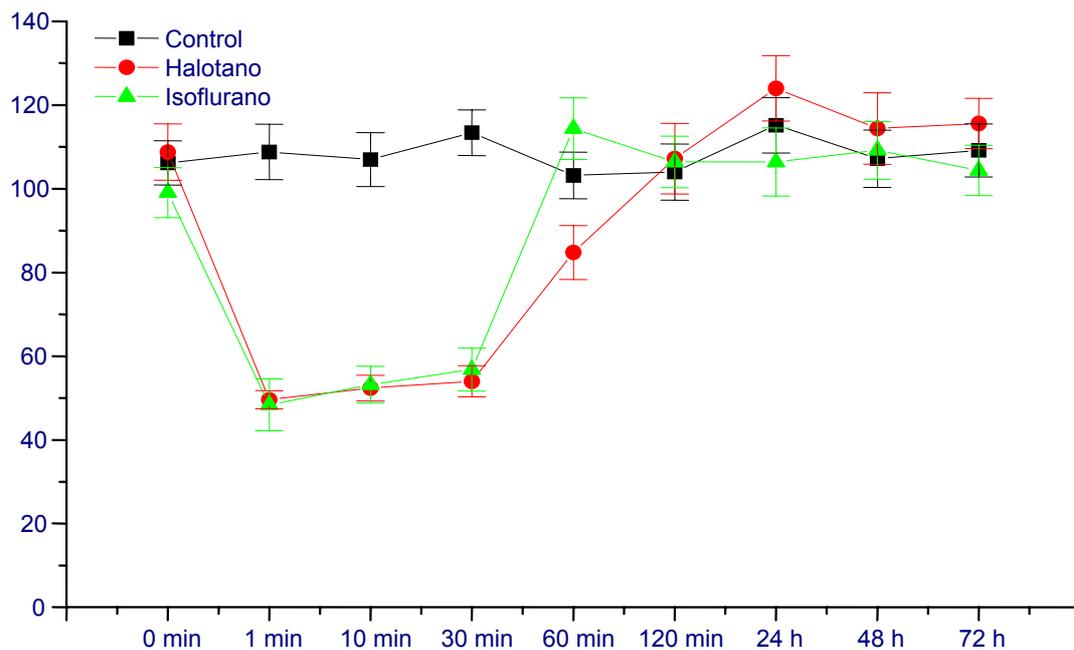
Si comparamos los distintos grupos, observamos un descenso ($p < 0,05$), en los grupos tratados con halotano o isoflurano respecto a los que sólo recibieron 100 % de oxígeno (grupo control). Este descenso tuvo lugar desde el primer minuto tras la intubación hasta los 30 minutos, momento en el cual se retiró la administración del oxígeno/anestésico en los distintos grupos. De esta manera, la frecuencia respiratoria se redujo un minuto después de la intubación hasta un 54,4 % y un 55,5 % en los grupos halotano (**Gráfica 4**) e isoflurano (**Gráfica 5**), respectivamente, cuando comparamos con el grupo control.

Aunque a los 60 minutos la frecuencia respiratoria era más alta en el grupo isoflurano que en el grupo halotano, esta diferencia no fue considerada estadísticamente significativa (**Gráfica 6**).

Tabla 4.- Frecuencias respiratorias (medias \pm ESM) (resp./min) durante la experimentación con los diferentes tratamientos anestésicos

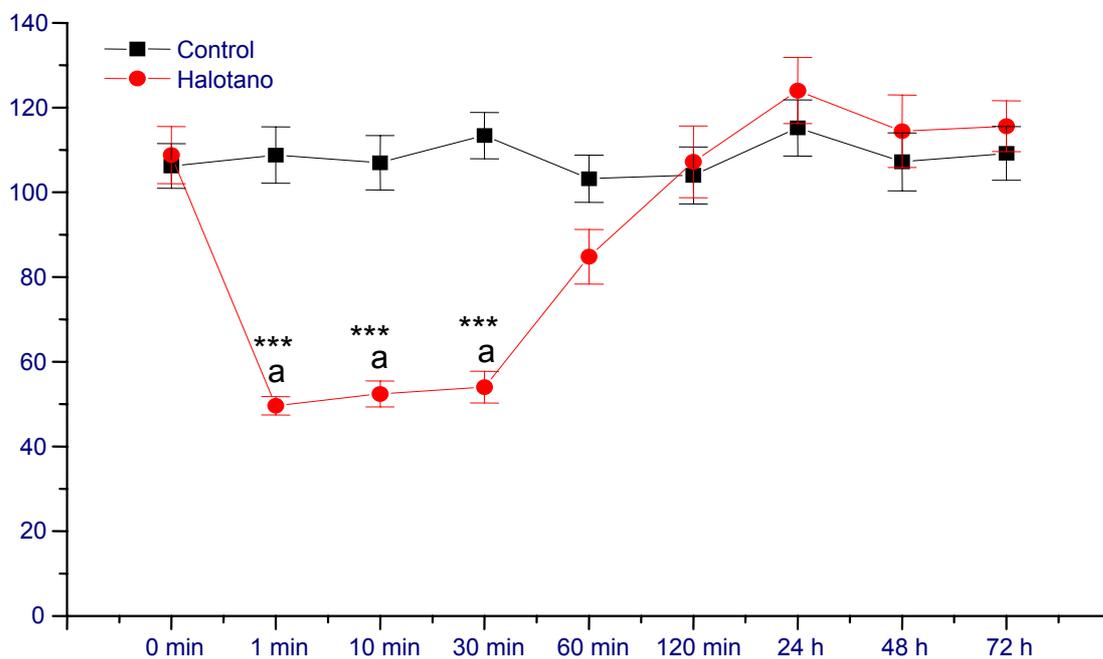
MUESTRAS	CONTROL	HALOTANO	ISOFLURANO
Inicial	106,2 \pm 5,27	108,8 \pm 6,74	99,1 \pm 5,96
1 min	108,8 \pm 6,63	49,6 \pm 2,17	48,4 \pm 6,21
10 min	107 \pm 6,43	52,4 \pm 3,07	53,2 \pm 4,42
30 min	113,4 \pm 5,47	54 \pm 3,74	56,8 \pm 5,12
60 min	103,2 \pm 5,57	84,8 \pm 6,47	114,4 \pm 7,36
120 min	104 \pm 6,72	107,2 \pm 8,45	106,4 \pm 6,14
24 horas	115,2 \pm 6,65	124 \pm 7,80	106,4 \pm 8,13
48 horas	107,2 \pm 6,86	114,4 \pm 8,54	109,2 \pm 6,89
72 horas	109,2 \pm 6,34	115,6 \pm 6,01	104,4 \pm 6,01

respiraciones/min



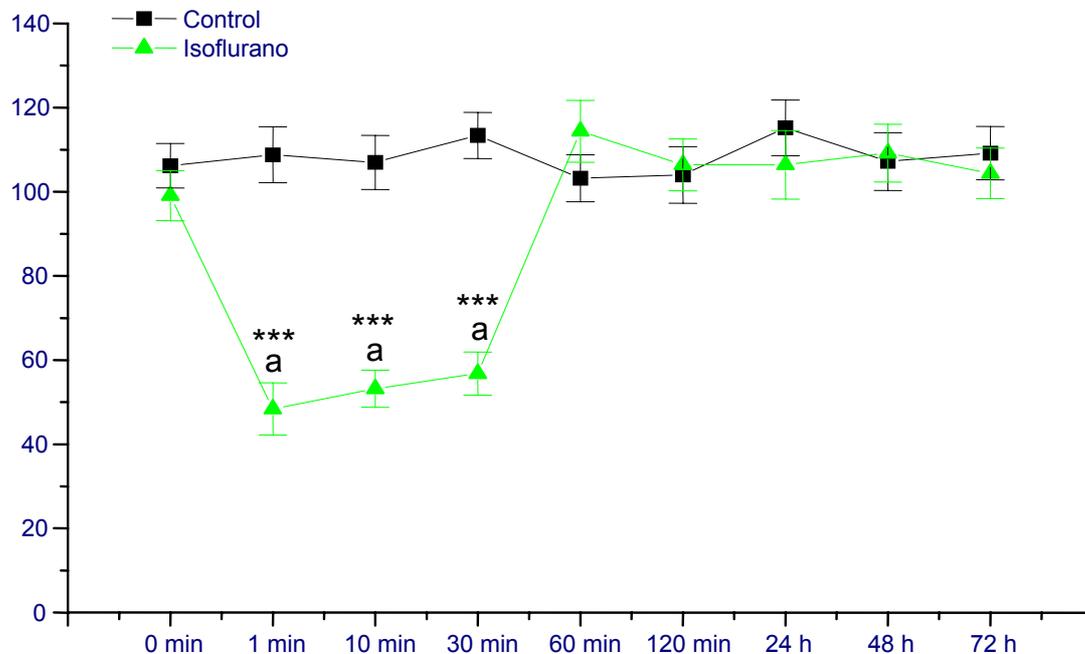
Gráfica 3.- Efectos de los grupos control, halotano e isoflurano sobre la frecuencia respiratoria (respiraciones/min) a distintos tiempos.

respiraciones/min



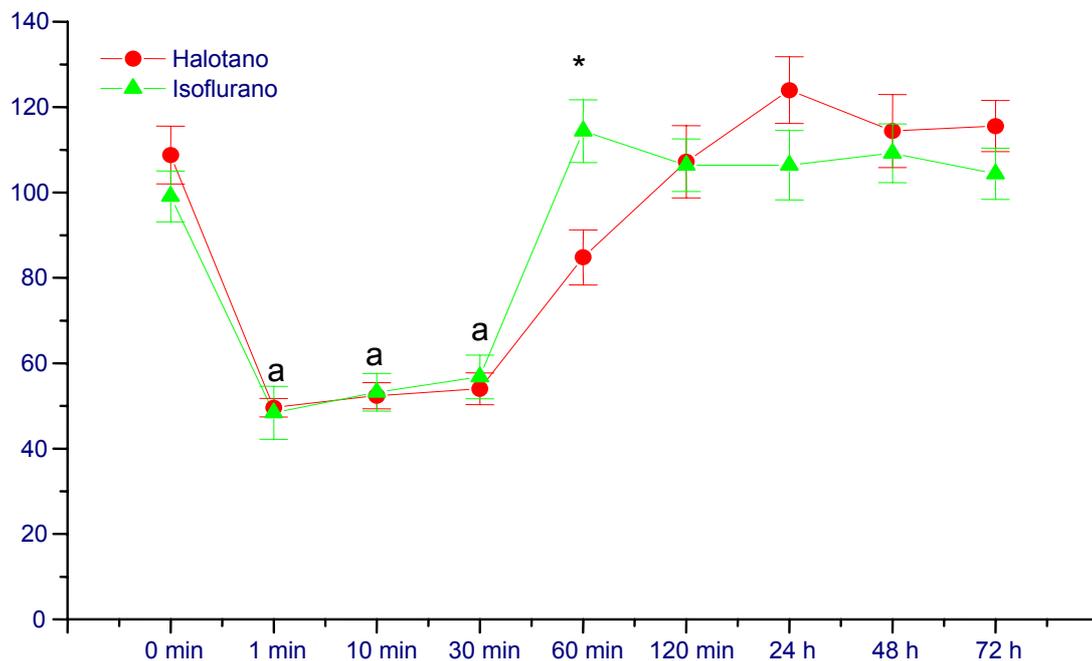
Gráfica 4.- Efectos de los grupos control y halotano sobre la frecuencia respiratoria (respiraciones/min) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

respiraciones/min



Gráfica 5.- Efectos de los grupos control e isoflurano sobre la frecuencia respiratoria (respiraciones/min) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Diferencia significativa entre grupos; **a** Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

respiraciones/min



Gráfica 6.- Efectos de los grupos halotano e isoflurano sobre la frecuencia respiratoria (respiraciones/min) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Diferencia significativa entre grupos; **a** Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

FRECUENCIA CARDIACA

En la **Gráfica 7** y la **Tabla 5** representamos las medias (\pm ESM) de las distintas frecuencias cardiacas por minuto, según el grupo.

Tanto el anestésico empleado ($p < 0,05$) como los distintos tiempos en los cuales se monitorizó al animal, provocaron variaciones en la frecuencia cardiaca ($p < 0,05$). Así, observamos una interacción ($p < 0,05$) entre el anestésico y el tiempo durante la anestesia. Por ello, en determinados tiempos, se encontró un efecto significativo del anestésico sobre la frecuencia cardiaca.

En el grupo control no observamos diferencias ($p > 0,05$) durante todo el proceso, manteniéndose la frecuencia cardiaca entre los $293,3 \pm 12$ y los $308,7 \pm 10,4$ latidos/minuto en todo momento (**Gráficas 8 y 9**).

Sin embargo, en el grupo halotano se observó un descenso estadísticamente significativo, respecto a las frecuencias basales, un minuto después y a los 10 y 30 minutos de la intubación del animal (**Gráficas 8 y 10**). La frecuencia cardiaca más baja se alcanzó a los 30 minutos, con una frecuencia de $210,7 \pm 14,51$ latidos/minuto respecto a los $302,6 \pm 9,10$ latidos/minuto a los 0 minutos, aproximadamente un 30 % más baja que la frecuencia inicial. Al igual que en la frecuencia respiratoria, la frecuencia cardiaca en el grupo halotano fue paulatinamente recuperándose tras el cese de la administración del oxígeno/halotano, de forma que, a los 60 minutos, ya no era estadísticamente significativa respecto a la frecuencia basal.

En el grupo isoflurano, al contrario de lo señalado con el halotano, se observó un ligero incremento de la frecuencia cardiaca respecto a los niveles basales, desde el primer minuto tras la intubación pero que, en ningún momento, llegaron a ser estadísticamente significativos respecto a estos valores iniciales (**Gráficas 9 y 10**). Así, pasamos de una frecuencia cardiaca de

304,2 ± 9,12 latidos/minuto basales a 316,7 ± 9,30 latidos/minuto a los 30 minutos de la intubación.

Si hacemos una comparación entre los grupos, observamos un descenso estadísticamente significativo de la frecuencia cardiaca de los animales del grupo halotano respecto a los del grupo control (**Gráfica 8**). Este descenso se prolonga desde un minuto después de la intubación hasta los 30 minutos, momento en el cual esta diferencia fue más significativa ($p < 0,001$): de una frecuencia de 293,3 ± 12,02 latidos/minuto del grupo control, pasamos a una frecuencia cardiaca de 210,7 ± 14,50 latidos/minuto en el grupo halotano, casi un 29 %, más baja. A los 60 minutos, ya no había diferencias ($p > 0,05$) entre ambos grupos.

Al comparar al grupo control con el grupo isoflurano, observamos un pequeño incremento de la frecuencia cardiaca en el grupo isoflurano tras la intubación pero que, en ningún momento llegó a ser estadísticamente significativo (**Gráfica 9**).

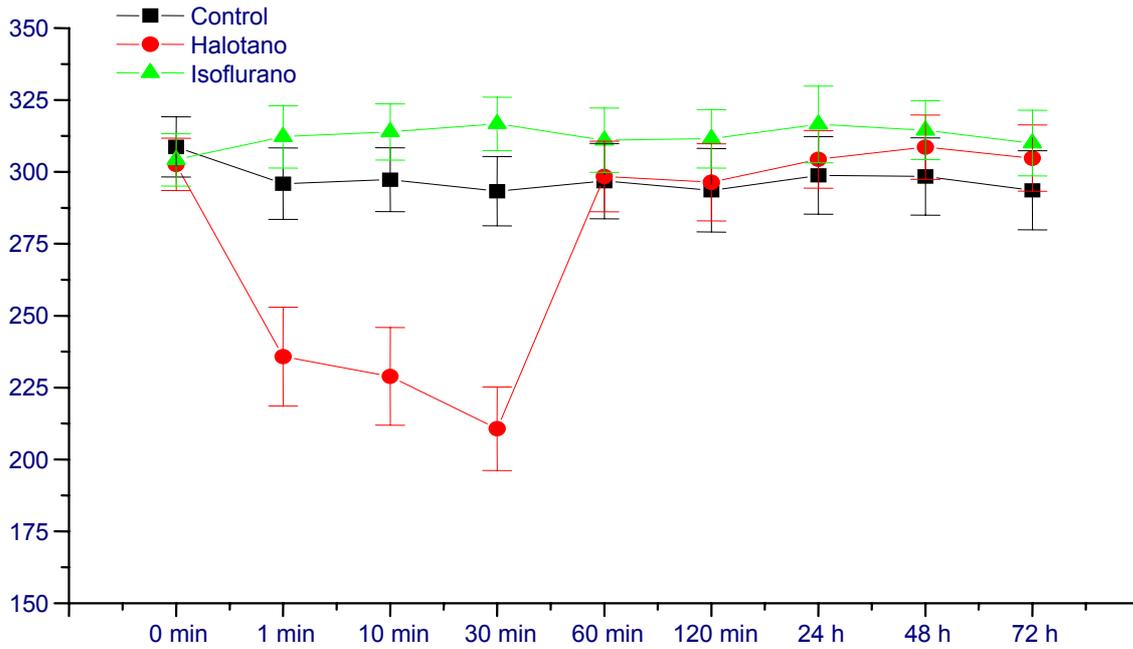
Sin embargo, sí observamos diferencias ($p < 0,05$) entre el grupo halotano y el grupo isoflurano, desde el primer minuto tras la intubación hasta los 30 minutos, siendo más evidente esta diferencia, precisamente, a los 30 minutos ($p < 0,001$): 210,7 ± 14,50 latidos/minuto en el grupo halotano por los 316,7 ± 9,30 latidos/minuto en el grupo Isoflurano, casi un 34 % más bajo en el grupo halotano que en el grupo isoflurano (**Gráfica 10**).

A partir de los 60 minutos, no se observó ninguna diferencia ($p > 0,05$) en la frecuencia cardiaca en los distintos grupos.

Tabla 5.- Frecuencias cardiacas (medias \pm ESM) (latidos/min) durante la experimentación con los diferentes tratamientos anestésicos

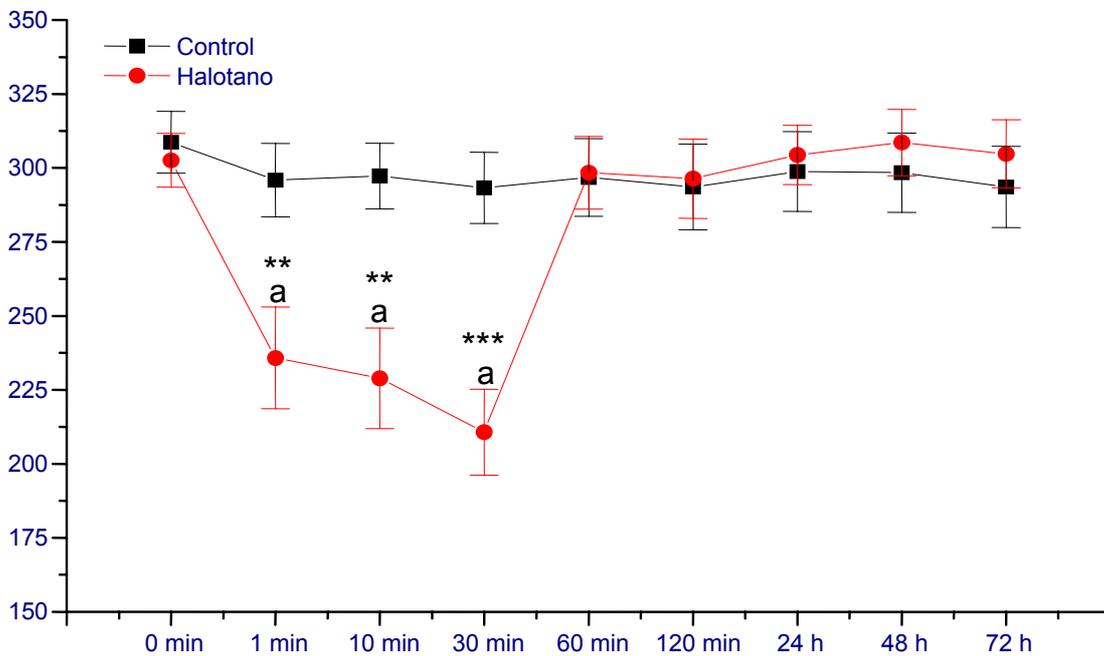
MUESTRAS	CONTROL	HALOTANO	ISOFLURANO
Inicial	308,7 \pm 10,43	302,6 \pm 9,10	304,2 \pm 9,12
1 min	295,9 \pm 12,40	235,8 \pm 17,19	312,2 \pm 10,84
10 min	297,3 \pm 11,09	228,9 \pm 16,98	313,9 \pm 9,79
30 min	293,3 \pm 12,03	210,7 \pm 14,51	316,7 \pm 9,30
60 min	296,8 \pm 13,12	298,4 \pm 12,27	311 \pm 11,15
120 min	293,6 \pm 14,83	296,4 \pm 13,38	311,5 \pm 10,44
24 horas	298,8 \pm 13,48	304,4 \pm 10,01	316,5 \pm 13,33
48 horas	298,4 \pm 13,41	308,6 \pm 11,22	314,5 \pm 10,24
72 horas	293,6 \pm 13,76	304,8 \pm 11,51	310 \pm 11,40

latidos/min



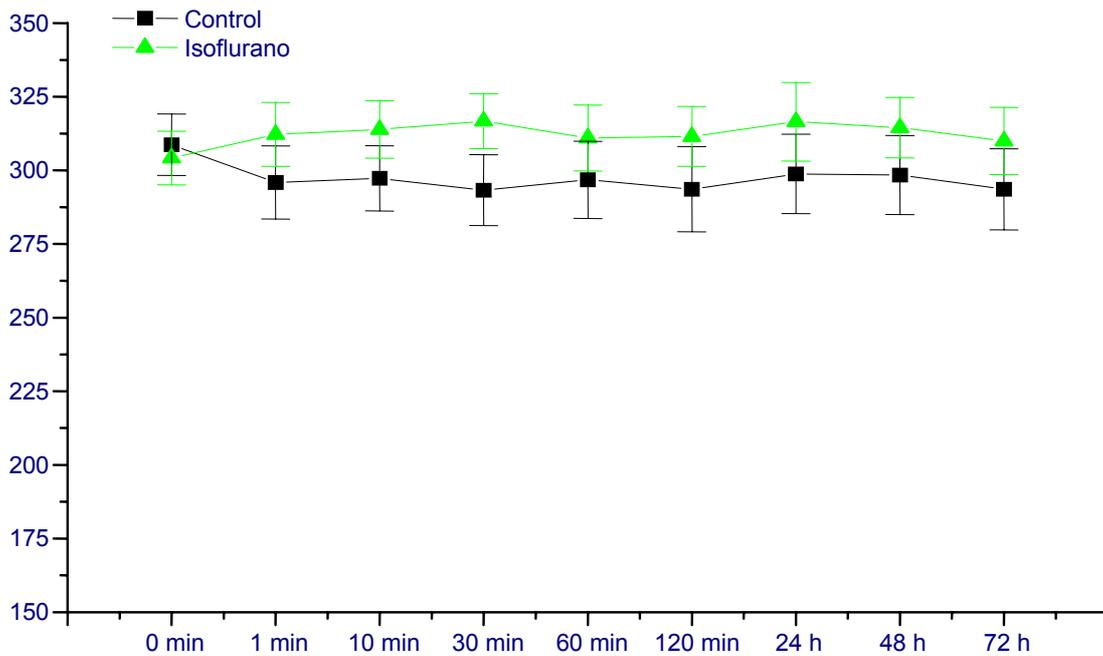
Gráfica 7.- Efectos de los grupos control, halotano e isoflurano sobre la frecuencia cardiaca (latidos/min) a distintos tiempos.

latidos/min



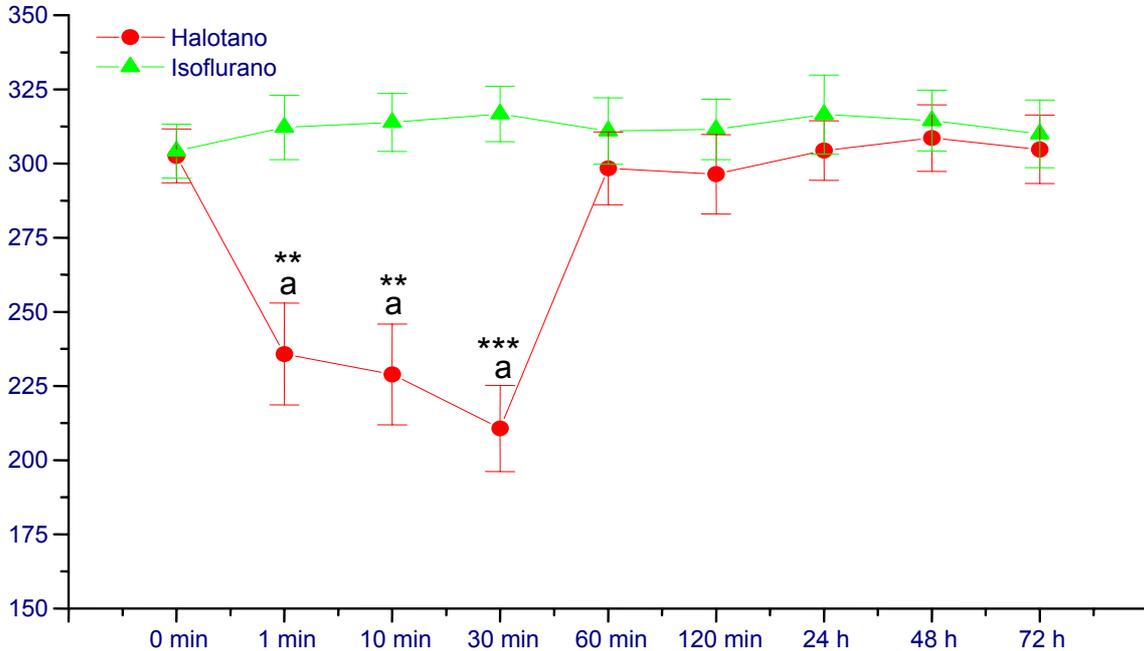
Gráfica 8.- Efectos de los grupos control y halotano sobre la frecuencia cardiaca (latidos/min) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

latidos/min



Gráfica 9.- Efectos de los grupos control e isoflurano sobre la frecuencia cardiaca (latidos/min) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

latidos/min



Gráfica 10.- Efectos de los grupos halotano e isoflurano sobre la frecuencia cardiaca (latidos/min) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

TEMPERATURA RECTAL

En la **Gráfica 11** y la **Tabla 6** representamos las medias (\pm ESM) de las distintas temperaturas, según el grupo.

La temperatura rectal se mantuvo en todo momento dentro del margen normal para la especie (38,3 - 39,4 °C).

La temperatura rectal no experimentó variaciones ni con el anestésico utilizado ($p < 0,05$) ni en los distintos tiempos ($p < 0,05$), por tanto, no observamos interacción ($p > 0,05$) entre el anestésico y el tiempo durante el periodo de anestesia.

En el grupo control, no se observaron cambios estadísticamente significativos (**Gráficas 12 y 13**).

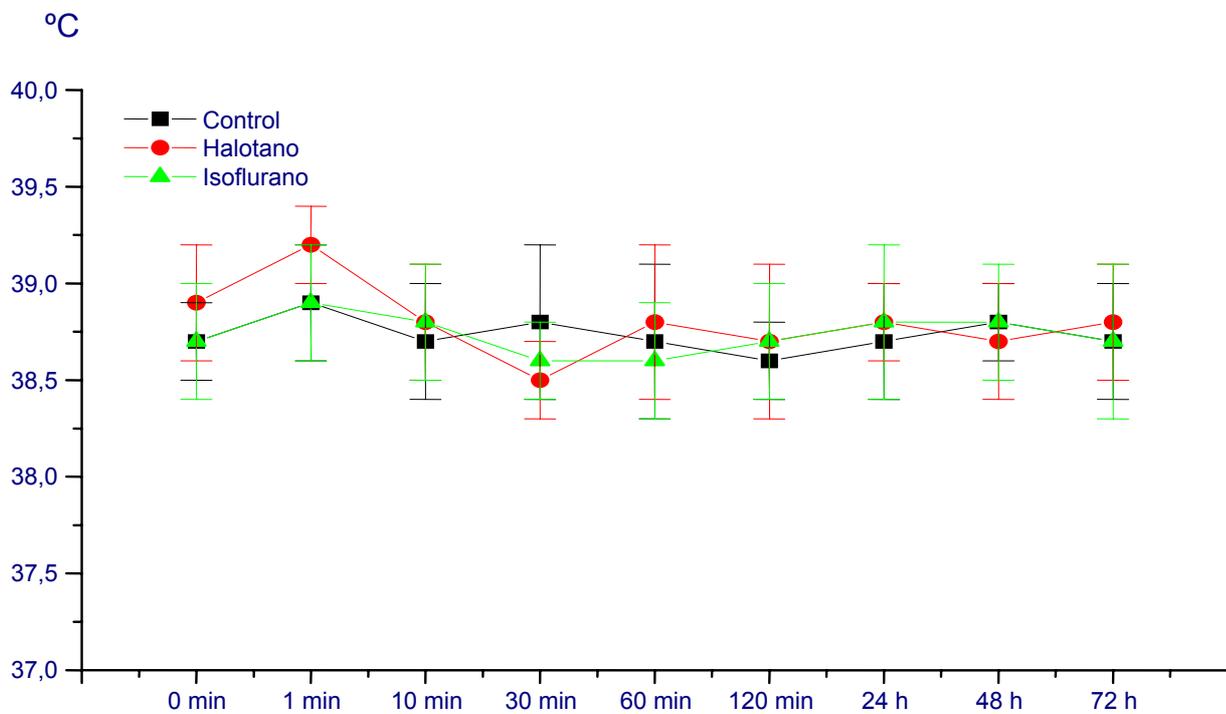
Tras la administración de halotano se observó un ligero incremento, que tampoco fue estadísticamente significativo, de la T^a al minuto de la intubación (de $38,9 \pm 0,3$ °C iniciales a $39,2 \pm 0,2$ °C al minuto de la intubación). Posteriormente, fue encontrado un ligero descenso progresivo de la temperatura rectal durante la fase anestésica, aunque tampoco llegó a ser estadísticamente significativo, pasando de los $38,9 \pm 0,3$ °C iniciales a los $38,5 \pm 0,2$ °C a los 30 minutos de la anestesia (**Gráficas 12 y 14**). Tras el cese de la administración de la anestesia, estos niveles se recuperaron rápidamente de forma que 30 minutos tras el cese de la anestesia (a los 60 minutos de la intubación), la temperatura rectal era ya de $38,8 \pm 0,4$ °C, manteniéndose hasta el final de la experimentación.

Con el isoflurano, también se observó un descenso en la temperatura rectal durante la anestesia pero que tampoco llegó a ser estadísticamente significativo, al igual que lo sucedido con el halotano, pasando de los $38,7 \pm 0,3$ °C iniciales a $38,6 \pm 0,2$ °C a los 30 minutos (**Gráficas 13 y 14**).

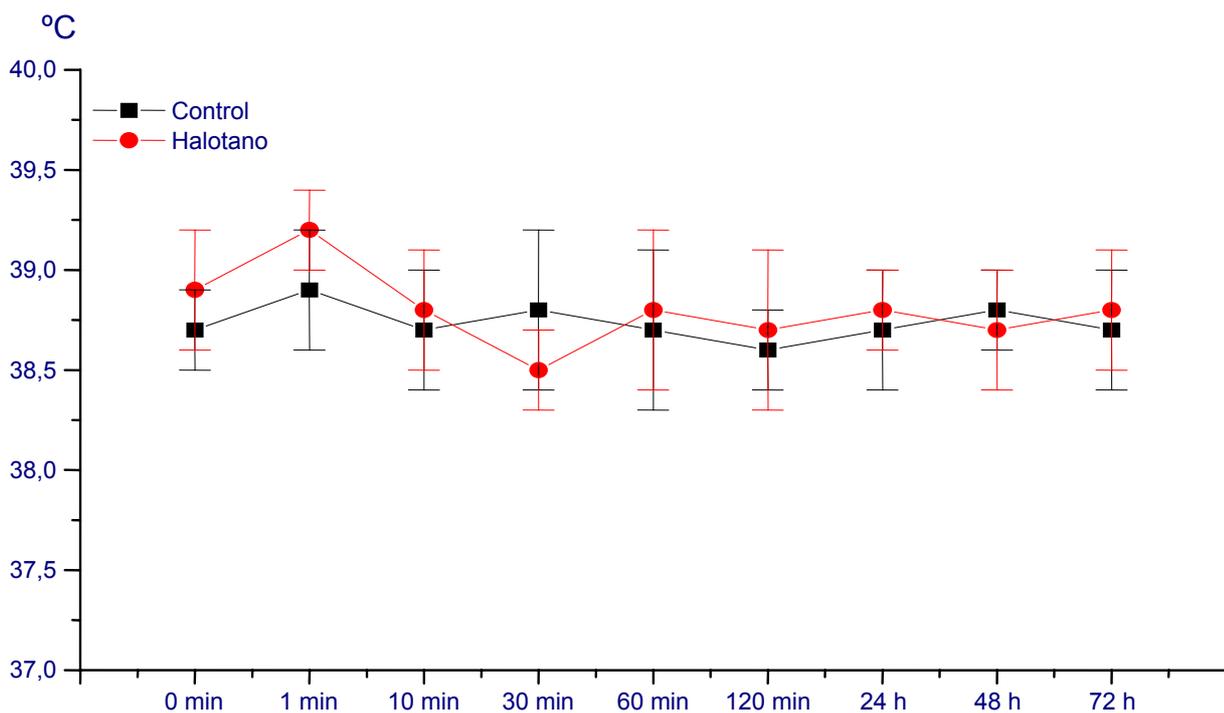
Tampoco fueron observadas diferencias ($p > 0,05$) en la temperatura rectal entre los distintos grupos utilizados en la experimentación.

Tabla 6.- Temperatura rectal (medias \pm ESM) durante la experimentación con los diferentes tratamientos anestésicos

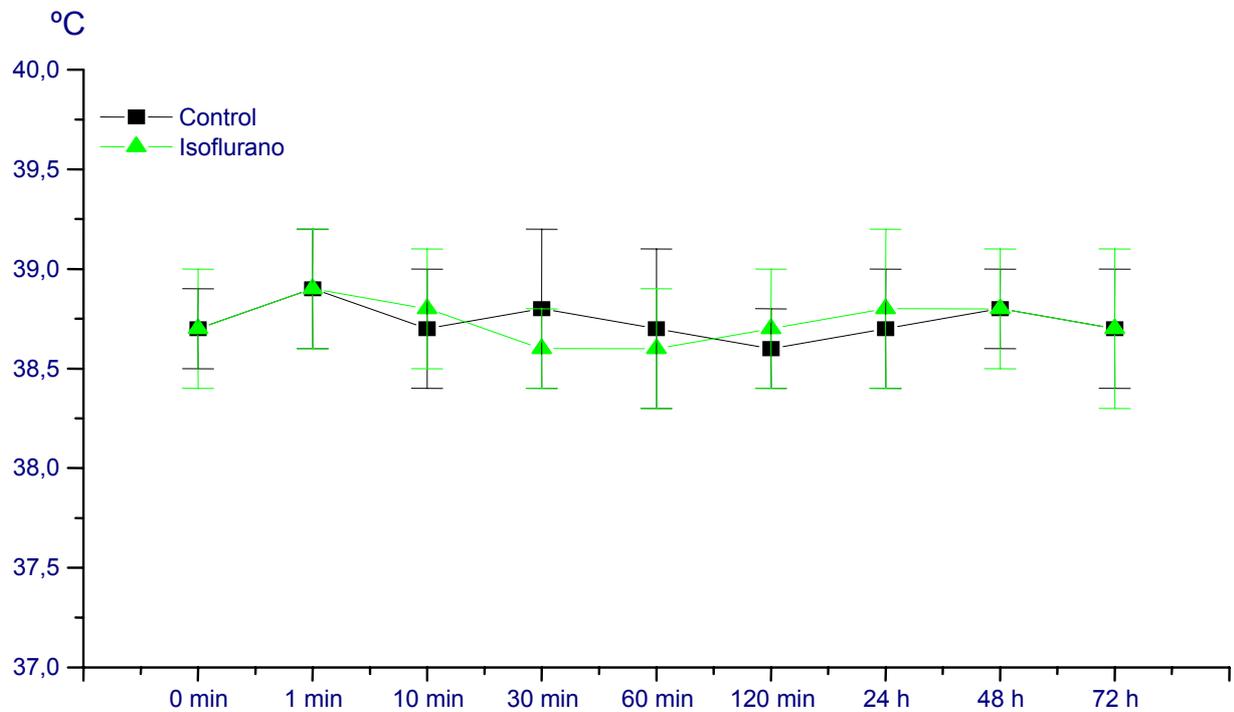
MUESTRAS	CONTROL	HALOTANO	ISOFLURANO
Inicial	38,7 \pm 0,2	38,9 \pm 0,3	38,7 \pm 0,3
1 min	38,9 \pm 0,3	39,2 \pm 0,2	38,9 \pm 0,3
10 min	38,7 \pm 0,3	38,8 \pm 0,3	38,8 \pm 0,3
30 min	38,8 \pm 0,4	38,5 \pm 0,2	38,6 \pm 0,2
60 min	38,7 \pm 0,4	38,8 \pm 0,4	38,6 \pm 0,3
120 min	38,6 \pm 0,2	38,7 \pm 0,4	38,7 \pm 0,3
24 horas	38,7 \pm 0,3	38,8 \pm 0,2	38,8 \pm 0,4
48 horas	38,8 \pm 0,2	38,7 \pm 0,3	38,8 \pm 0,3
72 horas	38,7 \pm 0,3	38,8 \pm 0,3	38,7 \pm 0,4



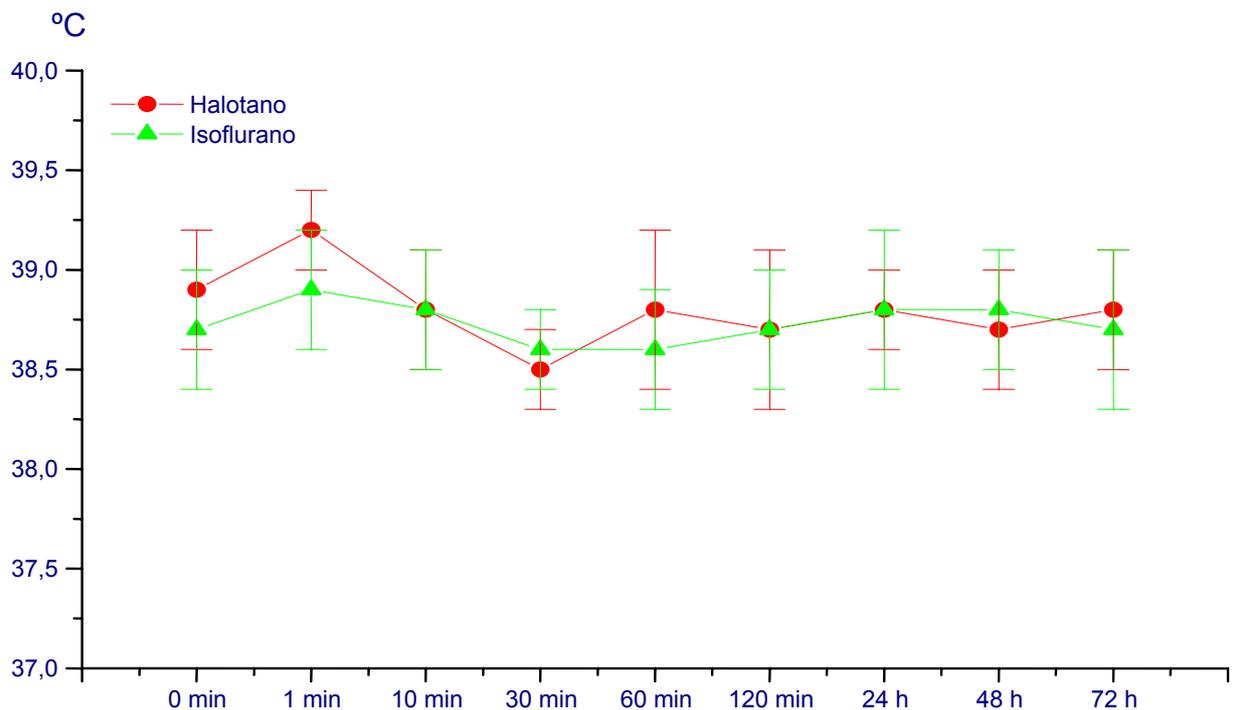
Gráfica 11.- Efectos de los grupos control, halotano e isoflurano sobre la temperatura rectal (°C) a distintos tiempos.



Gráfica 12.- Efectos de los grupos control y halotano sobre la temperatura rectal (°C) a distintos tiempos. *p< 0,05, **p< 0,01, *p< 0,001; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).**



Gráfica 13.- Efectos de los grupos control e isoflurano sobre la temperatura rectal (°C) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 14.- Efectos de los grupos halotano e isoflurano sobre la temperatura rectal (°C) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

ACTH SÉRICA

En la **Gráfica 15** y la **Tabla 7** representamos las medias (\pm ESM) de las distintas concentraciones séricas de la hormona adrenocorticotropa o ACTH según el grupo.

La concentración sérica de ACTH experimentó variaciones tanto con el anestésico utilizado ($p < 0,05$) como en los distintos tiempos ($p < 0,05$). Igualmente, fue señalada una interacción ($p < 0,05$) entre el anestésico y el tiempo durante el periodo de anestesia, por lo que, se encontró un efecto significativo del anestésico sobre la frecuencia respiratoria en determinados tiempos.

En el grupo control observamos un ligero incremento de las concentraciones séricas de ACTH durante la primera fase de la anestesia, pero que, en ningún momento, se consideraron estadísticamente significativas cuando las comparamos con las concentraciones iniciales (**Gráficas 16 y 17**).

Sin embargo, dentro del grupo halotano, encontramos un aumento progresivo y estadísticamente significativo, de las concentraciones séricas de ACTH durante toda la fase de la anestesia, alcanzando los valores más altos a los 30 minutos de la anestesia: de $25,54 \pm 3,13$ pg/ml iniciales a $51,64 \pm 4,85$ pg/ml, un incremento de más de un 100 % (**Gráficas 16 y 18**). Estas concentraciones disminuyeron rápidamente tras el cese de la anestesia, de forma que, a los 30 minutos del cierre del vaporizador de halotano (60 minutos de la intubación), las concentraciones se equipararon a las iniciales al tiempo cero.

En el grupo Isoflurano, este aumento no fue tan evidente y tan sólo tuvo lugar un minuto después de la intubación, donde fue estadísticamente significativo respecto a los valores iniciales: de $19,56 \pm 4,01$ pg/ml iniciales a $39,68 \pm 5,44$ pg/ml al minuto de la intubación (**Gráficas 17 y 18**).

Posteriormente, estas concentraciones disminuyeron progresivamente durante la anestesia hasta alcanzar unos valores mínimos de $14,93 \pm 2,59$ pg/ml a los 30 minutos, aunque sin llegar a ser diferentes ($p > 0,05$) respecto a las concentraciones basales.

Dentro de cada grupo, prácticamente a los 60 minutos de la intubación, las concentraciones séricas de ACTH se equipararon a las concentraciones basales (0 minutos), no siendo ya diferentes ($p > 0,05$).

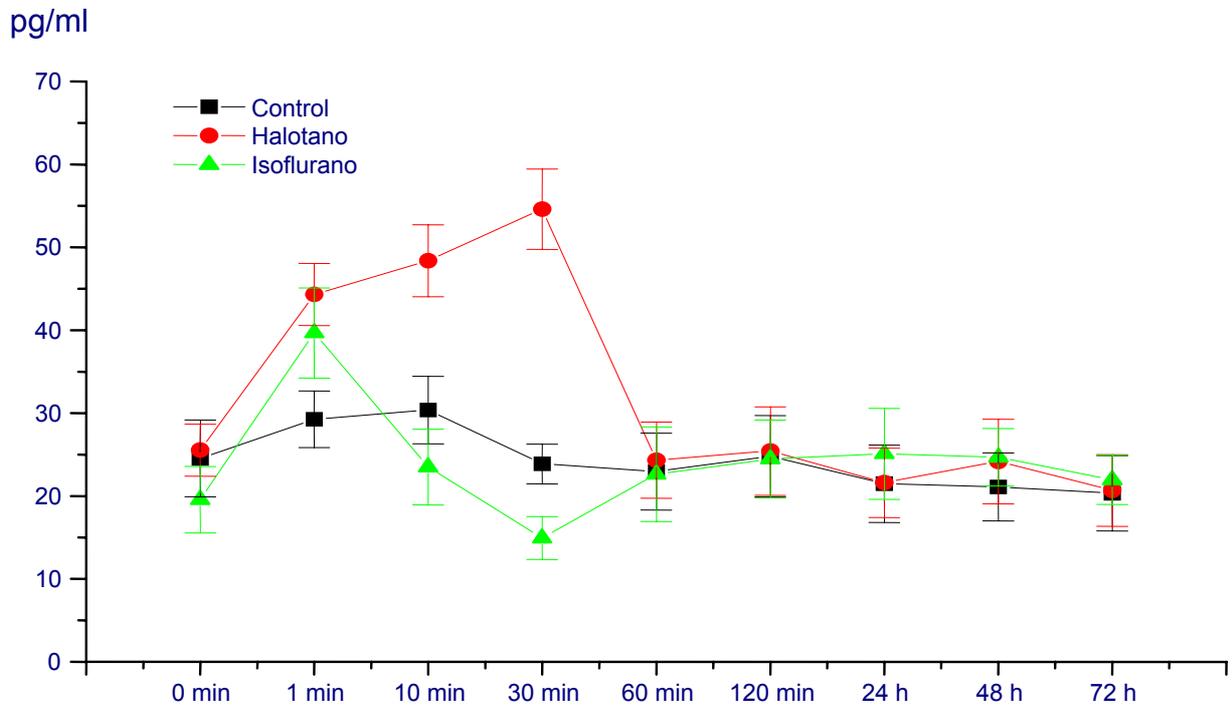
Al comparar el grupo control con los distintos grupos, observamos diferencias estadísticamente significativas con el grupo halotano durante toda la fase de la anestesia, desde el primer minuto hasta los 30 minutos, siendo esta diferencia cada vez más marcada según avanzaba el mantenimiento de la anestesia (**Gráfica 16**). La mayor diferencia fue alcanzada, por tanto, a los 30 minutos: de $23,87 \pm 2,39$ pg/ml del grupo control a $51,64 \pm 4,85$ pg/ml en el grupo halotano.

Cuando comparamos el grupo control con el grupo isoflurano, observamos un incremento, aunque no estadísticamente significativo, al minuto de la intubación (**Gráfica 17**). Sin embargo, estas concentraciones séricas de ACTH en el grupo Isoflurano fueron progresivamente disminuyendo con la anestesia, de forma que a los 30 minutos fueron diferentes ($p < 0,05$) respecto al grupo control: de $23,87 \pm 2,39$ pg/ml del grupo control a $14,93 \pm 2,59$ pg/ml en el grupo isoflurano.

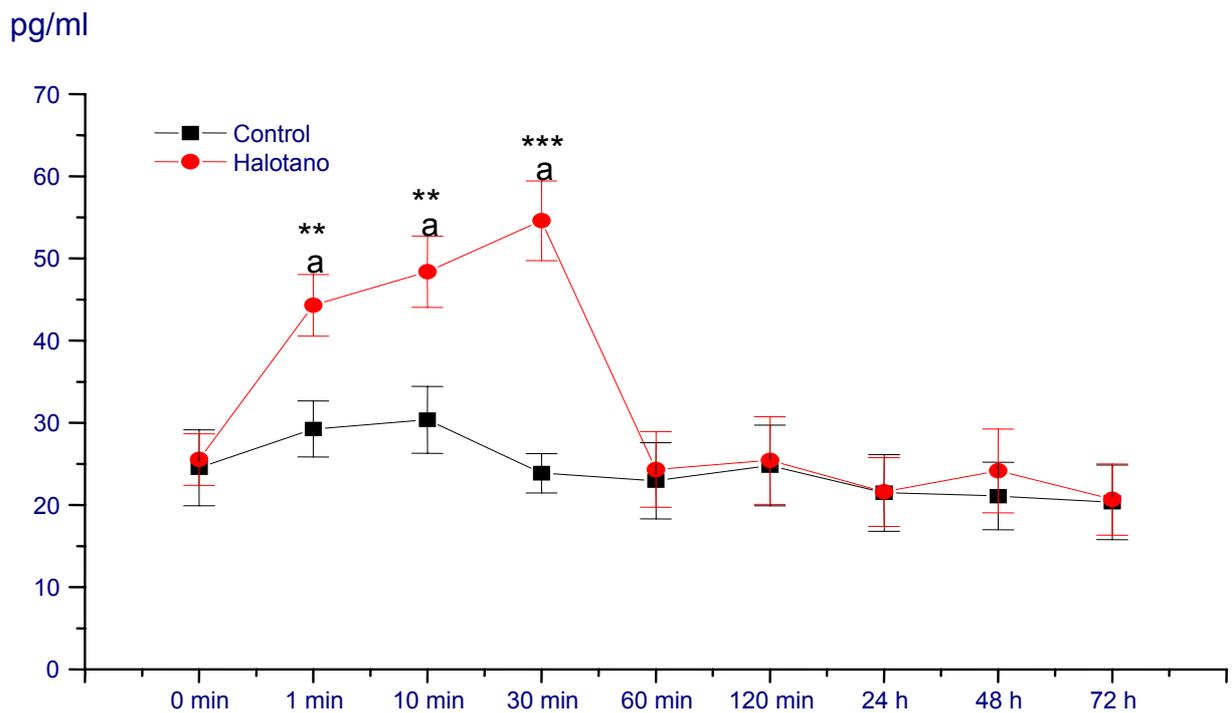
También observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos halotano e isoflurano a los 10 y a los 30 minutos de la intubación, llegando a ser hasta un 73 % más baja en el grupo isoflurano respecto al grupo halotano, a los 30 minutos (**Gráfica 18**). Tras el cese de la anestesia, las concentraciones séricas de ACTH de ambos anestésicos se equipararon y ya no hubo diferencias ($p > 0,05$) durante el resto de la experimentación.

Tabla 7.- Concentraciones plasmáticas (medias \pm ESM) de **ACTH** (pg/ml) durante la experimentación con los diferentes tratamientos anestésicos

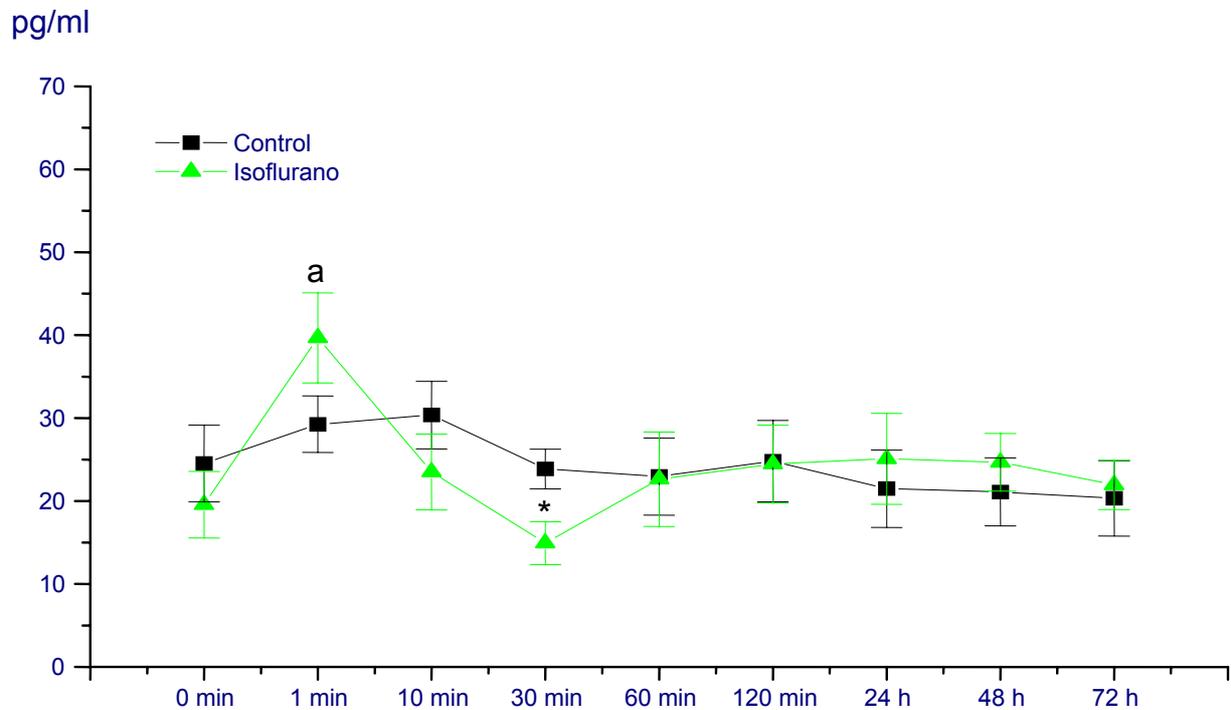
MUESTRAS	CONTROL	HALOTANO	ISOFLURANO
Inicial	24,54 \pm 4,62	25,54 \pm 3,13	19,56 \pm 4,01
1 min	29,26 \pm 3,41	44,31 \pm 3,74	39,68 \pm 5,44
10 min	30,37 \pm 4,09	48,40 \pm 4,34	23,50 \pm 4,56
30 min	23,87 \pm 2,39	54,61 \pm 4,85	14,93 \pm 2,59
60 min	22,95 \pm 4,64	24,33 \pm 4,60	22,63 \pm 5,60
120 min	24,81 \pm 4,92	25,42 \pm 5,34	24,46 \pm 4,69
24 horas	21,49 \pm 4,67	21,60 \pm 4,20	25,10 \pm 5,49
48 horas	21,10 \pm 4,10	24,16 \pm 5,10	24,68 \pm 3,48
72 horas	20,32 \pm 4,54	20,68 \pm 4,33	21,95 \pm 2,97



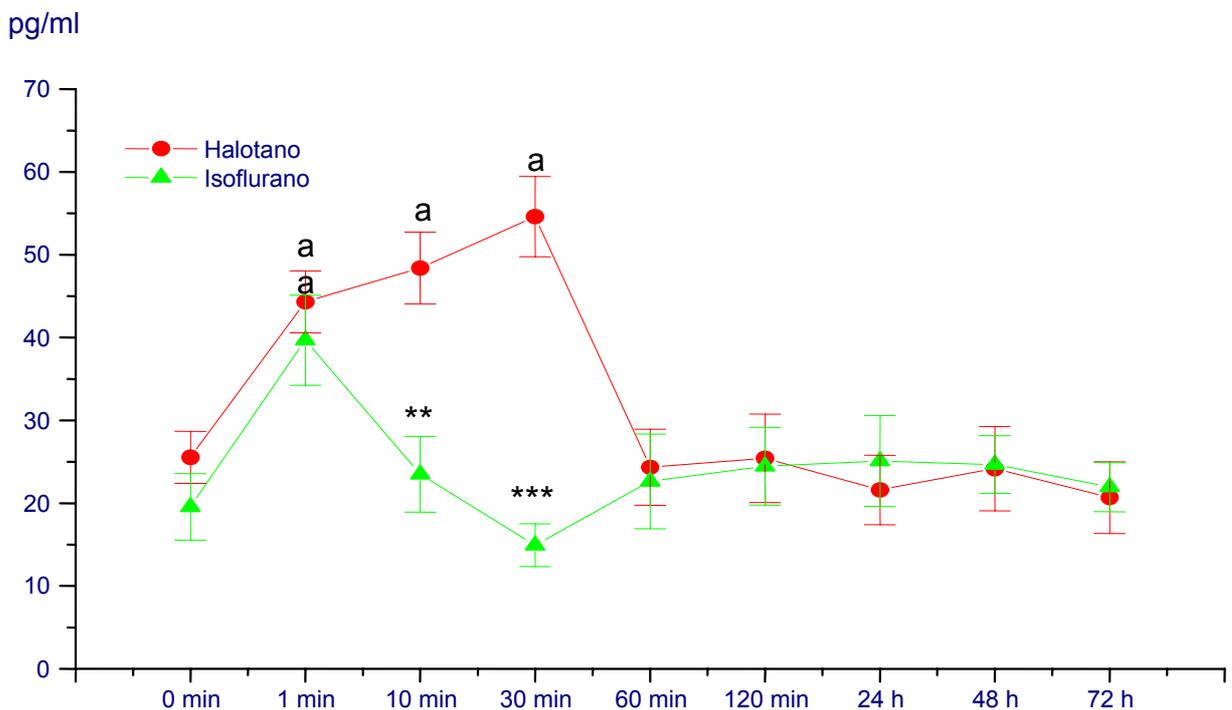
Gráfica 15.- Efectos de los grupos control, halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de ACTH (pg/ml) a distintos tiempos.



Gráfica 16.- Efectos de los grupos control y halotano sobre la concentración sérica de ACTH (pg/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 17.- Efectos de los grupos control e isoflurano sobre la concentración sérica de ACTH (pg/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 18.- Efectos de los grupos halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de ACTH (pg/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

CORTICOSTERONA SÉRICA

En la **Gráfica 19** y la **Tabla 8** representamos las medias (\pm ESM) de las distintas concentraciones séricas de corticosterona según el grupo.

Las concentraciones séricas de corticosterona experimentaron variaciones tanto con el anestésico utilizado ($p < 0,05$) como en los distintos tiempos ($p < 0,05$). Se observó una interacción ($p < 0,05$) entre el anestésico y el tiempo durante el periodo de anestesia. Por ello, en determinados tiempos, se encontró un efecto significativo del anestésico sobre los niveles de cortisol.

En el grupo control observamos diferencias ($p < 0,05$) desde el primer minuto tras la intubación hasta los 120 minutos: de los $2,46 \pm 1,51$ ng/ml iniciales hasta los $20,28 \pm 2,09$ ng/ml a los 30 minutos, es decir, aumentó hasta casi un 725 % el valor inicial (**Gráfica 20 y 21**).

También observamos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas de corticosterona, en el grupo halotano de 1-120 minutos tras la intubación, cuando las comparamos con los niveles basales (0 minutos) (**Gráficas 20 y 22**). Esta diferencia llegó a ser de hasta de más de 13 veces el valor inicial (de $2 \pm 0,69$ ng/ml iniciales a los $27,23 \pm 2,36$ ng/ml a los 30 minutos).

En el grupo isoflurano, este aumento no fue tan evidente pero también llegó a ser estadísticamente significativo respecto a los niveles basales, desde los 10 hasta los 60 minutos (de $2,22 \pm 0,71$ ng/ml iniciales hasta los $14,06 \pm 1,61$ ng/ml a los 30 minutos, un 533 % mayor). Las concentraciones de corticosterona llegaron a su punto más alto en la primera fase de la recuperación, aproximadamente a los 30 minutos del cese de la administración del anestésico (a los 60 minutos de la intubación), llegando a una concentración de $21,27 \pm 3,32$ ng/ml (**Gráficas 21 y 22**).

Dentro de cada grupo, a las 24 horas las concentraciones séricas de corticosterona se equipararon a las concentraciones basales (0 minutos), no siendo ya diferentes ($p > 0,05$).

Al comparar el grupo control con los distintos grupos, observamos diferencias estadísticamente significativas con el grupo halotano al minuto y a los 30 minutos de la intubación (**Gráfica 20**). Este incremento fue más evidente un minuto después de la intubación, de $12,82 \pm 1,36$ ng/ml en el grupo control a $19,47 \pm 2,06$ ng/ml en el grupo halotano, más de un 50 % mayor.

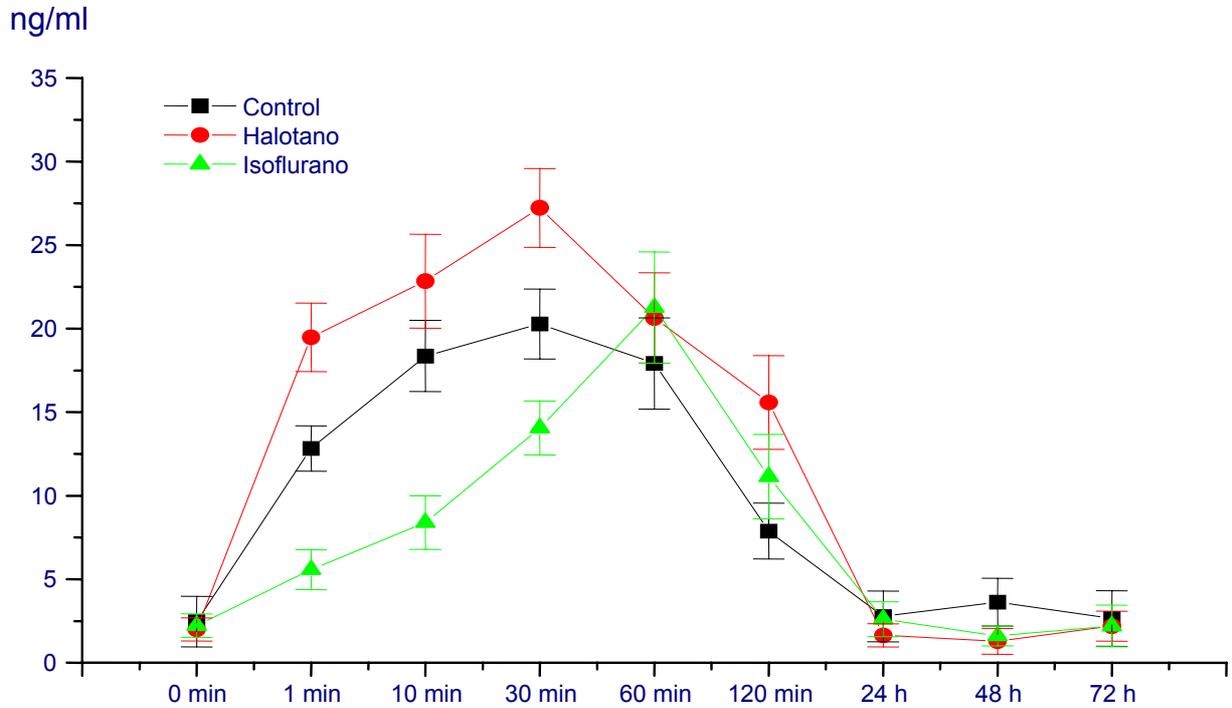
Cuando comparamos el grupo control con el grupo isoflurano, observamos un descenso significativo de las concentraciones de corticosterona en los animales anestesiados respecto a los del grupo control, desde el primer minuto tras la intubación hasta el cese de la administración del isoflurano, a los 30 minutos (**Gráfica 21**). Este descenso fue más evidente a los 10 minutos, donde se observó una concentración de corticosterona de $18,36 \pm 2,13$ ng/ml en el grupo control mientras que, en el grupo isoflurano, fue de $8,39 \pm 1,60$ ng/ml, aproximadamente un 54 % más bajo.

También observamos diferencias ($p < 0,05$) entre los grupos halotano e isoflurano durante todo el periodo de anestesia, de 1-30 minutos (de $22,84 \pm 2,81$ ng/ml en el grupo halotano hasta $8,39 \pm 1,60$ ng/ml en el grupo isoflurano a los 10 minutos, un 63 % más bajo en el grupo isoflurano) (**Gráfica 22**).

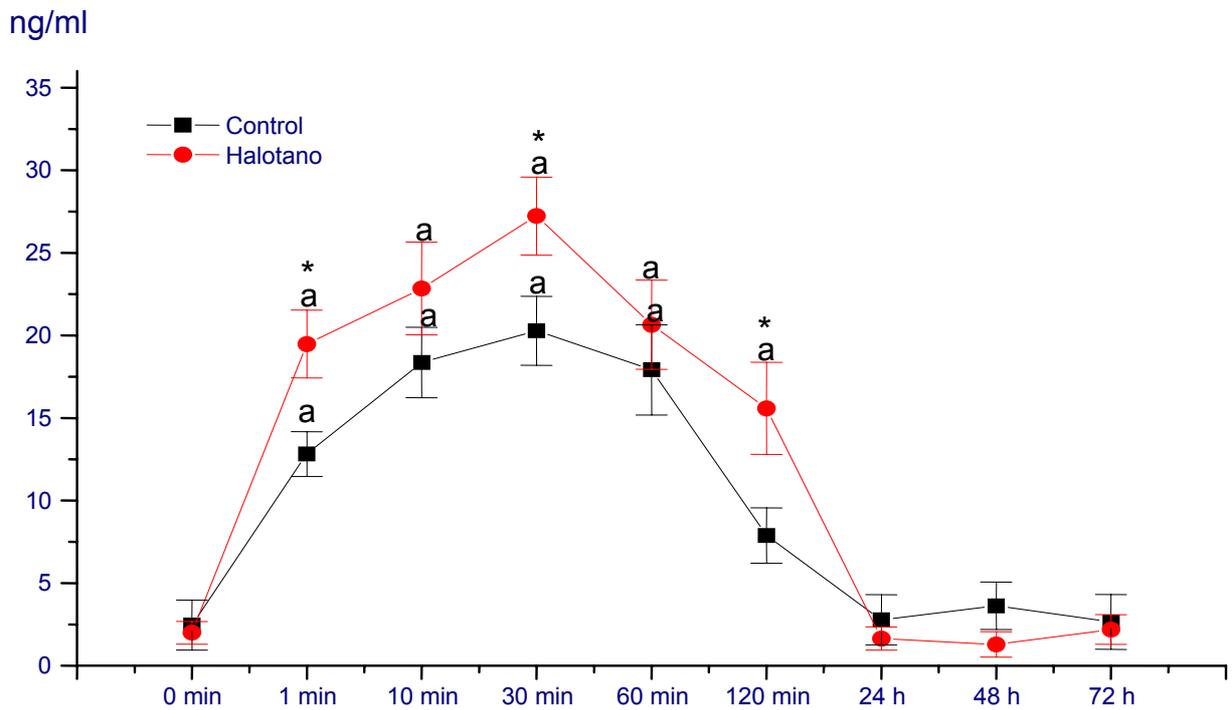
Las concentraciones séricas de corticosterona fueron progresivamente alcanzando los niveles basales tras el cese de la administración del anestésico, de forma que, a los 60 minutos ya no había diferencias ($p > 0,05$) entre los distintos grupos y, a las 24 horas, ya no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas con los niveles basales (tiempo 0) en ningún grupo.

Tabla 8.- Concentraciones plasmáticas (medias \pm ESM) de **corticoesterona** (ng/ml) durante la experimentación con los diferentes anestésicos

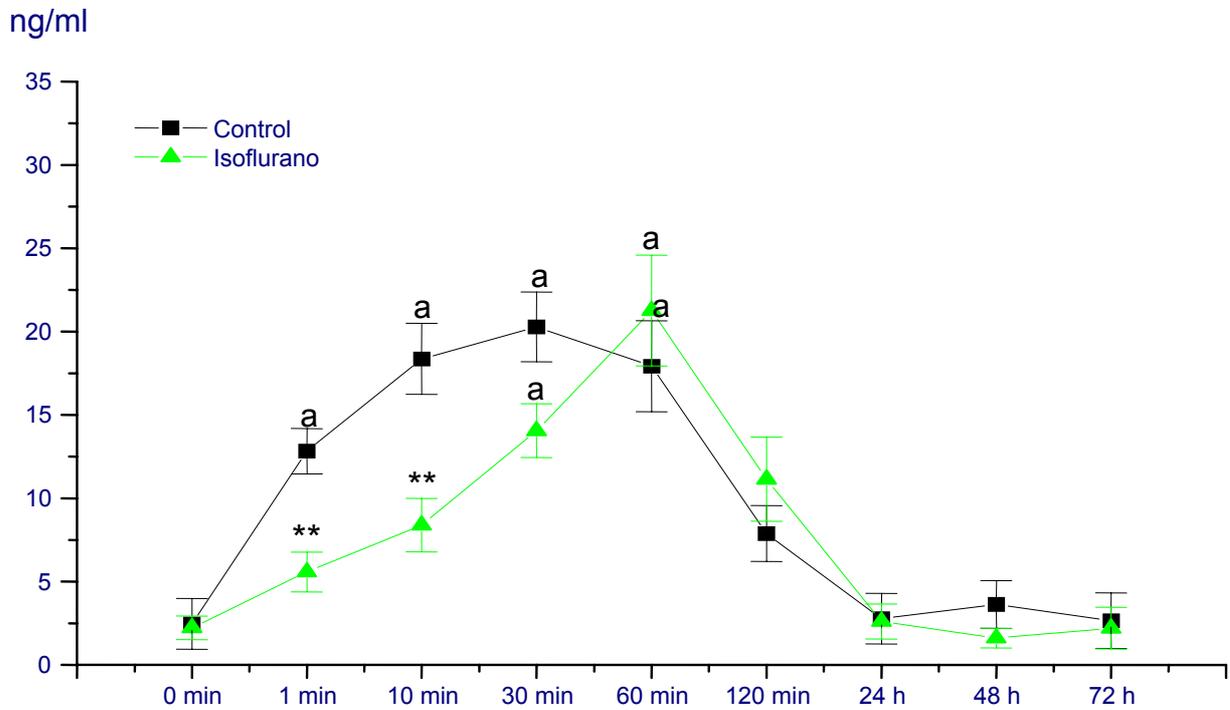
MUESTRAS	CONTROL	HALOTANO	ISOFLURANO
Inicial	2,46 \pm 1,51	2,00 \pm 0,69	2,22 \pm 0,71
1 min	12,82 \pm 1,36	19,48 \pm 2,06	5,58 \pm 1,19
10 min	18,36 \pm 2,13	22,84 \pm 2,80	8,39 \pm 1,60
30 min	20,28 \pm 2,09	27,23 \pm 2,36	14,06 \pm 1,61
60 min	17,92 \pm 2,73	20,65 \pm 2,70	21,27 \pm 3,32
120 min	7,88 \pm 1,67	15,58 \pm 2,80	11,14 \pm 2,52
24 horas	2,78 \pm 1,52	1,65 \pm 0,70	2,61 \pm 1,04
48 horas	3,63 \pm 1,43	1,29 \pm 0,77	1,61 \pm 0,60
72 horas	2,65 \pm 1,66	2,19 \pm 0,90	2,21 \pm 1,25



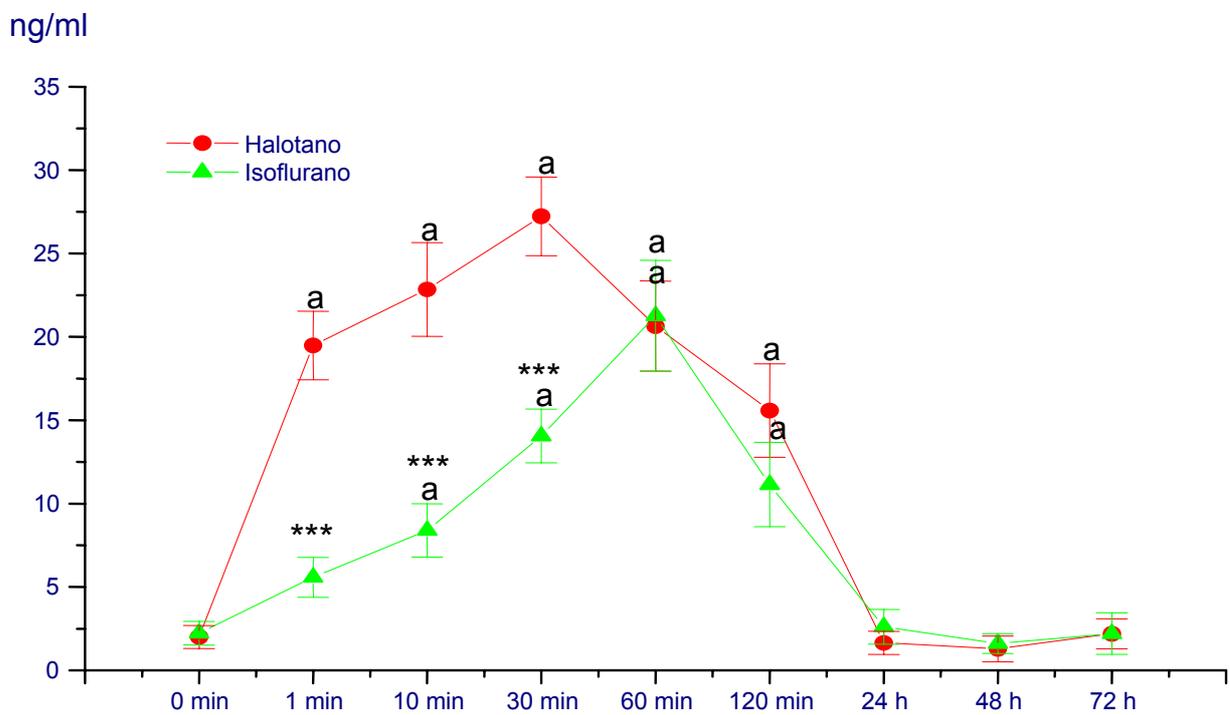
Gráfica 19.- Efectos de los grupos control, halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de **corticosterona** (ng/ml) a distintos tiempos.



Gráfica 20.- Efectos de los grupos control y halotano sobre la concentración sérica de **corticosterona** (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 21.- Efectos de los grupos control e isoflurano sobre la concentración sérica de **corticosterona** (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 22.- Efectos de los grupos halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de **corticosterona** (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

CORTISOL SÉRICO

En la **Gráfica 23** y la **Tabla 9** representamos las medias (\pm ESM) de las distintas concentraciones séricas de cortisol según el grupo.

Los niveles séricos de cortisol presentaron variaciones tanto con el tratamiento anestésico utilizado ($p < 0,1$) como en los distintos tiempos ($p < 0,05$). También, fue observada una interacción ($p < 0,05$) entre el factor anestésico y el factor tiempo durante la anestesia, encontrándose un efecto significativo del anestésico sobre las concentraciones séricas de cortisol.

Cuando analizamos el grupo control, observamos un aumento ($p < 0,05$) desde el primer minuto tras la intubación hasta los 30 minutos, momento en el cual cesó la administración de oxígeno con la mascarilla (**Gráficas 24 y 25**). Este incremento llegó a ser hasta de un 220 % a los 30 minutos (de los $0,60 \pm 0,33$ ng/ml iniciales hasta los $1,92 \pm 0,98$ ng/ml). Estos valores continuaron por encima de los valores basales hasta los 120 minutos, aunque ya no fueron estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

En el grupo halotano, fueron observadas diferencias ($p > 0,05$) en las concentraciones séricas de cortisol de 1-120 minutos tras la intubación, cuando las comparamos con los niveles basales (0 minutos), con diferencias que llegaron a ser de hasta un 332% respecto al valor inicial (de $0,73 \pm 0,14$ ng/ml iniciales a los $3,16 \pm 0,5$ ng/ml a los 120 minutos) (**Gráficas 24 y 26**).

También, fue observado un aumento estadísticamente significativo en el grupo isoflurano cuando lo comparamos con los niveles basales, de 1-120 minutos, siendo este incremento mayor a los 60 minutos: de $0,56 \pm 0,08$ ng/ml iniciales hasta los $3,13 \pm 0,45$ ng/ml (**Gráficas 25 y 26**).

Dentro de cada grupo, a las 24 horas, las concentraciones séricas de cortisol recuperaron los niveles basales y ya no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$).

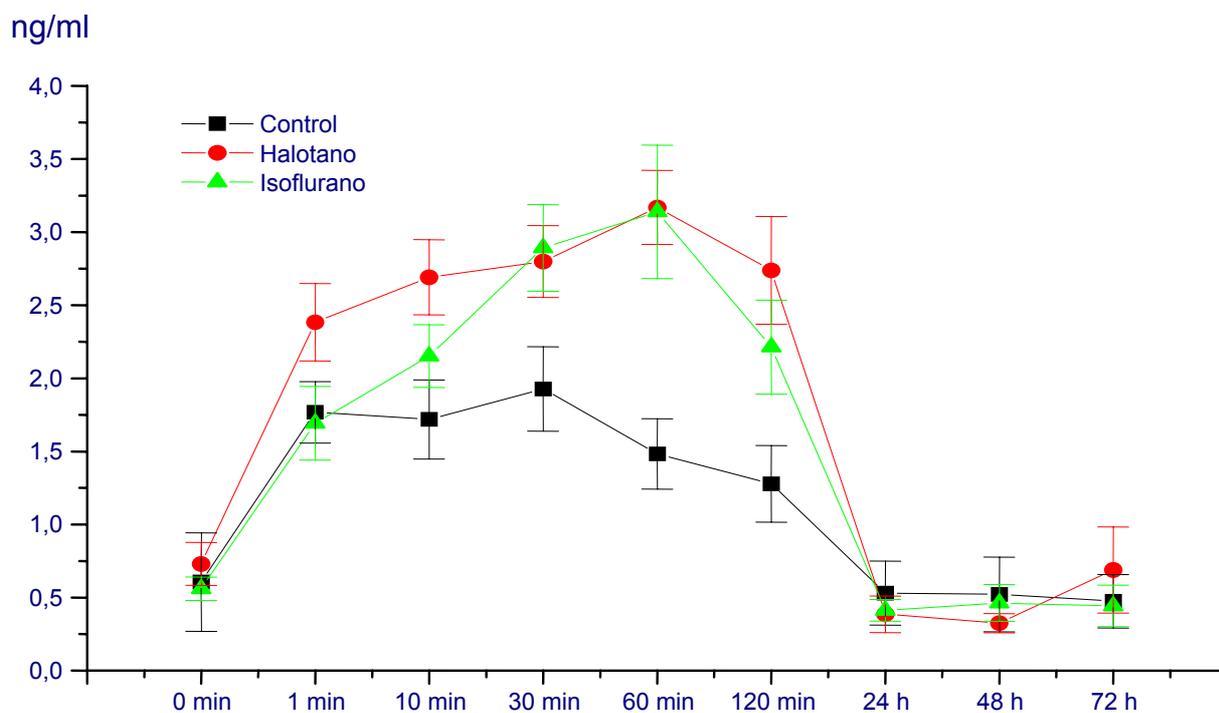
Al comparar las concentraciones séricas de cortisol entre los distintos grupos, observamos diferencias ($p < 0,05$) cuando comparamos el grupo control con el grupo halotano, al minuto y a los 10-120 minutos, llegando a ser este aumento mayor a los 60 minutos (de $1,73 \pm 0,36$ ng/ml del grupo control a los $3,13 \pm 0,45$ del grupo halotano) (**Gráfica 24**).

Las concentraciones séricas de cortisol aumentaron significativamente desde los 30 a los 120 minutos de la intubación en el grupo isoflurano cuando las comparamos con los niveles del grupo control: de $1,73 \pm 0,36$ ng/ml del grupo control a $3,13 \pm 0,45$ ng/ml en el grupo isoflurano a los 60 minutos) (**Gráfica 25**).

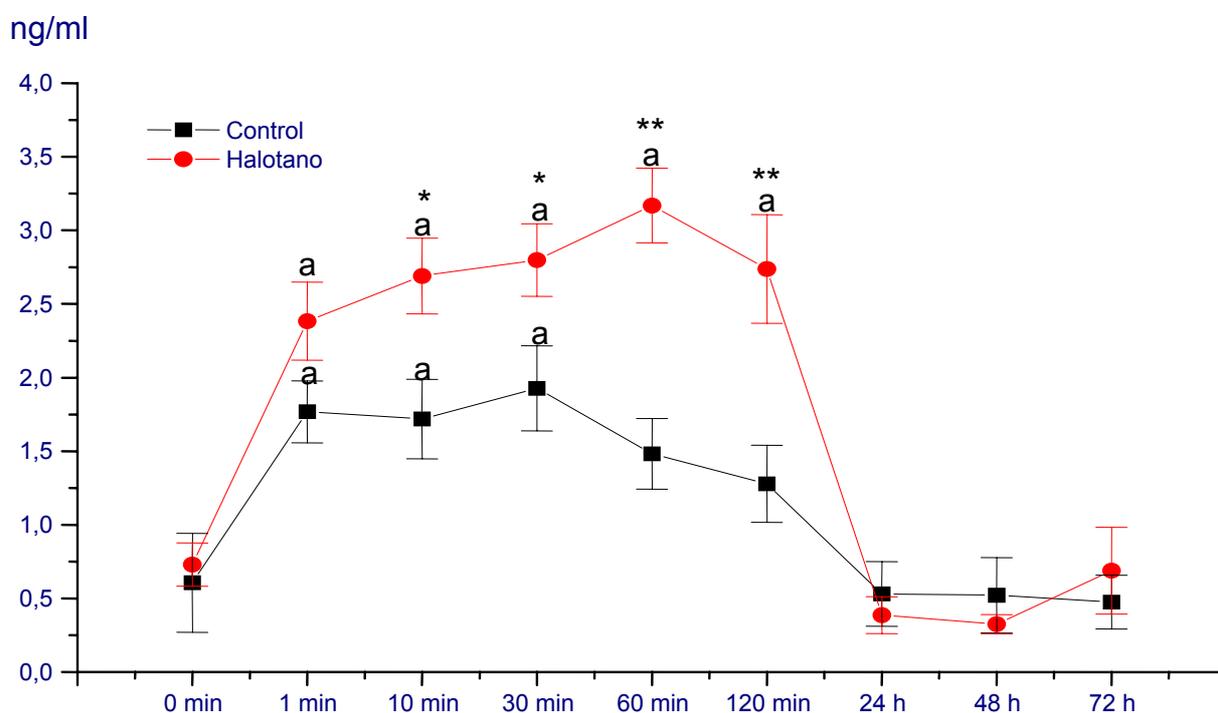
También observamos diferencias ($p < 0,05$) entre los grupos halotano e isoflurano al minuto de la intubación ($2,38 \pm 0,26$ ng/ml en el grupo halotano y $1,69 \pm 0,25$ ng/ml en el grupo isoflurano) (**Gráfica 26**).

Tabla 9.- Concentraciones plasmáticas (medias \pm ESM) de **cortisol** (ng/ml) durante la experimentación con los diferentes tratamientos anestésicos

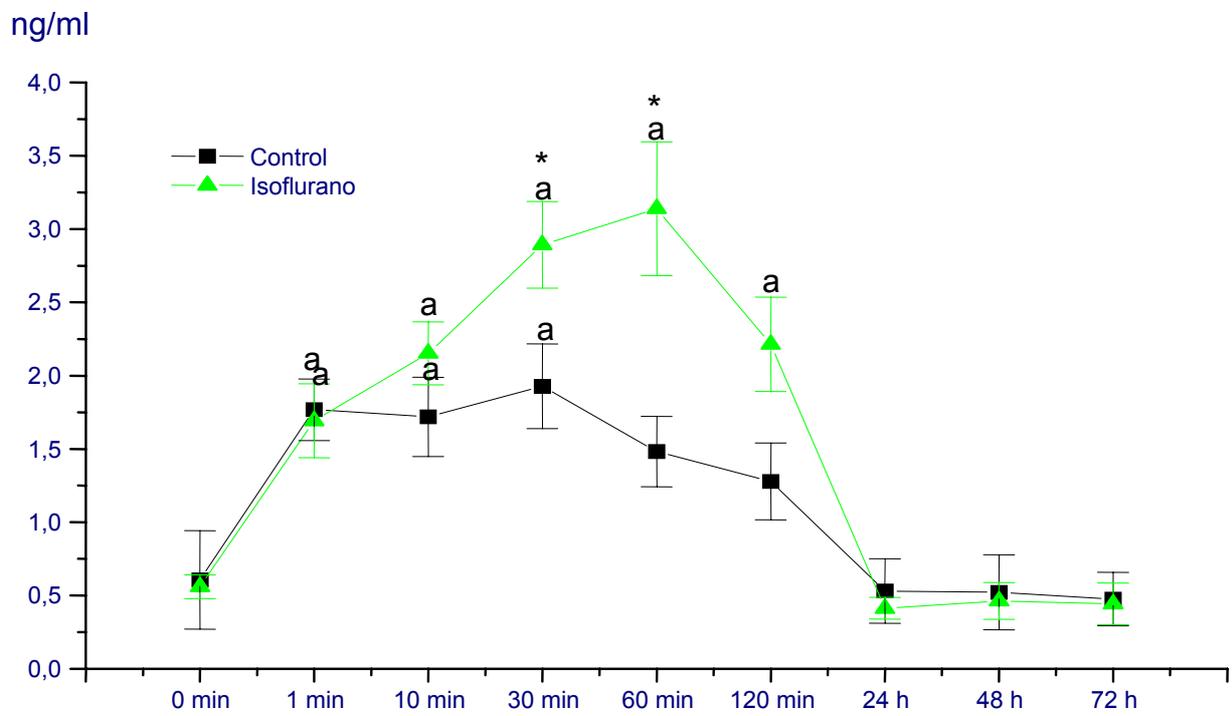
MUESTRAS	CONTROL	HALOTANO	ISOFLURANO
Inicial	0,61 \pm 0,34	0,73 \pm 0,15	0,56 \pm 0,08
1 min	1,77 \pm 0,21	2,38 \pm 0,26	1,69 \pm 0,25
10 min	1,72 \pm 0,27	2,69 \pm 0,26	2,15 \pm 0,21
30 min	1,93 \pm 0,29	2,80 \pm 0,25	2,89 \pm 0,30
60 min	1,48 \pm 0,24	3,17 \pm 0,25	3,14 \pm 0,46
120 min	1,28 \pm 0,26	2,77 \pm 0,37	2,21 \pm 0,32
24 horas	0,53 \pm 0,22	0,39 \pm 0,13	0,41 \pm 0,07
48 horas	0,52 \pm 0,26	0,32 \pm 0,07	0,46 \pm 0,13
72 horas	0,48 \pm 0,18	0,69 \pm 0,29	0,44 \pm 0,14



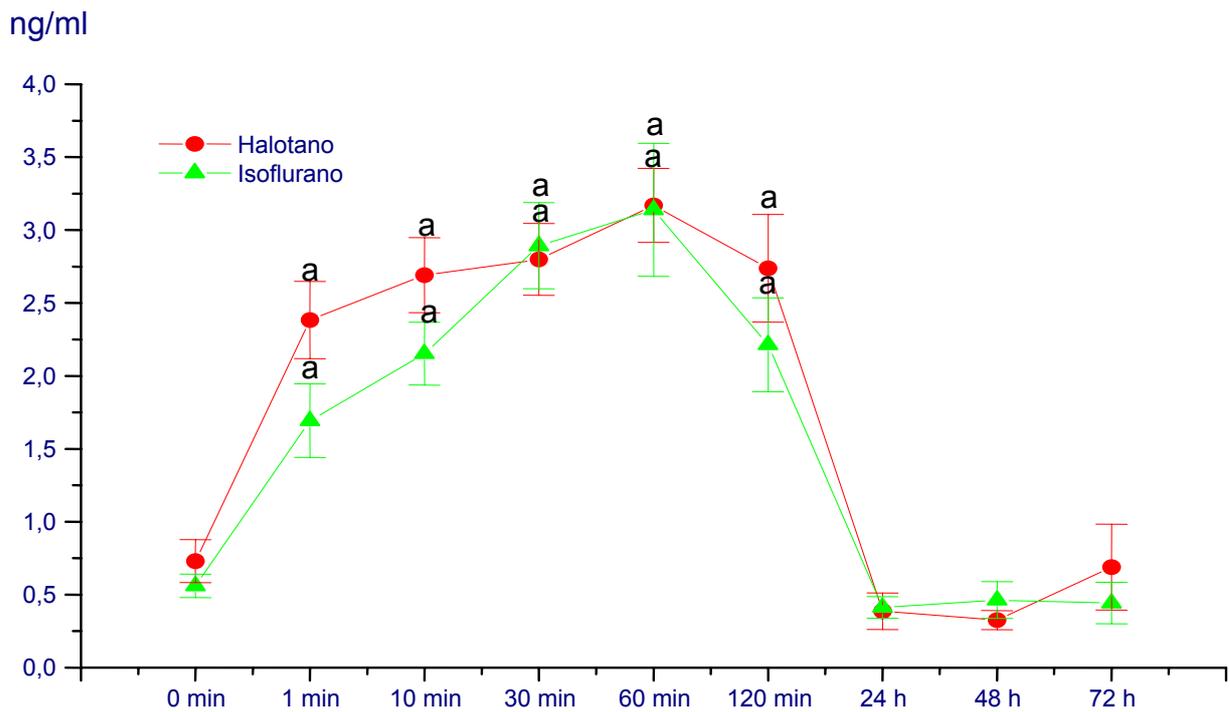
Gráfica 23.- Efectos de los grupos control, halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de cortisol (ng/ml) a distintos tiempos.



Gráfica 24.- Efectos de los grupos control y halotano sobre la concentración sérica de cortisol (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 25.- Efectos de los grupos control e isoflurano sobre la concentración sérica de cortisol (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 26.- Efectos de los grupos halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de cortisol (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

EPINEFRINA SÉRICA

En la **Gráfica 27** y la **Tabla 10** representamos las medias (\pm ESM) de las distintas concentraciones séricas de epinefrina según el grupo.

Las concentraciones de epinefrina en suero experimentaron variaciones tanto con el anestésico utilizado ($p < 0,05$) como en los distintos tiempos ($p < 0,05$). Se observó una interacción ($p < 0,05$) entre el anestésico y el tiempo durante el periodo de anestesia. Por ello, en determinados tiempos, se encontró un efecto significativo del anestésico sobre los niveles séricos de epinefrina.

Dentro del grupo control, no observamos diferencias ($p < 0,05$) durante toda la experimentación (**Gráficas 28 y 29**).

Sin embargo, en el grupo halotano sí observamos una diferencia ($p < 0,05$) al minuto de la intubación cuando la comparamos con los valores basales, pasando de $0,086 \pm 0,008$ ng/ml en la toma basal hasta los $0,140 \pm 0,010$ ng/ml al minuto de la intubación, un incremento de casi un 63 % (**Gráficas 28 y 30**). A los 10 minutos de la intubación, las concentraciones séricas de epinefrina ya habían disminuido hasta no ser estadísticamente significativas respecto a los valores basales. Así se mantuvieron hasta el final de la experimentación.

En el grupo Isoflurano, no tuvo lugar ninguna diferencia ($p > 0,05$) durante la fase de anestesia. Sin embargo, durante la recuperación de la anestesia se observó un incremento ($p < 0,05$) a los 60 minutos de la intubación (30 minutos tras el cierre del vaporizador de halotano) cuando comparamos con las concentraciones basales (tiempo 0). A los 120 minutos estos valores

segúan por encima de los basales pero ya no eran estadísticamente significativos (**Gráficas 29 y 30**).

Dentro de cada grupo, a las 24 horas, las concentraciones séricas de epinefrina se equipararon a las concentraciones basales (0 minutos), careciendo de significación estadística.

Al comparar el grupo control con los distintos grupos observamos, en primer lugar, diferencias estadísticamente significativas con el grupo halotano un minuto después de la intubación: de los $0,094 \pm 0,009$ ng/ml en el grupo control a los $0,140 \pm 0,010$ ng/ml en el grupo halotano, aproximadamente un incremento de un 49 % (**Gráfica 28**).

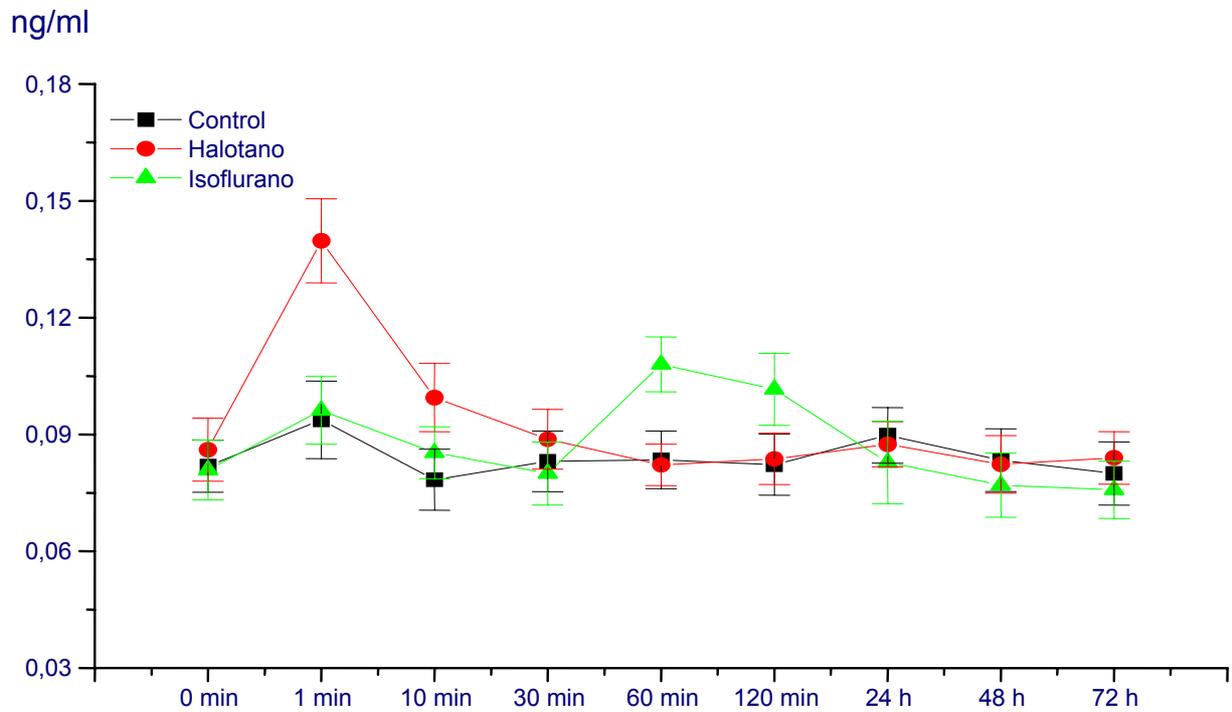
En segundo lugar, cuando comparamos el grupo control con el grupo isoflurano, también observamos un incremento estadísticamente significativo de las concentraciones séricas de epinefrina a los 60 minutos de la intubación en el grupo isoflurano, por tanto, durante el periodo de recuperación de la anestesia (**Gráfica 29**).

Al comparar los grupos halotano e isoflurano, observamos una diferencia estadísticamente significativa a los 10 minutos de la intubación (**Gráfica 30**).

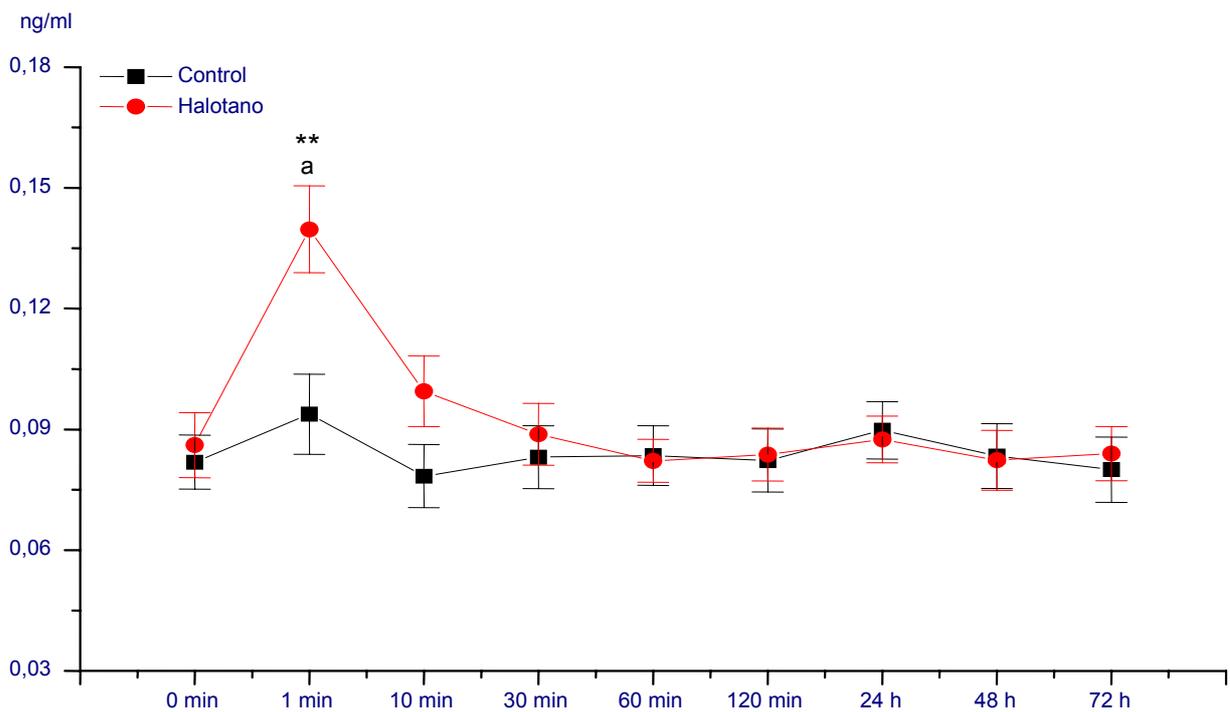
A partir de los 120 minutos, ya no encontramos diferencias ($p > 0,05$) entre los distintos grupos hasta el final de la experimentación.

Tabla 10.- Concentraciones plasmáticas (medias \pm ESM) de **epinefrina** (ng/ml) durante la experimentación con los diferentes anestésicos

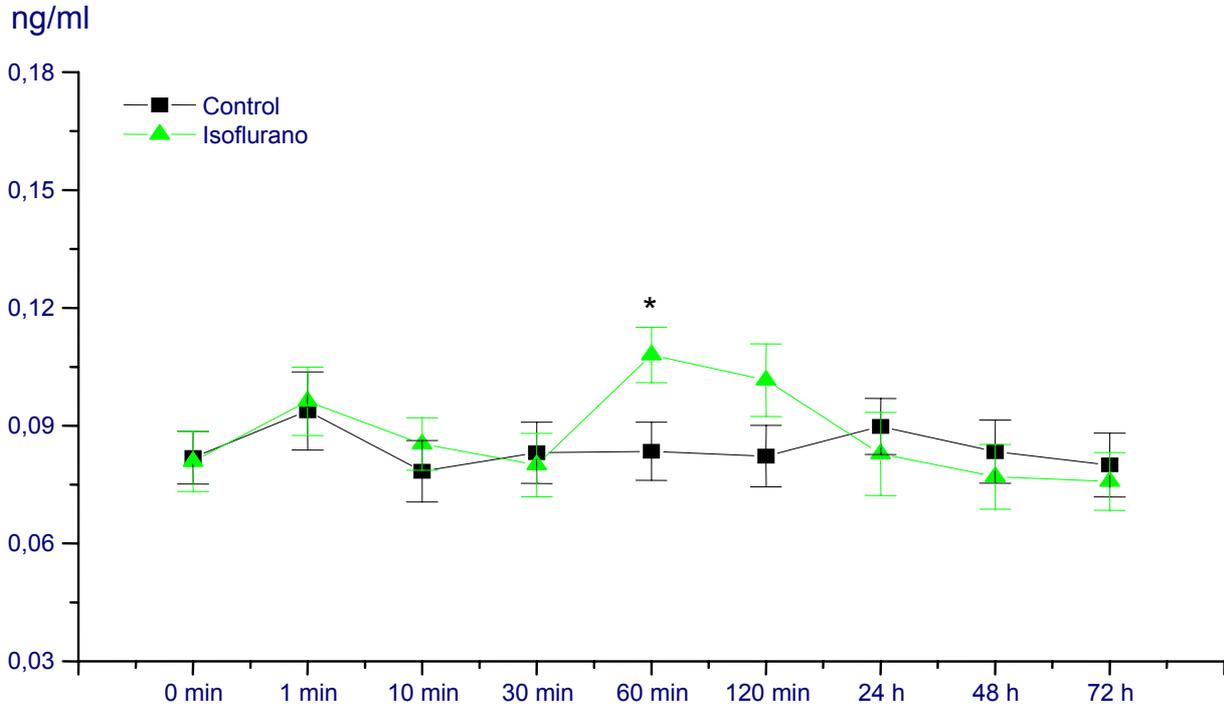
MUESTRAS	CONTROL	HALOTANO	ISOFLURANO
Inicial	0,087 \pm 0,007	0,086 \pm 0,008	0,081 \pm 0,008
1 min	0,094 \pm 0,010	0,140 \pm 0,011	0,096 \pm 0,009
10 min	0,078 \pm 0,008	0,100 \pm 0,009	0,085 \pm 0,007
30 min	0,083 \pm 0,008	0,089 \pm 0,008	0,080 \pm 0,008
60 min	0,084 \pm 0,007	0,082 \pm 0,005	0,108 \pm 0,007
120 min	0,082 \pm 0,008	0,084 \pm 0,007	0,102 \pm 0,009
24 horas	0,090 \pm 0,007	0,088 \pm 0,006	0,083 \pm 0,011
48 horas	0,083 \pm 0,008	0,082 \pm 0,007	0,077 \pm 0,008
72 horas	0,080 \pm 0,008	0,084 \pm 0,007	0,076 \pm 0,007



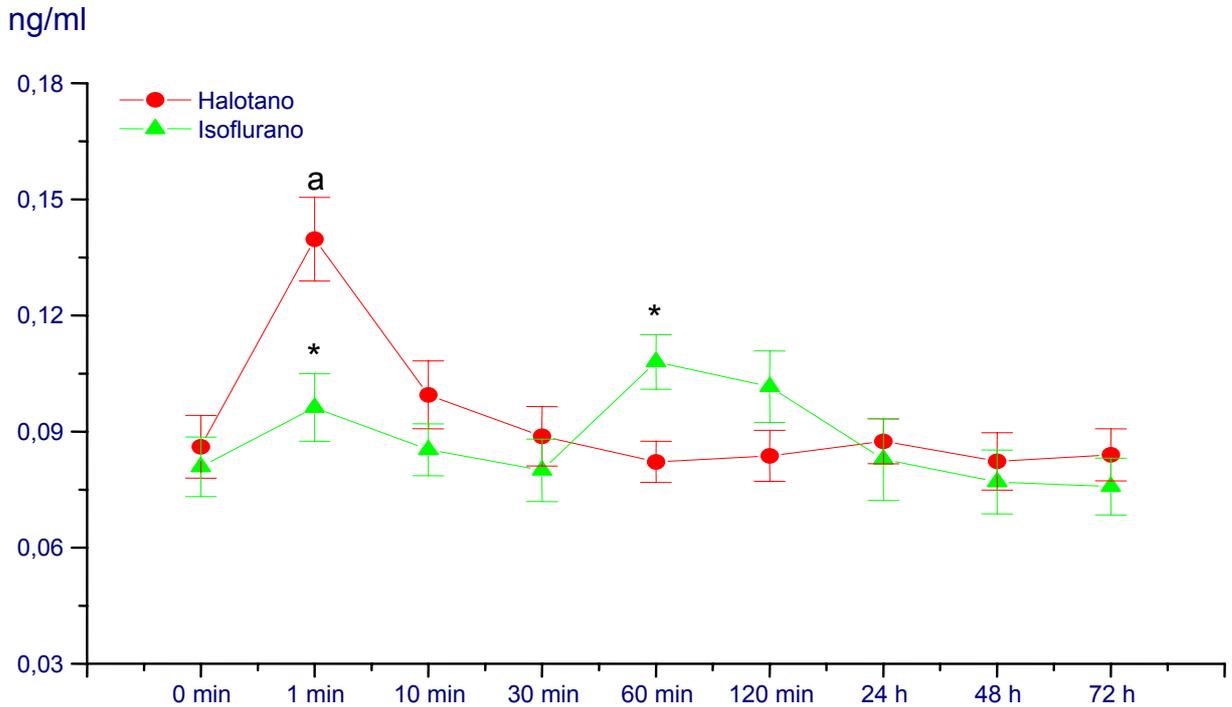
Gráfica 27.- Efectos de los grupos control, halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de epinefrina (ng/ml) a distintos tiempos.



Gráfica 28.- Efectos de los grupos control y halotano sobre la concentración sérica de epinefrina (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 29.- Efectos de los grupos control e isoflurano sobre la concentración sérica de epinefrina (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 30.- Efectos de los grupos halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de epinefrina (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

NOREPINEFRINA SÉRICA

En la **Gráfica 31** y la **Tabla 11** representamos las medias (\pm ESM) de las distintas concentraciones séricas de norepinefrina según el grupo.

Las concentraciones séricas de norepinefrina experimentaron cambios tanto con el anestésico utilizado ($p < 0,05$) como en los distintos tiempos ($p < 0,05$). También, entre el anestésico y el tiempo durante la anestesia, se observó una interacción ($p < 0,05$), encontrándose en determinados tiempos, un efecto significativo del anestésico sobre los niveles de norepinefrina sérica.

En el grupo control no observamos diferencias ($p > 0,05$) durante toda la experimentación, aunque se aprecia un ligero incremento al minuto de la intubación respecto a los niveles basales pero que no fue estadísticamente significativo (**Gráficas 32 y 33**).

Cuando comparamos las distintas concentraciones séricas de norepinefrina dentro del grupo halotano, observamos un incremento estadísticamente significativo desde la toma inicial hasta la toma realizada al minuto de la intubación: de $0,82 \pm 0,11$ ng/ml de la toma basal hasta los $1,50 \pm 0,12$ ng/ml al minuto de la intubación, lo que supone un incremento de casi un 83 % (**Gráficas 32 y 34**). Estas concentraciones alcanzaron nuevamente los valores iniciales ($p > 0,05$) a los 10 minutos de la intubación, manteniéndose así hasta el final de la experimentación.

En el grupo isoflurano fue observado un progresivo descenso de las concentraciones séricas de norepinefrina durante la fase de mantenimiento de la anestesia, pero que no llegó a ser estadísticamente significativo respecto a las concentraciones iniciales (tiempo 0) (**Gráficas 33 y 34**). Durante la recuperación, tampoco fueron observadas diferencias ($p > 0,05$).

En todos los grupos, tras la anestesia, no se apreciaron diferencias

estadísticamente significativas en las concentraciones séricas de norepinefrina, respecto a las concentraciones iniciales.

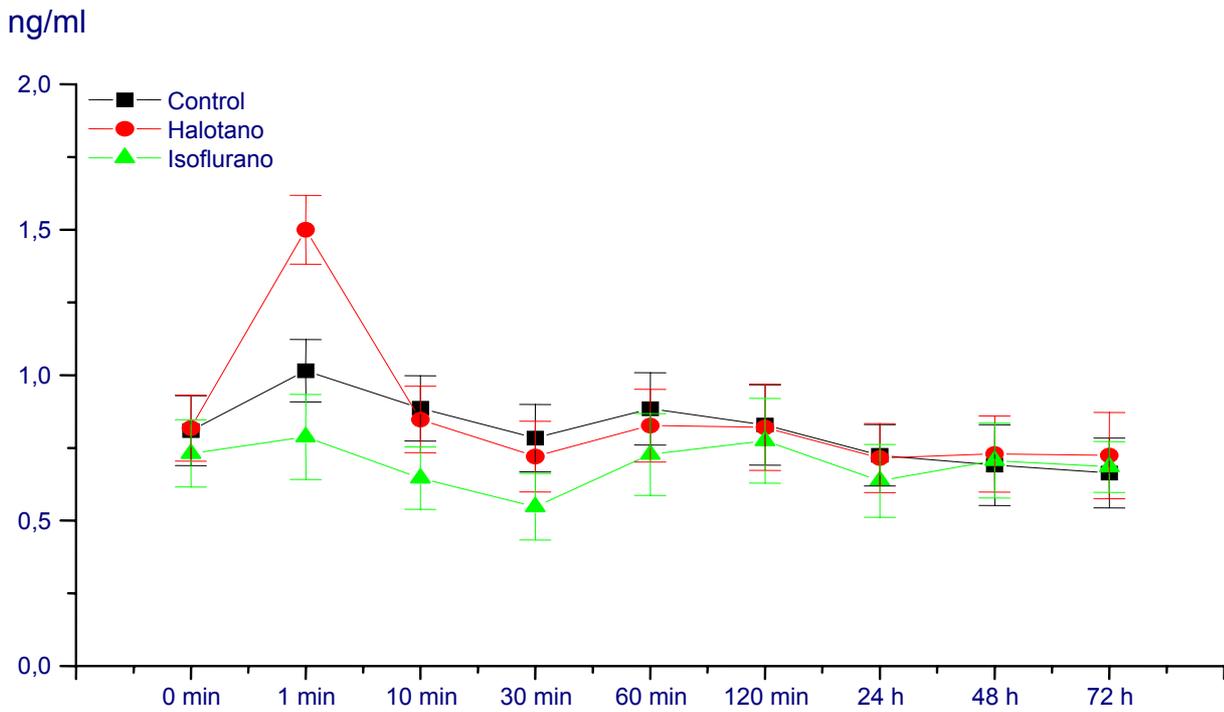
Cuando comparamos el grupo control con los distintos grupos, encontramos una diferencia ($p < 0,05$) con el grupo halotano, un minuto después de la intubación: de $1,01 \pm 0,11$ ng/ml en el grupo control a $1,50 \pm 0,12$ ng/ml en el grupo halotano, aproximadamente un incremento de un 50 % **(Gráfica 32)**.

Al comparar el grupo control con el grupo isoflurano, no observamos ninguna diferencia estadísticamente significativa, aunque las concentraciones de norepinefrina en el grupo isoflurano estuvieron por debajo de las del grupo control durante el mantenimiento de la anestesia **(Gráfica 33)**.

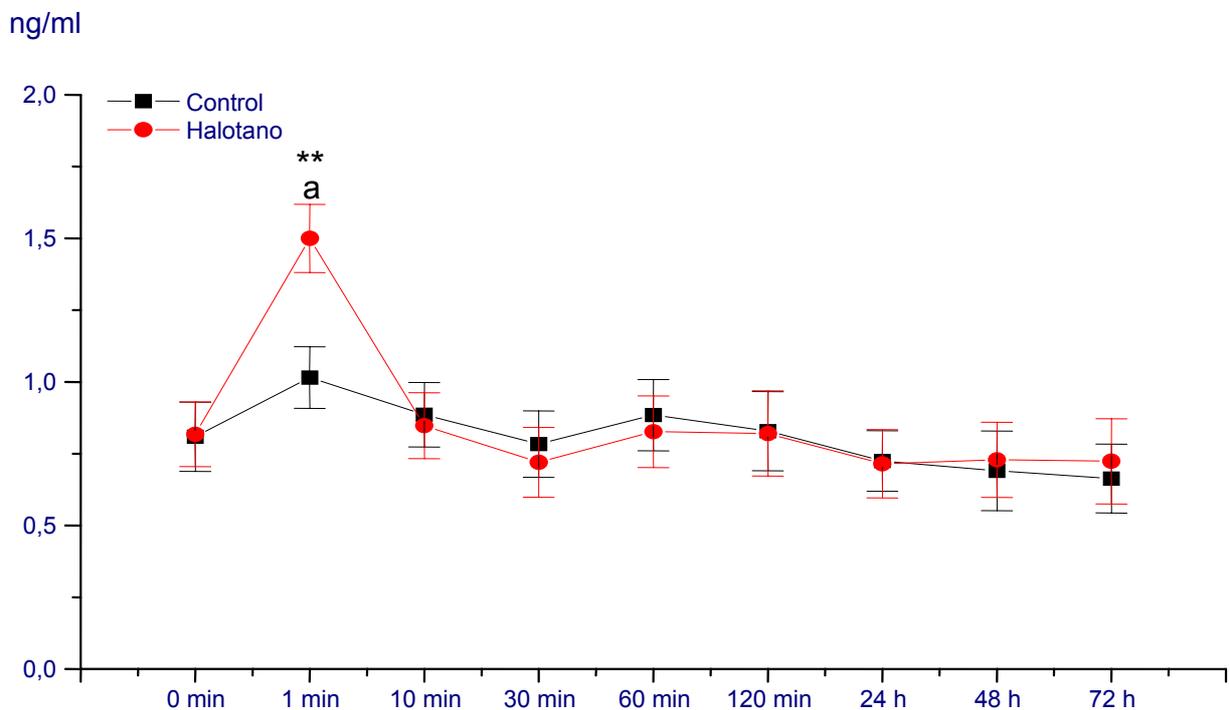
Cuando comparamos los grupos halotano e isoflurano encontramos un incremento ($p < 0,05$) en el grupo halotano respecto al grupo isoflurano un minuto después de la intubación, no observándose diferencias ($p > 0,05$) posteriormente **(Gráfica 34)**.

Tabla 11.- Concentraciones plasmáticas (medias \pm ESM) de **norepinefrina** (ng/ml) durante la experimentación con los diferentes anestésicos

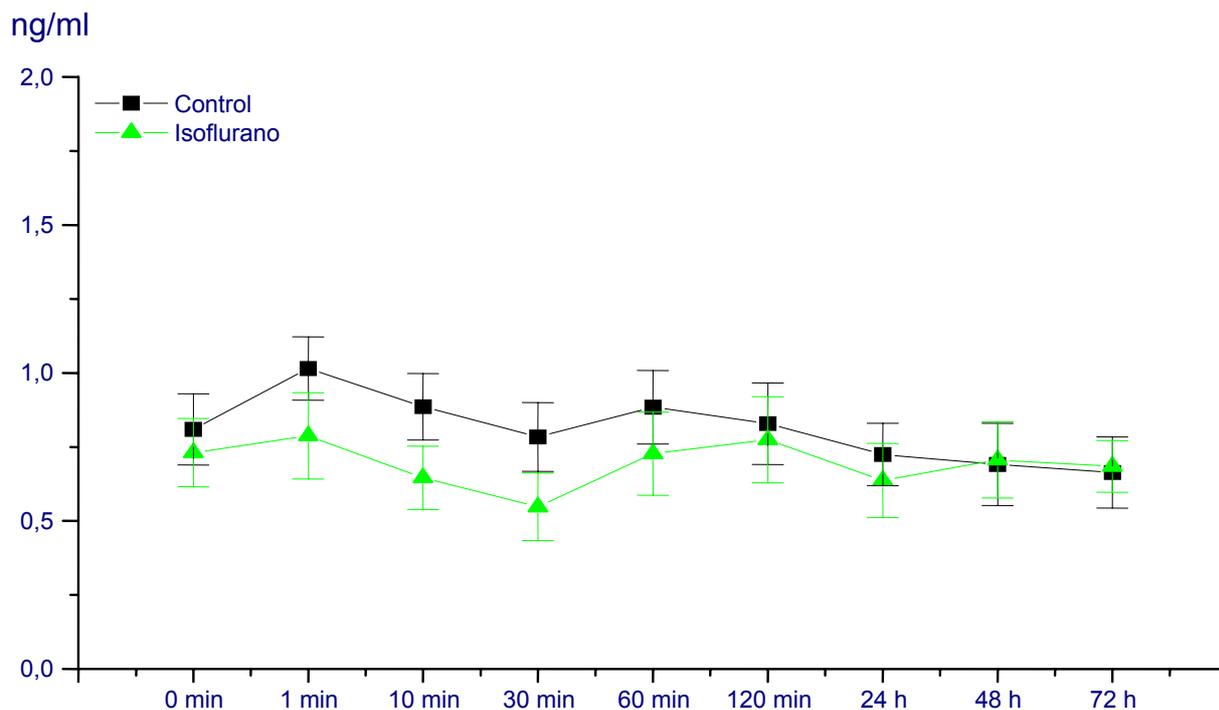
MUESTRAS	CONTROL	HALOTANO	ISOFLURANO
Inicial	0,809 \pm 0,120	0,818 \pm 0,113	0,731 \pm 0,115
1 min	1,015 \pm 0,107	1,500 \pm 0,119	0,788 \pm 0,146
10 min	0,886 \pm 0,112	0,848 \pm 0,115	0,646 \pm 0,107
30 min	0,784 \pm 0,116	0,720 \pm 0,121	0,548 \pm 0,115
60 min	0,884 \pm 0,124	0,827 \pm 0,125	0,727 \pm 0,141
120 min	0,829 \pm 0,138	0,821 \pm 0,148	0,774 \pm 0,146
24 horas	0,725 \pm 0,105	0,715 \pm 0,119	0,637 \pm 0,125
48 horas	0,691 \pm 0,139	0,729 \pm 0,131	0,706 \pm 0,129
72 horas	0,663 \pm 0,120	0,724 \pm 0,148	0,684 \pm 0,087



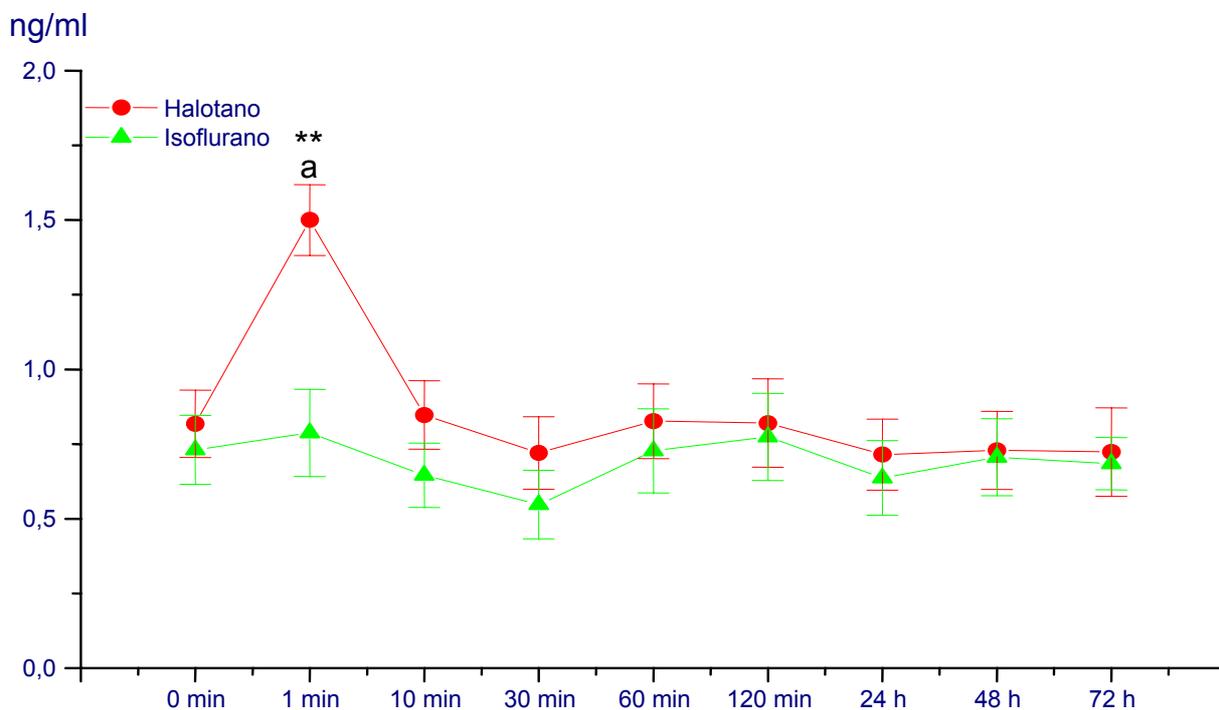
Gráfica 31.- Efectos de los grupos control, halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de norepinefrina (ng/ml) a distintos tiempos.



Gráfica 32.- Efectos de los grupos control y halotano sobre la concentración sérica de norepinefrina (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 33.- Efectos de los grupos control e isoflurano sobre la concentración sérica de norepinefrina (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 34.- Efectos de los grupos halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de norepinefrina (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

SEROTONINA SÉRICA

En la **Gráfica 35** y la **Tabla 12** representamos las medias (\pm ESM) de las distintas concentraciones séricas de serotonina según el grupo.

Los niveles de serotonina en suero experimentaron una serie de variaciones tanto con el tratamiento anestésico empleado ($p < 0,05$) como en los distintos tiempos ($p < 0,05$). Se encontró una interacción ($p < 0,05$) entre el anestésico utilizado y el tiempo durante el periodo de anestesia y, especialmente, en el periodo de recuperación. De esta manera, en determinados tiempos, observamos una influencia significativa del anestésico sobre las concentraciones séricas de serotonina.

En el grupo control observamos un aumento ($p < 0,05$) desde el primer minuto tras la intubación hasta los 120 minutos, llegando a ser hasta de un 52% respecto a las concentraciones basales (de $108,52 \pm 6,60$ ng/ml iniciales a $165,06 \pm 11,88$ ng/ml a los 120 minutos) (**Gráficas 36 y 37**).

En el grupo halotano, no se observó ninguna variación ($p > 0,05$) respecto a las concentraciones basales (0 minutos) (**Gráficas 36 y 38**).

También fue observado un aumento estadísticamente significativo de 10-120 minutos en el grupo isoflurano, cuando comparamos con las concentraciones basales, siendo este aumento más significativo a los 120 minutos donde se incrementaron las concentraciones un 95 % (de $113,44 \pm 9,46$ ng/ml basales a $221,65 \pm 14,08$ ng/ml) (**Gráficas 37 y 38**).

Dentro de cada grupo, a las 24 horas, las concentraciones séricas de serotonina se equipararon a las concentraciones basales (0 minutos).

Al comparar el grupo control con el grupo halotano observamos un descenso estadísticamente significativo en las concentraciones séricas de

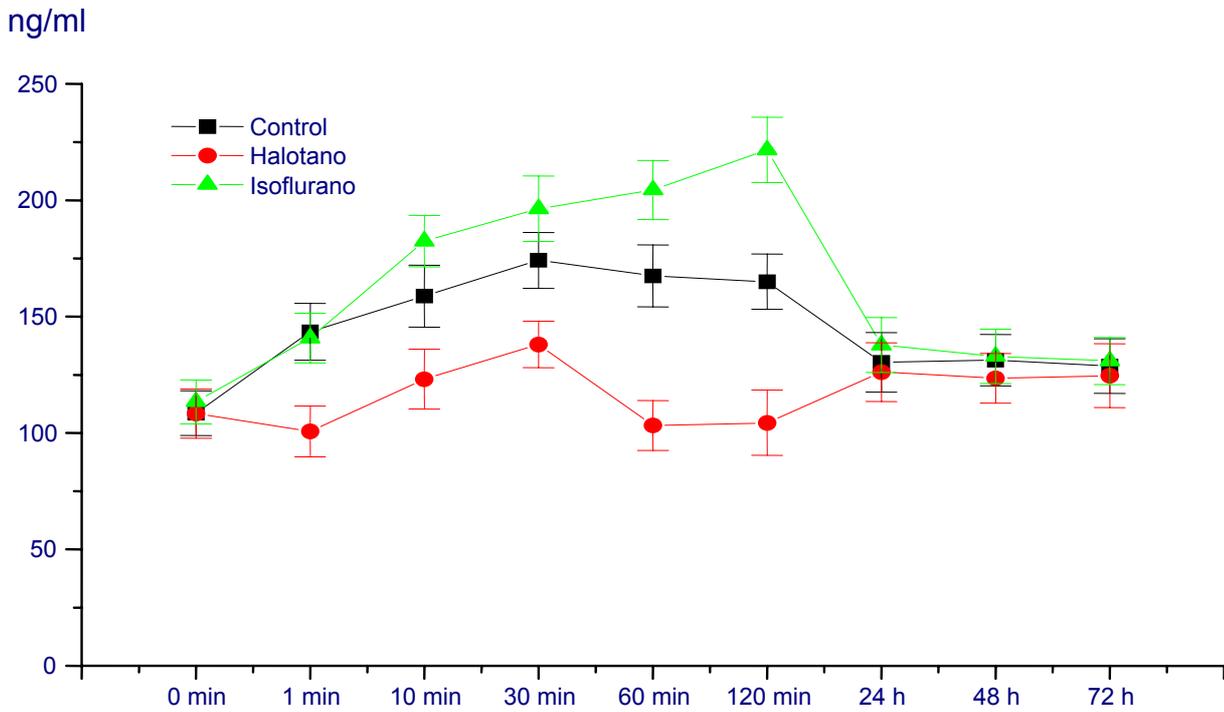
serotonina en el grupo halotano respecto al grupo control, al primer minuto tras la intubación y a los 30, 60 y 120 minutos, siendo más evidente la diferencia a los 120 minutos (165,06 ± 11,88 ng/ml en el grupo control y 104,42 ± 14,02 ng/ml en el grupo halotano, un 37 % más bajo) (**Gráfica 36**).

Cuando comparamos las concentraciones séricas de serotonina entre el grupo control y el grupo isoflurano, observamos diferencias ($p < 0,05$) a los 120 minutos (de 165,06 ± 11,87 ng/ml del grupo control a 221,66 ± 14,08 ng/ml del grupo isoflurano) (**Gráfica 37**).

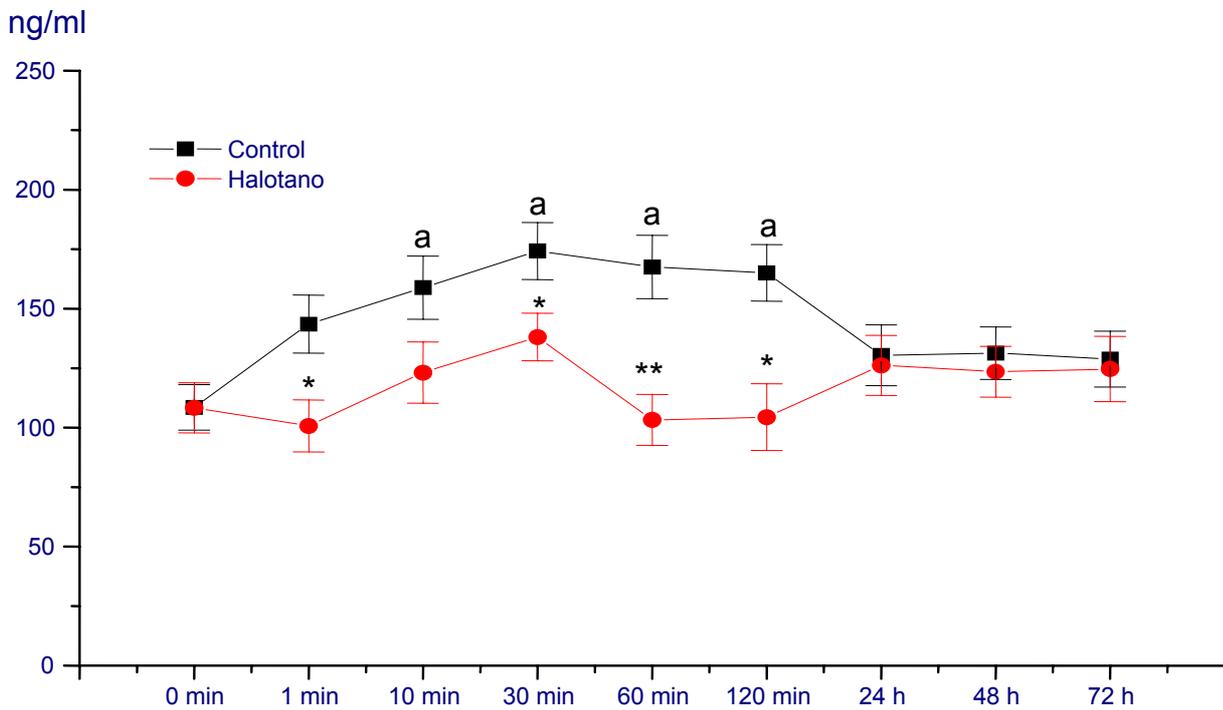
Si comparamos el grupo halotano con el grupo isoflurano, encontramos diferencias estadísticamente significativas desde el primer minuto tras la intubación hasta los 120 minutos, siendo más evidente a los 120 minutos, donde los niveles en el grupo isoflurano fueron un 53 % más altos que los del grupo halotano (221,66 ± 14,08 ng/ml en el grupo isoflurano y 104,42 ± 14,02 ng/ml en el grupo halotano) (**Gráfica 38**).

Tabla 12.- Concentraciones plasmáticas (medias \pm ESM) de **serotonina** (ng/ml) durante la experimentación con los diferentes anestésicos

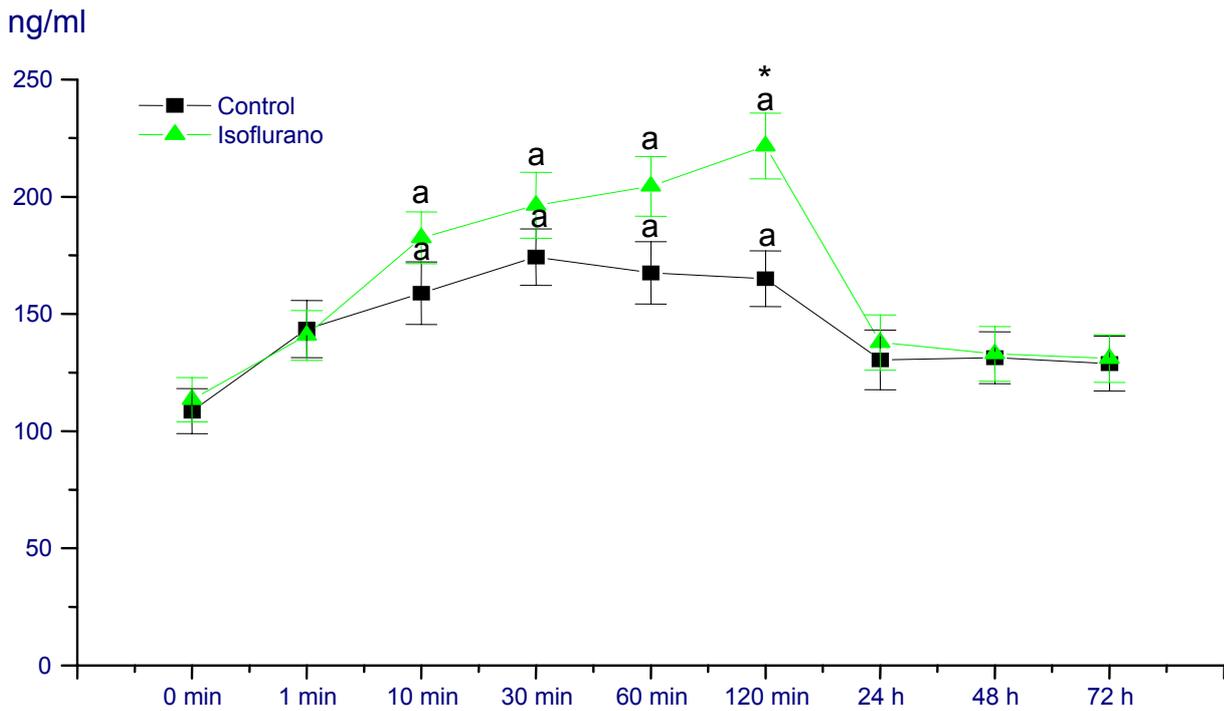
MUESTRAS	CONTROL	HALOTANO	ISOFLURANO
Inicial	108,52 \pm 9,60	108,32 \pm 10,53	113,44 \pm 9,46
1 min	143,53 \pm 12,19	100,70 \pm 10,90	140,84 \pm 10,64
10 min	158,85 \pm 13,32	123,15 \pm 12,89	182,49 \pm 11,05
30 min	174,26 \pm 12,02	138,07 \pm 9,99	196,34 \pm 14,06
60 min	167,52 \pm 13,34	103,25 \pm 10,70	204,45 \pm 12,72
120 min	165,06 \pm 11,89	104,42 \pm 14,03	221,66 \pm 14,08
24 horas	130,42 \pm 12,77	126,17 \pm 12,63	137,79 \pm 11,80
48 horas	131,31 \pm 11,05	123,51 \pm 10,68	132,96 \pm 11,70
72 horas	128,81 \pm 11,76	124,63 \pm 13,75	130,96 \pm 10,14



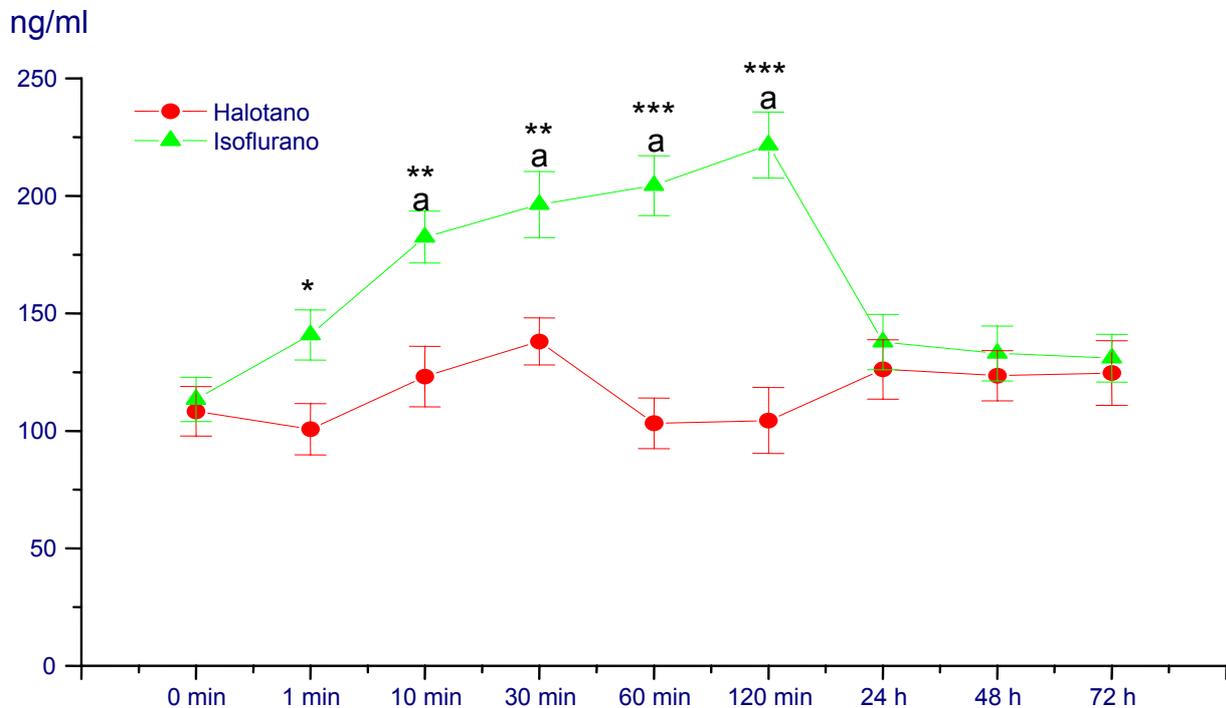
Gráfica 35.- Efectos de los grupos control, halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de **serotonina** (ng/ml) a distintos tiempos.



Gráfica 36.- Efectos de los grupos control y halotano sobre la concentración sérica de **serotonina** (ng/ml) a distintos tiempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 37.- Efectos de los grupos control e isoflurano sobre la concentración sérica de **serotonina** (ng/ml) a distintos tiempos. *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001; **a** Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).



Gráfica 38.- Efectos de los grupos halotano e isoflurano sobre la concentración sérica de **serotonina** (ng/ml) a distintos tiempos. *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001; **a** Diferencia significativa con la toma inicial (0 min).

DISCUSIÓN

En nuestro experimento se ha investigado el efecto de dos anestésicos inhalatorios, el halotano y el isoflurano, sobre una serie de parámetros indicadores de la respuesta orgánica (frecuencia cardíaca y respiratoria, reflejos y temperatura rectal) y del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (ACTH, corticosterona, cortisol, epinefrina, norepinefrina y serotonina). Hemos considerado ambos anestésicos porque son los más empleados actualmente en la anestesia inhalatoria del conejo. Las tomas de sangre fueron realizadas a determinados tiempos, con el fin de conocer los valores previos al experimento (0 minutos), tras la intubación (1 minuto), durante el mantenimiento de la anestesia (10 y 30 minutos) y para evaluar la recuperación de la anestesia a corto (60 y 120 min) y a largo plazo (24, 48, y 72 h).

Ante el problema de encontrar un grupo control, cuyo único factor de diferenciación respecto al grupo problema fuese el distinto tratamiento administrado, es decir, el efecto del anestésico, pensamos que lo más adecuado sería seleccionar un grupo que recibiese idéntico manejo que los grupos problemas, pero que, en lugar del tratamiento anestésico/oxígeno, recibiese únicamente un 100% de oxígeno. Otros autores que han utilizado anestésicos inhalatorios en experimentos con ratas, también seleccionaron un grupo control al que se le hubiese administrado 100% de oxígeno (Agarwal *et al.*, 1994; Karuri *et al.*, 1998a).

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA ORGÁNICA

Por razones científicas y éticas, los investigadores y veterinarios están obligados a utilizar los anestésicos apropiados para los distintos procedimientos quirúrgicos. Desafortunadamente, no hay muchos datos disponibles sobre el efecto de los anestésicos sobre la respuesta orgánica, eficacia y seguridad en los conejos.

El plano quirúrgico de anestesia general en animales de laboratorio es definido como el estado en el cual el animal está inmóvil, no es consciente del proceso quirúrgico y tiene una respuesta al estrés atenuada. Los estudios sobre la concentración alveolar mínima o la concentración intravenosa mínima de anestesia muestran que hay una amplia variación individual en la respuesta a cada anestésico, por lo que es posible sobredosificar al animal. Si el anestésico tiene un estrecho margen de seguridad puede provocar la muerte del animal. Por esto, se recomienda la administración lenta observando el efecto de los anestésicos intravenosos o bien, el uso de agentes inhalatorios para la inducción de la anestesia, al considerarse un método más seguro y con una mayor consistencia en los animales (Whelan y Flecknell, 1992). Sin embargo, ha sido reconocido que es difícil conseguir un plano correcto de anestesia en esta especie. Los conejos son considerados como una de las especies de laboratorio más difíciles e impredecibles de anestesiar ya que su respuesta a los anestésicos más frecuentemente utilizados es muy variable y el margen entre la anestesia quirúrgica y la parada respiratoria es estrecho (Hobbs *et al.*, 1991).

En nuestro trabajo, todos los animales de los grupos anestesiados con halotano e isoflurano alcanzaron el plano de anestesia quirúrgica adecuado. Para ello, comprobamos la pérdida de los reflejos pedal, auricular, palpebral, corneal y de enderezamiento. El reflejo pedal es considerado uno de los mejores indicadores de anestesia quirúrgica en el conejo, aunque no debe emplearse como único indicador (Peeters *et al.*, 1988; Hobbs *et al.*, 1991; Hurley *et al.*, 1994). Sin embargo, el reflejo palpebral ha sido considerado por algunos autores como inconsistente y un indicador no muy fiable de profundidad anestésica. Incluso, en ocasiones, este reflejo puede ser abolido completamente sólo inmediatamente antes de una parada respiratoria (Hobbs *et al.*, 1991). Consideramos que, con los reflejos evaluados, podemos asegurar que el plano quirúrgico fue adecuado.

El primero de los reflejos en perderse, en ambos grupos de anestesia, fue el de enderezamiento o recuperación del decúbito esternal. Después el auricular y el pedal, y más tarde, el corneal y el palpebral. En el momento en el que no observamos ninguna respuesta del reflejo auricular y pedal, consideramos que el animal había alcanzado el plano anestésico adecuado y procedimos a la intubación.

Respecto al tiempo de inducción de la anestesia, en nuestro caso, hay que tener en cuenta que la inducción fue realizada con incrementos en el vaporizador de 0,5 % cada 30 segundos con lo que el tiempo de inducción se vio notablemente incrementado respecto a los de los animales con una administración rápida de la dosis. La inducción de la anestesia fue alcanzada con mayor rapidez en el grupo de animales anestesiados con isoflurano que en el grupo anestesiado con halotano (**Gráfica 1**). La diferencia en la inducción entre ambos anestésicos ha sido atribuída, principalmente, a sus diferencias en la solubilidad del gas en la sangre (Mutoh *et al.*, 1995). Esta inducción más rápida con isoflurano que con halotano también ha sido señalada en otras especies, como en el perro (Mutoh *et al.*, 1995), en caballos (Brunson, 1990) y en humanos (Loper *et al.*, 1987). Otros autores, sin embargo, no han observado diferencias en la velocidad de inducción entre estos dos anestésicos en el perro (Hellebrekers, 1986) o bien han encontrado una inducción más rápida con halotano en humanos (Fisher *et al.*, 1985). No obstante, algunos autores como Zbinden y col., en 1988, encontraron que, si bien el paso desde el espacio alveolar a la sangre es más rápido en el isoflurano que en el halotano, esto no ocurre cuando es desde la sangre al tejido cerebral.

Respecto a la calidad de la inducción, no apreciamos diferencias significativas en los intentos de escapar a la sujeción y a la mascarilla entre el grupo de animales anestesiados con isoflurano y el grupo anestesiado con halotano. Por otro lado, se ha observado que pacientes anestesiados con halotano tuvieron una fase de excitación en el electroencefalograma (EEG) mayor que en pacientes anestesiados con isoflurano (Loper *et al.*, 1987).

Según, Mutoh y col., en 1995, la inducción con isoflurano fue rápida aunque con algún grado de movimientos en perros. Otros autores, como McAteer y col., en 1986, señalaron que, tanto la inducción como el mantenimiento, fueron satisfactorios con isoflurano y con halotano, en perros, pero que hubo una mayor incidencia de salivación y laringoespasma con el isoflurano. Este último problema también ha sido observado con isoflurano, mientras que hubo una menor incidencia de excitación con el halotano en la especie humana (Pandit *et al.*, 1985). Además, Leach y col., en 2002, observaron un menor grado de aversión al halotano que al isoflurano en ratas. Este grado de aversión fue aumentando a medida que aumentaba la dosis del anestésico elegido.

La inducción se realizó mediante incrementos de 0,5% de anestésico cada 30 segundos. Este protocolo de inducción tiene el inconveniente de que el tiempo de inducción se incrementa considerablemente. Sin embargo, proporciona una mayor seguridad debido a que los periodos de apnea, muy frecuentes en esta especie tras la administración de anestésicos volátiles, se reducen bastante. En el momento en que se observaron periodos de apnea prolongados, de más de 30 segundos, procedíamos a retirar la administración de anestésico, de forma que sólo se le administraba oxígeno hasta que el animal comenzase a respirar por sí sólo. La apnea es un problema común en conejos anestesiados (Borkowski *et al.*, 1990; Flecknell *et al.*, 1999). En nuestro caso, no podemos asegurar el tiempo exacto de apnea en cada animal ya que para ello necesitaríamos de un monitor respiratorio. Teniendo en cuenta la sujeción del animal para evitar que se lesionase al intentar retirarse de la máscara inhalatoria y que la monitorización realizada de la frecuencia respiratoria se basó en la observación de los movimientos torácico-abdominales, no podemos afirmar con seguridad la duración de esos períodos apneicos, aunque estuvieron comprendidos entre 30-90 segundos aproximadamente, en ambos grupos. La administración rápida del anestésico acorta el periodo de inducción, pero por contra, aumenta el número y la duración de los periodos de apnea convirtiendo la inducción en más peligrosa para el animal.

En estudios previos, se ha observado que durante la inducción con ambos anestésicos, ocurrieron periodos prolongados de apnea en conejos (Flecknell *et al.*, 1996; Hedenqvist *et al.*, 2001). Según Hedenqvist y col. (2001), con una administración creciente de desflurano en lugar de una administración rápida, se reducían estos periodos de apnea, proporcionando una mayor seguridad para el paciente. Otros autores, también han recomendado esta administración creciente del anestésico en conejos (Flecknell *et al.*, 1996). A pesar del inconveniente de un considerable incremento en la duración de la inducción anestésica, consideramos primordial anteponer la seguridad del animal, siempre y cuando los planos anestésicos alcanzados sean los correctos.

Según algunos autores, el descenso en la frecuencia respiratoria tras el isoflurano fue incluso mucho más evidente en niños, probablemente debido a que los periodos de apnea fueron más prolongados por una inducción más rápida (Hausdorfer *et al.*, 1986).

Respecto a la recuperación de los distintos reflejos tras el cierre del vaporizador, en ambos grupos, primero se recuperaron los reflejos palpebral y corneal, luego el pedal y el auricular y, finalmente, el reflejo de enderezamiento. El animal fue llevado a su jaula de alojamiento cuando recuperó éste último reflejo.

En cuanto a la duración del periodo de recuperación, también fue algo más corto en el grupo isoflurano que en el grupo halotano (**Gráfica 2**). Al parecer, en la rapidez de la recuperación, puede influir la solubilidad de ese anestésico, de forma que cuanto más baja es esta solubilidad, más rápida es la recuperación (Whitehair *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1994; Gauthier *et al.*, 2002; Bienert *et al.*, 2003). Otros autores también han observado que el tiempo de recuperación de la anestesia fue más corto después de la utilización de isoflurano comparado con halotano (Matthews *et al.*, 1992; Daunt *et al.*, 1992; Donaldson *et al.*, 2000), en perros (Hellebrekers, 1986; Polis *et al.*, 2001) y en

humanos (Raj *et al.*, 1976; Mayne *et al.*, 1987). Según Brunson, en 1990, el tiempo de recuperación de la profundidad anestésica quirúrgica en caballos, fue más rápido con el isoflurano que con el halotano, sin embargo, el tiempo total de recuperación fue similar con ambos anestésicos. La eliminación rápida del anestésico puede ser un inconveniente en grandes animales operados, como en caballos, donde esa prematura recuperación puede dar lugar a incoordinación de movimientos y a que el animal se lesione durante la recuperación (Bienert *et al.*, 2003). Algunos autores han señalado que los tiempos de recuperación inmediata fueron similares con ambos anestésicos en humanos (Kingston, 1986; Kocan, 1987). También, se ha observado que la frecuencia de eliminación del anestésico desde el tejido cerebral y desde la sangre fue similar entre halotano e isoflurano en perros (Zbinden *et al.*, 1988). Sin embargo, otros autores han señalado en la especie humana, una recuperación inmediata más rápida con el halotano, en contra de lo previsto, según las características físicas de ambos anestésicos (McAteer *et al.*, 1986; Milligan *et al.*, 1988).

Respecto a la calidad de la recuperación, no hemos observado diferencias importantes entre los dos grupos de animales anestesiados. Otros autores tampoco han señalado diferencias en la calidad de esta recuperación entre ambos anestésicos en caballos (Matthews *et al.*, 1992) y en humanos (Raj *et al.*, 1976).

Sin embargo, algunos autores han observado más complicaciones tras la anestesia con isoflurano que con halotano, señalando episodios de problemas respiratorios como laringoespasmos, salivación o molestias durante la recuperación de la anestesia con isoflurano en humanos (Pandit *et al.*, 1985; McAteer *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1985; Pounder *et al.*, 1991). Probablemente, las diferencias entre especies o el distinto protocolo de anestesia empleado sea la causa de las diferencias con nuestros resultados.

ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA RESPIRATORIA Y CARDIACA

En conejos, la medida de la frecuencia cardiaca y de la frecuencia respiratoria es muy útil, por lo que debería ser monitorizadas regularmente durante el periodo anestésico y el de recuperación. Aunque a menudo se usan para monitorizar la profundidad anestésica, su uso como tal, puede ser inconsistente. Sin embargo, la monitorización de estos parámetros proporciona una idea del estado fisiológico del animal (Whelan y Flecknell, 1992).

FRECUENCIA RESPIRATORIA

La frecuencia respiratoria disminuyó significativamente tanto en el grupo halotano como en el grupo isoflurano. El mecanismo de acción por el cual la anestesia provoca la depresión respiratoria podría ser por una disminución de la respuesta de los quimiorreceptores periféricos y del centro respiratorio central al dióxido de carbono (Borkowski *et al.*, 1990). A este descenso de la frecuencia respiratoria, podría también haber contribuido la activación de un mecanismo de compensación ante la hiperventilación producida durante la pre-oxigenación llevada a cabo previamente a la administración del anestésico. Además, la aparición de taquipnea es frecuentemente observada en conejos a los que se les saca de sus jaulas de alojamiento y se les lleva a un ambiente más extraño para el animal (Flecknell *et al.*, 1996).

Según Shimazu y col., en 1998, tanto los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) como los receptores AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato) podrían estar implicados en los efectos respiratorios del halotano. Por tanto, a través de éstos receptores y, posiblemente también otros, como el GABA, podría tener lugar esa depresión de la frecuencia respiratoria observada con ambos anestésicos.

Así, tanto Otsuka (1998) en ratas, como Hedner y col. (1980) en conejos, han observado que la modificación de la neurotransmisión mediada por el

receptor GABA(A) es en parte responsable de la depresión respiratoria por los anestésicos volátiles, como halotano, isoflurano y enflurano.

El efecto depresor del halotano sobre la frecuencia respiratoria también ha sido indicado por otros autores en conejos (Imai *et al.*, 1999a), aunque estos autores no encontraron diferencias significativas en la frecuencia respiratoria, al ir aumentando la dosis desde 0,8% a 2%. Además, este descenso de la frecuencia respiratoria también ha sido observado en otras especies como en ratas (Otsuka, 1998; Steffey *et al.*, 2003) y en gatos (Ingwersen *et al.*, 1988; Grandy *et al.*, 1989), en los que la frecuencia respiratoria disminuía a medida que la dosis de halotano iba aumentando. Otros autores, sin embargo, indicaron un incremento de la frecuencia respiratoria tras la administración de halotano en gatos (Hikasa *et al.*, 1997), probablemente debido a un plano de la anestesia más superficial, a un protocolo de administración del anestésico distinto o a las posibles diferencias entre especies.

Al igual que sucede con la administración de halotano, también observamos un descenso significativo ($p < 0,001$) de la frecuencia respiratoria tras la administración de isoflurano (**Gráficas 5 y 6**). Tanto Steffey y Howland (1977), en perros y gatos, como Antognini y Eisele (1993), en cabras, señalaron que el isoflurano es un potente depresor respiratorio, demostrándolo mediante la relación del isoflurano con un incremento, dosis dependiente, de la presión arterial de CO₂ (Paco₂)

Nuestros resultados están de acuerdo con los de otros autores que también han observado un descenso en la frecuencia respiratoria tras la administración del isoflurano en conejos (Imai *et al.*, 1999a). De igual manera, este efecto depresor también ha sido indicado en otras especies, como en ratas (Imai *et al.*, 1999b), en gatos (Hikasa *et al.*, 1997), en perros (Jones y Snowdon, 1986; Hellebrekers, 1986) y en humanos (Hausdorfer *et al.*, 1986). Según estos autores, la frecuencia respiratoria, al igual que ocurría con el halotano, disminuye a medida que aumenta la dosis del anestésico.

Sin embargo, algunos autores como Mutoh y col., en 2001, observaron un incremento de la frecuencia respiratoria respecto a los niveles basales tras la inducción con isoflurano junto con óxido nitroso, en perros. Este incremento podría ser debido a un plano anestésico más superficial, a un protocolo de inducción diferente, a las posibles diferencias entre especies o a la interacción del isoflurano con el óxido nitroso.

Al parecer, el isoflurano presenta un patrón de flujo respiratorio similar al halotano (Jonsson y Wahlgreen, 1989). Sin embargo, ha sido demostrado que la magnitud de la depresión respiratoria es mayor para el isoflurano que para el halotano en conejos (Imai *et al.*, 1999a), de forma que la frecuencia respiratoria disminuía significativamente, a medida que aumentaba la dosis anestésica de 0,8% hasta 2%. Este descenso de la frecuencia respiratoria, mayor con isoflurano que con halotano, también fue observado en otras especies como en ratas (Dardai y Heavner, 1987), en gatos (Doi *et al.*, 1989), en perros (Hellebrekers, 1986), en caballos (Daunt *et al.*, 1992; Whitehair *et al.*, 1993; Grosenbaugh y Muir, 1998) y en humanos (Tigue y Pethybridge, en 1987).

Según Grosenbaugh y Muir, en 1998, esta depresión respiratoria podría estar relacionada con un mayor incremento en la $Paco_2$ y un descenso mayor en el pH sanguíneo con isoflurano al compararlo con halotano. De igual manera, Izumi y col., en 1991, observaron que, a dosis equipotentes de concentración anestésica, el isoflurano deprime la quimiosensibilidad al CO_2 más que el halotano y, tal efecto, estaría relacionado con una mayor depresión de los mecanismos respiratorios, por parte del isoflurano. No obstante, los cambios respiratorios y cardiovasculares observados con halotano e isoflurano fueron menores que con otro anestésico inhalatorio, el enflurano, en ratas (Dardai y Heavner, 1987), por lo que estos autores consideraron al halotano y al isoflurano, preferibles al enflurano para anestesia de pequeños animales. En nuestro experimento, no encontramos diferencias significativas ($p > 0,05$) en la frecuencia respiratoria entre ambos anestésicos. Probablemente, un protocolo distinto de inducción de la anestesia, variaciones entre especies, etc., pueden

haber influido en que no encontrásemos diferencias significativas en nuestros resultados entre ambos anestésicos, al comparar con otros autores.

Durante la recuperación de la anestesia, la frecuencia respiratoria fue gradualmente alcanzando los valores iniciales, una vez que se detuvo la administración del anestésico. En el grupo isoflurano, la recuperación de la frecuencia respiratoria fue algo más rápida que en el grupo halotano. Nuestros datos están de acuerdo con los de otros autores, los cuales observaron que durante los primeros 15 minutos de la recuperación de la anestesia, la frecuencia respiratoria se incrementaba significativamente en caballos anestesiados con isoflurano respecto a los anestesiados con halotano (Whitehair *et al.*, 1993).

FRECUENCIA CARDIACA

Los anestésicos volátiles actúan sobre determinados lugares para alterar la función cardiovascular y la respuesta del sistema cardiovascular a los baroreflejos (McCallum *et al.*, 1993). Price y Ohnishi, en 1980, clasificaron a los anestésicos generales según su sensibilización del corazón a las acciones arritmogénicas de las catecolaminas, señalando al halotano como uno de los que más sensibilizan al corazón a esta acción.

La respuesta hemodinámica a la anestesia inhalatoria está influenciada por tres factores: 1) la especificidad de la droga, 2) la dosis, y 3) las características individuales del sujeto, aunque según Hoffman y col., en 1991 y en perros, sólo la diferente dosis puede ser considerada como un factor consistente.

La frecuencia cardiaca disminuyó significativamente en el grupo halotano, prolongándose durante el periodo de anestesia (1 –30 minutos). Esta disminución de la frecuencia cardiaca, probablemente sea como consecuencia

del efecto inotrópico negativo observado con el halotano por algunos autores (Kaukinen, 1978; Komai y Rusy, 1984). Según Housmans y col. (2000), el halotano disminuye la disponibilidad de Ca^{2+} en el mioplasma en mayor proporción que el isoflurano. Al parecer, el halotano no afecta al transporte intracelular de Ca^{2+} sino que disminuye la cantidad del mismo ión dentro del retículo sarcoplásmico, lo que es indispensable para la actividad contráctil del miocardio (Komai y Rusy, 1984). Además, el halotano presenta acciones depresivas sobre el sistema de conducción cardiaco (Ozaki *et al.*, 1985) y puede atenuar los reflejos barorreceptores en numerosos sitios de acción (Seagard *et al.*, 1982). Al parecer, un subtipo de alfa1-adrenoceptor media la depresión de la conducción en las fibras de Purkinje producida por el halotano (Turner *et al.*, 1995).

Otros autores también han observado un descenso significativo de la frecuencia cardiaca tras la administración de halotano en conejos (Flecknell y Liles, 1996; Flecknell *et al.*, 1999). Este efecto depresor, también ha sido señalado en otras especies como en la rata (Crawford *et al.*, 1992), en gatos (Ingwersen *et al.*, 1988; Hikasa *et al.*, 1997), en cerdos (Schieber *et al.*, 1986; Lerman *et al.*, 1990) y en la especie humana (McKinney *et al.*, 1993).

Sin embargo, algunos autores han observado el efecto contrario en conejos (Sartick *et al.*, 1979), en perros (Picker *et al.*, 2001) y en cabras (Antognini y Eisele, 1993) probablemente debido a distintas dosis empleadas, a que el plano anestésico era algo superficial o a las variaciones entre especies.

En nuestros estudios, la frecuencia cardiaca alcanzó ya los valores basales ($p > 0,05$) a los 30 minutos del cierre del vaporizador del halotano (60 minutos desde la intubación) (**Gráficas 8 y 10**), lo que coincide con lo visto en otras especies como en gatos (Ingwersen *et al.*, 1988) y en humanos (Roberts y Pethybridge, 1991) durante ese periodo de recuperación.

Por otro lado, en conejos, el isoflurano preserva mejor la contractibilidad cardiaca que el halotano (Marano *et al.*, 1997). Este anestésico es considerado como uno de los agentes halogenados con un mayor margen de seguridad circulatorio, que produce la menor depresión miocárdica y que puede incrementar la frecuencia cardiaca, particularmente en pacientes jóvenes (Eger, 1984). Según Picker y col. (2001), la diferencia entre los distintos anestésicos que aumentan la frecuencia cardiaca, es la diferencia en su acción vagolítica. Así, Kato y col., en 1992, indicó que el sistema nervioso autónomo es un importante sistema de control para mantener la estabilidad cardiovascular en humanos. También se ha observado que la función barorefleja arterial interviene en ese mantenimiento de la estabilidad cardiovascular (Nagasaki *et al.*, 2001). Otros autores, como Lee y col. (2002), señalaron, en ratas, que el isoflurano parecía inhibir esa función barorefleja de la frecuencia cardiaca principalmente a través del sistema nervioso simpático.

Finalmente, algunos autores han sugerido que las variaciones características de la frecuencia cardiaca tras la administración del isoflurano pueden ser debidas a la inhibición de la actividad del sistema nervioso autónomo, tanto a nivel del vago como de la los nervios simpáticos (Kato *et al.*, 1992).

En general, la mayoría de los investigadores señalan que la causa de la taquicardia vagotómica es la supresión del tono inhibitorio vagal y que, la estimulación del sistema nervioso simpático es responsable de ello (Smirnov, 1993). Para estos autores, el tono vagal depende de la especie animal, del sexo y de las variaciones individuales.

En nuestro caso, aunque apreciamos un ligero aumento de la frecuencia cardiaca en el grupo Isoflurano, no encontramos diferencias significativas de la frecuencia cardiaca durante la anestesia, al comparar con el grupo control (**Gráfica 9**). No obstante, habría que tener en cuenta que los valores iniciales ya eran relativamente altos. Si en estado de reposo, la frecuencia cardiaca

normal está en torno a 220 latidos/minuto (Flecknell, 1998), en nuestro experimento estas frecuencias eran de aproximadamente 300 latidos/minuto. Ya hemos comentado anteriormente que el acto de sacar al animal de su jaula de alojamiento y llevarlo a otra sala desconocida para él, puede provocar cierto nerviosismo y aumentar algo tanto la frecuencia cardiaca como la respiratoria.

Sin embargo, el ligero aumento de la frecuencia cardiaca tras la administración de isoflurano al comparar con el grupo control, no se vio acompañado de un incremento en la activación del sistema nervioso simpático, ya que no encontramos ningún aumento significativo de los niveles de catecolaminas respecto a los niveles basales, incluso hubo un cierto bloqueo del SNA. Esto estaría de acuerdo con los estudios de Marano y col., en 1996 y, que señalaron que el isoflurano producía taquicardia mientras se reducía la actividad nerviosa simpática y la función barorefleja. La taquicardia inducida por isoflurano sería principalmente debida a una “inhibición o supresión” del tono vagal más que una respuesta barorefleja, aunque no debería ser excluido un papel marginal de la función barorefleja en la respuesta cardiaca a altas concentraciones de isoflurano.

Nuestros resultados están de acuerdo con los de otros autores que no encontraron ningún cambio o bien un ligero aumento de la frecuencia cardiaca en conejos, tras la administración de isoflurano en un circuito anestésico cerrado (Henke *et al.*, 1996). En este sentido, tampoco se han descrito variaciones significativas en la especie porcina (Haga *et al.*, 2000).

Al igual que nosotros, otros autores sí encontraron un incremento significativo de la frecuencia cardiaca tras la administración de isoflurano, también en conejos (Blake *et al.*, 1991; Okamoto *et al.*, 1996; Marano *et al.*, 1996) y en otras especies como en perros y gatos (Steffey y Howland, 1977; Hellebrekers, 1986; Picker *et al.*, 2001, Mutoh *et al.*, 1995; Mutoh *et al.*, 2001) o en la especie humana (Yli-Hankala *et al.*, 1993; Ebert *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). Sin embargo, algunos autores han señalado el

efecto contrario del isoflurano, indicando que se produce un descenso en la frecuencia cardiaca en perros (Piriou *et al.*, 1998), en cerdos (Schieber *et al.*, 1986) y en la especie humana (Friesen y Lichtor, 1983).

Al comparar los dos anestésicos, observamos diferencias en la frecuencia cardiaca estadísticamente significativas, encontrando frecuencias mucho más altas en animales del grupo isoflurano que en los del grupo halotano (**Gráfica 10**). Algunos autores como Palmisano y col., en 1994, señalaron al halotano como un depresor de la función cardiaca más potente que el isoflurano en conejos. También, otros investigadores han observado una diferencia significativa entre halotano e isoflurano en perros (Boarini *et al.*, 1984; Hellebrekers, 1986; Polis *et al.*, 2001; Picker *et al.*, 2001) y en humanos (Tigue y Pethybridge, 1987; van de Berg y Honjol, 1993). Según Kulier *et al.* (2000), es posible que esta diferencia sea debido a que el halotano potencia la sensibilidad del corazón a las catecolaminas, a través de receptores alfa1-adrenoceptores, más que el isoflurano. Sin embargo, otros autores no han encontrado diferencias significativas en la frecuencia cardiaca entre ambos anestésicos en gatos (Hikasa *et al.*, 1997) o en humanos (Zubicki *et al.*, 1998).

Muchas de las diferencias que hemos encontrado frente a lo descrito por otros autores podrían ser debidas a múltiples causas. Así, son importantes factores como: la dosis administrada de halotano o de isoflurano sobre la frecuencia cardiaca (Imai *et al.*, 1999a); también, la edad del paciente puede ser un factor a tener en cuenta (Hoffman *et al.*, 1982; McKinney *et al.*, 1993; Friesen *et al.*, 2000); que el experimento sea realizado en el propio organismo o que sea realizado aislando el corazón, lo que puede determinar que el anestésico inhalatorio estimule o inhiba la frecuencia cardiaca (Picker *et al.*, 2001); también, como hemos visto anteriormente, el tono vagal puede depender de la especie animal escogida para el experimento, del sexo y de las variaciones individuales (Smirnov, 1993).

ANÁLISIS DE LA TEMPERATURA RECTAL

Un correcto mantenimiento de la temperatura corporal durante el proceso anestésico es fundamental, ya que puede minimizar las alteraciones cardiovasculares y respiratorias (Dardai y Heavner, 1987). Generalmente, durante la anestesia tiene lugar una depresión de la capacidad termoreguladora del animal como ha sido señalado por algunos autores (Hanagata *et al.*, 1995; Maurer *et al.*, 2000). Según Jenkins y col. (1999), la importancia de la temperatura en la potencia de distintos anestésicos es debida a que, puede verse aumentada la actividad de receptores GABA (A) por anestésicos volátiles, como halotano e isoflurano. Además, la hipotermia disminuye los requerimientos anestésicos, disminuyendo la concentración alveolar mínima (CAM) necesaria para producir un plano anestésico adecuado (Antognini, 1993).

En nuestros estudios, observamos un ligero descenso de la temperatura rectal con ambos anestésicos aunque, en ningún momento, fue considerado como estadísticamente significativo (**Gráfica 14**). Probablemente, si se hubiese acompañado de cirugía o si la duración de la anestesia hubiese sido más duradera, este descenso de la temperatura hubiese algo sido más marcado. Por otro lado, se ha señalado que una hipotermia suave no afecta significativamente a las concentraciones plasmáticas de hormonas relacionadas con el estrés (Chi *et al.*, 2001).

La hipotermia leve durante la intervención no presenta problemas pero estos pueden surgir durante el postoperatorio, apareciendo vasoconstricción y temblores. Prácticamente, la temperatura había recuperado los valores basales a la hora y media del cese de la administración de la anestesia. En nuestro caso, no se observaron temblores durante la recuperación de ambos anestésicos. Según Hanagata y col., en 1995, la aparición de temblores es rara cuando se emplean las concentraciones anestésicas típicas, pudiendo aparecer más frecuentemente a bajas concentraciones en conejos, como 0,2-

0,3% de isoflurano. Otros autores, como Matsukawa y col., en 1992, observaron, también en conejos, que el halotano no afectaba a la temperatura periférica y que la incidencia de temblores disminuía significativamente a medida que aumentaba la dosis de halotano.

Otros autores, han encontrado una disminución en la capacidad termo-reguladora con ambos anestésicos, en ratas y en humanos (Ramachandra *et al.*, 1989; Dicker *et al.*, 1995; Maurer *et al.*, en 2000). La dosis administrada, la duración de la anestesia y la presencia o no de cirugía, así como el grado de severidad de ésta, pueden ser factores muy importantes a tener en cuenta, en la influencia de los distintos anestésicos sobre su capacidad termo-reguladora.

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENOCORTICAL

Con la anestesia evitamos el dolor durante la cirugía. Sin embargo, la eliminación del dolor puede reducir, pero no evitar, la respuesta endocrina al estrés. El sistema hipotálamo-hipófisis-adrenocortical es activado durante la pérdida de control, sumisión y depresión (Adams y Hempelmann, 1991).

Esta respuesta endocrina a la anestesia y la cirugía juega un papel importante en el curso peri- y postoperatorio del paciente. Aunque, en principio, la anestesia tiene menor efecto sobre la respuesta endocrina que la operación, una mejor comprensión de esta respuesta en pacientes bajo anestesia contribuye a un manejo anestésico más efectivo (Oyama y Wakayama, 1988).

La respuesta endocrina puede estar influenciada por muchos mecanismos de control diferentes. No siempre es posible distinguir entre los efectos farmacológicos o los efectos directos o indirectos de la anestesia o la cirugía. Por esta razón, la respuesta al estrés es muy compleja y no debe

evaluarse sólo con los niveles de una hormona sino combinar una serie de parámetros que nos aproximen más al conocimiento de esa respuesta (Seitz, 1991).

En nuestro caso, en el grupo control se observaron unos niveles de cortisol y corticosterona altos, aunque predecibles teniendo en cuenta que intervinieron una serie de factores que contribuían a esa respuesta de estrés. Así, pudo influir la sujeción del animal para evitar su huída, la colocación de la máscara de inhalación y la administración del oxígeno, todos ellos posibles factores estresantes. Esto quedó reflejado en unos niveles de glucocorticoides relativamente altos, en los animales del grupo control.

Sin embargo, pensamos que los dos grupos problemas (halotano e isoflurano) también sufrieron ese posible estrés debido a la sujeción del animal para evitar su huída, la colocación de la máscara y la administración, en este caso, del anestésico. Por tanto, los únicos factores que consideramos diferentes entre los grupos control y problemas fue el tratamiento administrado (100% oxígeno en lugar del anestésico) y la intubación llevada a cabo en los grupo Halotano e Isoflurano.

No obstante, también hemos querido comparar los valores obtenidos tras la anestesia con los valores basales o iniciales de esos animales (tiempo 0).

Asimismo, todos los experimentos fueron realizados a la misma hora, para evitar la influencia de los ritmos circadianos conocidos de los glucocorticoides, con niveles más altos durante la noche y la mañana que durante la tarde (Gerard *et al.*, 1996).

Por otro lado, ha sido observado que la hipotermia puede influir en la respuesta endocrina del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Karuri *et al.*, 1998a). Sin embargo, como hemos señalado anteriormente, en nuestro caso no hubo

diferencias significativas de la temperatura rectal durante todo el proceso, ni tampoco aparición de temblores durante la recuperación, por lo que no consideramos la temperatura del animal como un factor de influencia en nuestro experimento.

El tipo de anestésico empleado también modifica la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical, ya que hemos observado un efecto diferente sobre este eje, traducido en las distintas concentraciones séricas de ACTH, corticosterona y cortisol.

En primer lugar, observamos un incremento significativo de los parámetros indicadores de una activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical tras la administración del halotano. El halotano parece ser un estímulo importante para la activación de este eje ya que, según fue señalado por algunos autores, la secreción adrenocortical fue proporcional a la cantidad de halotano inhalado (Luna y Taylor, 1995). Parece probable que el halotano pueda regular el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por estimulación de la síntesis y liberación de CRH hipotalámica, resultando en un incremento en la síntesis y liberación de ACTH y β -endorfinas hipofisarias (Karuri *et al.*, 1998a, b). Otros autores también han observado una activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal tras la administración de halotano en caballos (Luna y Taylor, 2001).

No hemos encontrado estudios previos realizados en conejos, pero en nuestro caso, esa activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), respecto al grupo control, podría ser debida a la intubación a lo que se sumaría el efecto del halotano, aunque, el hecho de que estos niveles se mantengan altos durante toda la anestesia, nos puede indicar un efecto estimulante del halotano por sí sólo.

También, es conocida la actividad de varios neuropeptidos sobre la regulación de la actividad de la CRH. Así, se piensa que la sustancia P se piensa que inhibe la expresión de la CRH o que los opioides, incluyendo la met-

encefalina y β -endorfinas, interactúan con la CRH. Las β -endorfinas incrementan la actividad neuronal y la biosíntesis de CRH en el hipotálamo (Karuri *et al.*, 1998a). Distintos subtipos de receptores opioides pueden jugar un papel en la mediación, bien estimulando o bien inhibiendo, del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por el halotano (Karuri *et al.*, 1998a). También, podrían haber intervenido los efectos excitatorios de las catecolaminas sobre la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que parecen estar mediados por los alfa-adrenoceptores del núcleo paraventricular hipotalámico (Herman y Cullinan, 1997).

Probablemente, la acción del halotano no se vea limitada sobre los receptores opiáceos sino que también estén implicados otros receptores. Como hemos visto en la introducción, el halotano puede estar relacionado también con otros receptores, como por ejemplo, los GABA.

Por otro lado, también se ha considerado la hipotensión provocada por la administración del halotano, como uno de los principales estímulos para la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical (Taylor, 1998b). La hipotensión reduce la perfusión tisular dando lugar a una disminución en el aporte de oxígeno al tejido o hipoxia y, a la formación de productos del metabolismo anaerobio que resultan en acidosis, lo que podría ser un estímulo para desencadenar la respuesta estresante (Taylor, 1990).

Según Taylor (1998a), la hipotensión sería la causa principal de la activación adrenocortical, aunque piensa que no debería ser excluído un efecto directo del halotano. Estos autores no lo consideran como el único estímulo, ya que además, ha sido observado que el mantenimiento de la tensión en valores normales durante toda la anestesia con halotano no disminuía la respuesta adrenocortical a la anestesia (Taylor, 1998c). Sin embargo, Brodbelt y col., en 1998, señalaron que el mantenimiento constante de la tensión con metoxamina durante la anestesia con halotano, no prevenía, aunque podría haber atenuado, en parte, la respuesta adrenocortical a la anestesia en caballos, con lo que la

hipotensión *per se* influiría en la respuesta aunque no sería el principal factor estresante. Afirmaron que una reducción en el gasto cardiaco y el consiguiente compromiso en la perfusión tisular, podría ser un estímulo más importante, considerando la hipotensión como una consecuencia de la disminución del gasto cardiaco.

En otro estudio en 1999, Luna y col., observaron que al administrar una infusión de glucosa en ponies anestesiados con halotano, se atenuaba la respuesta adrenal caracterizada por esos incrementos de ACTH, cortisol y catecolaminas.

Por otro lado, ese aumento en la respuesta adrenocortical por el halotano, también ha sido atribuido a la excitación que se produce durante la fase II de la anestesia (Taylor, 1987). Otros autores, como Green y Moor, en 1977, consideran que ese aumento podría deberse a un incremento de la producción de estos parámetros o bien a un descenso de la frecuencia de eliminación de ese anestésico.

Otro factor que puede influir en la activación, o no, del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical por el halotano es la duración de la anestesia. Al parecer, una exposición corta al halotano no provoca una elevación significativa en los niveles de corticosterona (Carlberg *et al.*, 1995). Sin embargo, al aumentar la duración de la anestesia con halotano, estos niveles de corticosterona se incrementaron significativamente en ratas (Karuri *et al.*, 1998a).

En definitiva, parece probable que la respuesta al estrés por el halotano en conejos sea multifactorial, algo que también ha sido considerado en caballos (Brodbelt *et al.*, 1998).

La ACTH es generalmente aceptada como el único estímulo fisiológico para la secreción de los glucocorticoides (Taylor, 1989).

Respecto al incremento en las concentraciones séricas de ACTH observado tras la administración de halotano (**Gráfica 16**), hay que señalar que aumenta progresivamente durante la fase de anestesia. Muchos autores coinciden con nuestros resultados en otras especies, como en ovejas (Taylor, 1999a), en caballos (Taylor, 1989) y en humanos (Oyama *et al.*, 1979; El-Shafei *et al.*, 1980; Abdulla *et al.*, 1983; Sigurdsson *et al.*, 1984; Seitz *et al.*, 1985a; Seitz *et al.*, 1986; Lacoumenta *et al.*, 1987).

Algunos autores consideran que, además del efecto de la anestesia, habría que tener en cuenta un rápido aumento de la liberación de ACTH en respuesta a la estimulación quirúrgica (Oyama y Wakayama, 1988). También, han sido evaluados los niveles plasmáticos de ACTH en pacientes bajo cirugía abdominal con halotano y se encontró que los niveles de ACTH se incrementaban significativamente durante la intubación endotraqueal, la incisión en la piel y tracción de vísceras, así como, durante el despertar en el período de recuperación (Oyama y Wakayama, 1988).

Según Karuri y col. (1998a), no hubo diferencias en los niveles de ACTH a nivel de la hipófisis, aunque sí en suero, tras la administración de halotano en ratas, atribuyéndolo a que el halotano induce una frecuencia de liberación más alta de ACTH que su síntesis. Sin embargo, los niveles de ACTH en suero sí que se vieron incrementados con la anestesia, lo que coincide con nuestros resultados.

Otros autores, no han observado variaciones en los niveles de ACTH tras la administración de halotano en caballos (Luna y Taylor, 1995; Luna *et al.*, 1997a; Brodbelt *et al.*, 1998) y en humanos (Rosendahl *et al.*, 1995). En algunos experimentos realizados en ovejas, ha sido indicado el efecto contrario, es decir, un descenso de las concentraciones de ACTH tras la administración de halotano (Taylor, 1998b), probablemente debidos a la distinta

dosis empleada, a las posibles diferencias entre especies, distinto protocolo de anestesia, etc.

En nuestro caso, a los 60 minutos las diferencias ya no eran significativas. Otros autores también encontraron una recuperación de estos valores normales de ACTH a las 24 horas, en la especie humana (Rosendahl *et al.*, 1995).

Tanto el cortisol como la corticosterona son usados como índice de estrés fisiológico en humanos y animales (Fox *et al.*, 1994). Algunos autores como Gerard y col. (1996) han descrito una influencia sobre los niveles de cortisol dependiendo del tipo de anestesia administrada. La concentración de cortisol se incrementa durante y después de la administración de la mayoría de los agentes anestésicos, así como durante la cirugía (Matthews *et al.*, 1992).

En nuestro experimento, observamos un aumento significativo de las concentraciones séricas de corticosterona (**Gráfica 20**) y de cortisol (**Gráfica 24**) tras la administración de halotano cuando comparamos con el grupo control. Este incremento se mantuvo durante toda la fase de la anestesia e incluso, hasta los 90 minutos después del cese de la misma. Si comparamos con los niveles basales, esta diferencia es todavía mucho más evidente. El incremento en los niveles de glucocorticoides ocurrió en paralelo con el de la concentración de ACTH, lo que coincide con los resultados obtenidos por Taylor, en 1989.

Otros autores, también han observado un incremento en los niveles sanguíneos de cortisol tras la administración de halotano en perros (Fox *et al.*, 1994), ovejas (Green y Moor, 1977; Taylor 1998b), en caballos (Taylor, 1989; Luna y Taylor, 1995; Luna *et al.*, 1996, Luna *et al.*, 1997a, b; Taylor, 1998c, d, e; Stegmann y Jones, 1998; Taylor, 1999a, b; Luna y Taylor, 2001) y en humanos (Johnstone *et al.*, 1976; Hall *et al.*, 1978; Abdulla *et al.*, 1983;

Sigurdsson *et al.*, 1984; Seitz *et al.*, 1985a; Sofianos *et al.*, 1985; Scarlino *et al.*, 1986; Kidd *et al.*, 1987; Lacoumenta *et al.*, 1987; Rosendahl *et al.*, 1995).

Además, es conocido que la cirugía *per se*, es un factor estresante importante, incluso muchas veces mayor que la anestesia. La respuesta al estrés de la cirugía es mediada por impulsos nerviosos, incluyendo los que surgen desde el lugar de la lesión o sitio quirúrgico y que actúan a través del hipotálamo (Fox *et al.*, 1994). En numerosos trabajos se indica un incremento de los niveles de cortisol tras la anestesia con halotano acompañada de cirugía. Por tanto, el incremento observado en estos trabajos de los niveles de glucocorticoides, puede ser debido tanto a la anestesia como a la cirugía. Aunque algunos autores han observado que la cirugía no es un factor crítico en la inducción de esta respuesta y que tiene poco efecto adicional en la respuesta al estrés por el halotano en caballos y en humanos (Kehlet, 1984; Taylor, 1998c), pensamos que dependiendo el grado de severidad del trauma quirúrgico, la magnitud y duración de este incremento será variable como han señalado algunos autores (Traynor y Hall, 1981; Robertson *et al.*, 1990), pudiendo ser mucho mayor que el efecto del propio anestésico. No obstante, numerosos autores han observado un incremento en los niveles de cortisol tras una cirugía acompañada de anestesia con halotano en perros (Ko *et al.*, 2000), en ovejas (Hughan *et al.*, 2001) y en humanos (Oyama *et al.*, 1980; Hagen *et al.*, 1980; Kono *et al.*, 1981; Campbell *et al.*, 1984; Sear *et al.*, 1988; Stelzner *et al.*, 1988; Nakamura y Takasaki, 1991).

Otros autores, sin embargo, no coinciden con nuestros resultados y han señalado que el halotano no modifica los niveles de corticosterona en ratas (Carlberg *et al.*, 1995) o de cortisol en humanos (Malatinsky *et al.*, 1986). Incluso, hay autores que han observado un descenso en las concentraciones de glucocorticoides tras la anestesia con halotano, aunque estos niveles se vieron incrementados más tarde con la cirugía (Carli *et al.*, 1993). Estas diferencias pueden ser debidas a un mantenimiento más intenso de la correcta funcionalidad corporal durante la anestesia en el hombre. Por ejemplo, la

normotensión, normocapnia y balance ácido-base normal son más rigurosamente (y más fácilmente) mantenidos durante la anestesia en el hombre (Taylor, 1989). Además, como en el caso de la ACTH, también pudo influir la dosis de la anestesia, duración de la misma, las diferencias entre especies, etc.

Las concentraciones de glucocorticoides fueron disminuyendo durante la recuperación de la anestesia. Así, a las 24, 48 y 72 horas, los niveles ya no eran diferentes ($p > 0,05$) a los valores basales. Algunos autores, también coinciden con nosotros al señalar esta recuperación de los niveles de glucocorticoides tras el cese de la administración de halotano en ovejas (Hughan *et al.*, 2001), en caballos (Stegmann y Jones, 1998) y en humanos (Rosendahl *et al.*, 1995).

Aunque también a las 24 horas habían observado una recuperación de los niveles basales, Fox y col., en 1994, encontraron un aumento en los niveles de cortisol aproximadamente a las 6 horas de ese periodo de recuperación de la anestesia con halotano en perros, que lo atribuyeron a la recuperación en un ambiente no familiar y a la toma de muestra de sangre. También ha sido observado un incremento en la fase inicial de la recuperación en humanos (Kaniaris *et al.*, 1979; Pflug y Alter, 1981), probablemente debido al efecto de la cirugía durante esa recuperación del paciente, algo que no tuvo lugar en nuestro experimento.

En cuanto al efecto del isoflurano sobre el eje hipotálamo-hipófisis-corticoadrenal, no encontramos indicios de un incremento de su actividad como con el halotano, sino más bien, un bloqueo de la actividad de dicho eje.

Según Nishikawa y Maclver (2001), existe una relación entre el mecanismo de acción del isoflurano y el receptor GABA, en concreto el subtipo GABA A. Por otro lado, el neurotransmisor GABA está implicado en el control central del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical (Herman y Cullinan, 1997).

Así, en la elaboración final de la respuesta al estrés es probable que esté implicada la modulación por el tono GABAérgico en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Posiblemente, la administración de isoflurano puede implicar la liberación del neurotransmisor GABA. Éste neurotransmisor es conocido por inhibir la liberación de ACTH y corticosterona *in vivo* y reducir la liberación de CRH desde el hipotálamo, lo que sugiere que el GABA interactúa directamente con neuronas hipofisotróficas del núcleo paraventricular hipotalámico inhibiendo la liberación de CRH (Herman y Cullinan, 1997). Esta inhibición de la liberación de CRH podría, a su vez, inhibir la liberación de ACTH a nivel hipofisario y finalmente, este descenso en la liberación de ACTH, inhibiría la liberación de glucocorticoides a nivel de la corteza adrenal, como hemos observado en nuestros resultados cuando los comparamos con el grupo control. Este efecto estimulante sobre los mecanismos inhibitorios GABAérgicos también ha sido descrito con otros anestésicos, como el pentobarbital (Sanhoury *et al.*, 1991).

Como ya describimos en la introducción, los receptores que pueden verse implicados en la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal son múltiples por lo que, es posible que, en el efecto del isoflurano sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical se vean implicados también otros neurotransmisores y receptores. Así, fármacos que afectan a receptores de las catecolaminas, GABA A, histamina, serotonina y dopamina, pueden alterar la respuesta neuroendocrina al estrés (Sanhoury *et al.*, 1991; Van de Kar y Blair, 1999).

Al igual que sucedía con el halotano, parece probable que la respuesta al estrés provocada por el isoflurano sea multifactorial. En este caso habría un bloqueo o una cierta reducción de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical tras la administración del anestésico.

Respecto a los niveles séricos de ACTH, tras la administración de isoflurano observamos un ligero incremento no significativo ($p > 0,05$) inmediato

tras la intubación (**Gráfica 17**), provocado probablemente por dicha intubación. Posteriormente, se observó un claro descenso de las concentraciones de ACTH durante la anestesia con isoflurano, estando por debajo incluso de las concentraciones del grupo control a los 30 minutos ($p < 0,05$). Durante la recuperación estas concentraciones se igualaron a las del grupo control ($p > 0,05$).

Algunos autores señalan que no encontraron cambios en las concentraciones séricas de ACTH tras la administración de isoflurano en humanos (Hase y Meguro, 2000).

Respecto a los niveles de glucocorticoides tras la administración de isoflurano, habría que indicar que siempre se mantuvieron por debajo de los niveles alcanzados tras la administración de halotano. Sin embargo, tenemos que distinguir entre los niveles de corticosterona y los de cortisol. Los primeros estuvieron por debajo de los valores controles un minuto después y a los 10 minutos de la intubación ($p < 0,01$) aunque a los 30 minutos del cese de la administración del isoflurano (60 minutos tras la intubación) estos valores ya no eran diferentes del control ($p > 0,05$) (**Gráfica 21**). Sin embargo, en el caso de las concentraciones séricas de cortisol, éstas no cambiaron respecto a las del grupo control, excepto a los 30 minutos donde fueron algo más elevadas en el grupo isoflurano ($p < 0,05$) (**Gráfica 25**).

Podemos pensar que el isoflurano atenúa en parte la activación del eje hipotálamo-hipófisis-corticoadrenal provocada por el manejo, la colocación de la máscara y la intubación, y por tanto, mantiene una estabilidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical. Para ello, nos basamos en el descenso de las concentraciones séricas de corticosterona observadas con el grupo Isoflurano cuando comparamos con el grupo Control.

Teniendo en cuenta que la corticosterona es el principal glucocorticoide en el conejo, otros autores coinciden con nosotros, al señalar un bloqueo del

eje hipotálamo-hipófisis-corticoadrenal, muchas veces, incluso cuando va acompañado de cirugía, tras la administración de isoflurano en caballos (Khanna *et al.*, 1995) o en humanos (Adams *et al.*, 1988; Ho *et al.*, 1989; Poon *et al.*, 1995; Delogu *et al.*, 1999; Hase y Meguro, 2000), o bien, acompañado de sulfentanilo y midazolam en una anestesia balanceada (Roth-Isigkeit *et al.*, 1998). Hay autores que incluso, señalan un descenso en los niveles de cortisol (Rolly *et al.*, 1984; Flezzani *et al.*, 1986; Castillo *et al.*, 1997).

En otros casos, ha sido descrito que la anestesia con isoflurano no previene el incremento en los niveles de cortisol debidos a la cirugía (Oyama *et al.*, 1975, Lanza *et al.*, 1986; Crozier *et al.*, 1992; Carli *et al.*, 1993). Otros autores, además, señalan un incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y en los niveles de cortisol tras la administración de isoflurano en humanos (Crozier *et al.*, 1994; Lattermann *et al.*, 2003). Esto no coincide con nuestros resultados, aunque es posible que sea debido a un mayor estrés por el manejo, colocación de la máscara inhalatoria, intubación, diferencias entre especies, etc. Hay que tener en cuenta que, en nuestro caso, también observamos un ligero incremento cuando comparamos con los niveles basales (tiempo 0), que lo atribuimos a la respuesta estresante debido al manejo, colocación de la máscara inhalatoria y, sobre todo, a la intubación. Sin embargo, si comparamos con el grupo control, observamos más claramente el efecto estabilizador del isoflurano sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical.

Algunos autores han medido la liberación de β -endorfinas para comprobar la distinta adaptación al estrés quirúrgico entre pacientes anestesiados con halotano o isoflurano, observando una mayor liberación en pacientes anestesiados con isoflurano, especialmente, durante el mantenimiento de la anestesia. Por tanto, concluyen afirmando que el isoflurano consigue una adaptación al estrés quirúrgico más marcada que el halotano (García-Sánchez *et al.*, 1993).

Pensamos que el isoflurano *per se*, mantiene estables los niveles de glucocorticoides y puede inhibir parcialmente la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en procesos algo estresantes como manejo, colocación de mascarilla facial, intubación, pero que basándonos en los resultados aportados por otros autores, este bloqueo podría resultar insuficiente cuando nos encontramos ante una cirugía.

Algunos autores, como Crozier y col., en 1992, no encontraron evidencia firme de un posible efecto estimulante del isoflurano sobre los niveles de cortisol, indicando además, que los niveles de cortisol tras la anestesia con isoflurano fueron significativamente más bajos cuando los compararon con los niveles alcanzados con el halotano, como también hemos observado en nuestros resultados. Otros autores no encontraron diferencias significativas en los niveles de ACTH y cortisol entre ambos anestésicos en humanos (Adams *et al.*, 1987).

Habría que señalar que fue durante el período de recuperación, de 30-90 minutos tras el cese de la administración del anestésico, cuando se observaron los niveles más altos de corticosterona y cortisol respecto a los valores basales (tiempo 0), indicándonos una activación del eje hipotálamo-hipófisis-corticoadrenal durante la recuperación de la anestesia con isoflurano. Otros autores también observaron un incremento de los niveles de cortisol durante el período de recuperación de la anestesia con isoflurano en humanos (Adams *et al.*, 1988; D'Eramo y Lunardi, 1990).

A las 24, 48 y 72 horas, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucocorticoides entre los distintos grupos.

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS SOBRE LA MÉDULA ADRENAL

Los anestésicos generales pueden tener distintos efectos sobre la función de sistema nervioso simpático (Carruba *et al.*, 1987), de forma que, la magnitud de la secreción de catecolaminas durante la cirugía va a variar en función del tipo de anestesia empleada (Poon *et al.*, 1995).

Los anestésicos generales intravenosos y volátiles inhiben la liberación de norepinefrina desde las neuronas simpáticas y en otras células neurosecretoras. Sin embargo, las acciones de los anestésicos sobre la liberación de norepinefrina desde el SNC no están bien definidas. Los anestésicos generales afectan a la transmisión sináptica, alterando la liberación de neurotransmisores ó modulando la respuesta postsináptica a los transmisores. Los anestésicos ejercen, tanto efectos específicos de droga, como acciones específicas de transmisores sobre la liberación de neurotransmisores (Pashkov y Hemmings, 2002).

Según algunos autores, tanto el halotano como el isoflurano reducen las concentraciones plasmáticas de catecolaminas en distintos procesos isquémicos, por tanto, disminuyen la actividad simpática tanto en la rata (Hoffman *et al.*, 1993), como en humanos (Reitan *et al.*, 1994). Este efecto supresor de la actividad simpática por los anestésicos, también ha sido observado tras la estimulación de la actividad simpática con carbacol (Pocock y Richards, 1988).

También conviene tener en cuenta que, en nuestros animales, fue aplicada lidocaína tópica en el momento de la intubación ya que, se ha observado que la aplicación de lidocaína provoca un ligero descenso en los niveles de epinefrina durante la intubación y extubación endotraqueal (Gaumann *et al.*, 1992).

En nuestro experimento, hemos observado un incremento inicial de las concentraciones de epinefrina (**Gráfica 28**) y norepinefrina (**Gráfica 32**) tras la administración de halotano. Es posible que este incremento fuese debido al estrés provocado por la intubación del animal, ya que las tomas de sangre realizadas posteriormente, durante la administración de este anestésico, no reflejaron ningún aumento en estos niveles. De hecho, algunos autores han asociado a la intubación durante la anestesia con halotano, incrementos de hasta un 78% en las concentraciones de norepinefrina, aunque las concentraciones de epinefrina no se alteraron significativamente (Turner *et al.*, 1986). Por tanto, pensamos que el halotano mantiene, e incluso puede inhibir, esa actividad simpática, basándonos en los niveles de epinefrina y norepinefrina hallados. Sin embargo, creemos que esa acción inhibitoria no fue lo suficientemente intensa como para evitar el incremento de catecolaminas debido a la intubación, de ahí que observásemos unos valores elevados de estas catecolaminas un minuto después de la intubación.

Existen varias hipótesis que podrían explicar este posible efecto inhibitorio de la actividad simpática por el halotano. Así, se ha descrito el efecto de algunos anestésicos inhalatorios, entre ellos el halotano, sobre canales de calcio situados en células cromafines de la médula adrenal bovina y la consecuente disminución en la liberación de catecolaminas. Esto lo explican por una doble acción: por un lado, una reducción en la apertura del canal y por otro, un incremento en la frecuencia de inactivación del canal (Charlesworth *et al.*, 1994).

Al parecer, este mecanismo puede que sea llevado a cabo a través de receptores de la acetilcolina. De hecho, se ha observado que las células de la médula adrenal son colinoceptivas y que la estimulación del receptor de acetilcolina favorece el paso de calcio hacia las células, interviniendo en el fenómeno de estimulación-secreción. El halotano actúa sobre las células de la médula adrenal bovinas, inhibiendo ese flujo de calcio. Esta inhibición no es a través de una inhibición competitiva directa de los canales ni por antagonismo

competitivo de la interacción agonista-receptor. Al parecer, inhibe la activación mediada por receptor de los canales de calcio a través de la interferencia del complejo entre el receptor y los canales de calcio (Yashima *et al.*, 1986).

Otros autores han observado que, tras la administración de enflurano, al igual que sucediese con el halotano, se produjo también un descenso en la síntesis y liberación de catecolaminas. Estos autores consideran que es, en parte, debido a los efectos directos en las células cromafines, mediante una inhibición de los efectos estimulantes y secretores de la acetilcolina liberada desde nervios espláncnicos (Gothert y Wendt, 1977).

Además, el incremento en la síntesis y liberación de catecolaminas, provocada por determinados agonistas, fue inhibida por el halotano y el mecanismo causante podría ser la sensibilidad al halotano de los canales de calcio que están asociados con los respectivos receptores nicotínicos y muscarínicos (Sumikawa *et al.*, 1982). El halotano parece inhibir las respuestas mediadas por el receptor nicotínico de la medula adrenal del perro. También, una inhibición de la exocitosis podría formar parte de los efectos del halotano (Sumikawa *et al.*, 1982). Según Gothert *et al.*, en 1976, el sitio de acción del halotano es la membrana celular de las células cromafines. Al parecer, no altera la permeabilidad de la membrana al calcio sino que, provoca un cambio conformacional de las proteínas de membrana, particularmente del receptor nicotínico (Gothert *et al.*, 1976). También otros autores han implicado a los receptores muscarínicos en el efecto depresor del halotano sobre la liberación de norepinefrina (Rorie *et al.*, 1984). Además, Clement *et al.*, en 1998, señalaron algunos de los componentes del SNC implicados en los efectos simpáticoinhibitorios de la anestesia con halotano.

Por otro lado, también se ha sugerido que la depresión de la transmisión sináptica es una de las acciones comunes a muchos anestésicos generales. Así, se observó que el halotano deprimía la transmisión ganglionar simpática. El descenso en la actividad simpática provocado por la depresión de la

transmisión ganglionar, probablemente contribuye a la hipotensión arterial, a la depresión miocárdica directa, a la inhibición de la liberación de catecolaminas desde la médula adrenal y a la depresión simpática central registrada durante la anestesia con halotano (Bosnjack *et al.*, 1982).

Finalmente, algunos autores observaron que el halotano podría actuar de forma específica sobre determinadas sinapsis colinérgicas o adrenérgicas, pudiendo afectar a la despolarización que provoca la liberación de norepinefrina (Bazil y Minneman, 1989). Incluso, Deegan *et al.*, en 1995, afirmaron que el halotano inhibía la regulación de la liberación de norepinefrina a través de los receptores beta 2-adrenérgicos.

Numerosos autores coinciden con nosotros al observar también, un mantenimiento o una inhibición de la actividad simpática, basándose en el hallazgo de una disminución en la producción de epinefrina y norepinefrina tras la administración del halotano (Gothert *et al.*, 1975; Tauberger *et al.*, 1975; Brismar *et al.*, 1982; Adams y Hempelmann, 1991; Pac-Soo *et al.*, 2000). Muchas veces, este efecto inhibitorio ha sido suficiente para disminuir la liberación de epinefrina y norepinefrina estimulada por la cirugía (Frid *et al.*, 1983; Anand *et al.*, en 1988). También, se ha observado que al combinar el halotano con thalamonal (fentanilo-droperidol), disminuye la liberación de epinefrina y norepinefrina, lo que sugiere una depresión del sistema simpático-adrenal (Freiberger *et al.*, 1975). Según Bloor *et al.*, en 1989 y también en conejos, elevadas concentraciones de halotano, son capaces de inhibir la respuesta simpática provocada por la hipotensión, algo que también sucede en humanos (Kamath *et al.*, 1993).

Algunos autores han descrito una inhibición de la liberación de epinefrina tras la administración de halotano (Halter y Pflug, 1980; Abdulla *et al.*, 1983; Carruba *et al.*, 1987). Otros autores también han hallado una inhibición de la liberación de norepinefrina tras la administración de este anestésico (Roizen *et al.*, 1975; Lunn y Rorie, 1984; Deegan *et al.*, 1991; Deegan *et al.*, 1995).

Según algunos investigadores, los niveles de epinefrina y norepinefrina no se vieron modificados tras la anestesia con halotano en caballos (Luna *et al.*, 1997a; Taylor, 1998d) y en humanos (Halter y Pflug, 1980; Abdulla *et al.*, 1983; Bachmann *et al.*, 1989; Nakamura y Takasaki, 1991). Asimismo, en cerdos susceptibles de estrés, el halotano disminuyó los niveles de catecolaminas, por lo que éstas no estaban implicadas en el inicio de la hipertermia maligna en el cerdo (Neubert *et al.*, 1996).

Sin embargo, otros autores han descrito un incremento en las concentraciones sanguíneas de epinefrina o de norepinefrina tras la administración de halotano (Joyce *et al.*, 1982; Carruba *et al.*, 1987; Luna *et al.*, 1997b) o de halotano acompañado de cirugía (Pflug y Alter, 1981; Campbell *et al.*, 1984; Sigurdsson *et al.*, 1984).

Pensamos que, dependiendo de la magnitud del proceso quirúrgico, la respuesta catecolaminérgica podría ser variable, de ahí que, en cirugías pequeñas, el halotano pueda mantener estables los niveles de catecolaminas (Roizen *et al.*, 1981) pero, en cirugías mayores, el halotano puede ser incapaz de inhibir totalmente esa estimulación de la actividad simpática (Lacoumenta *et al.*, 1986). También, la dosis administrada puede ser un factor importante en el efecto inhibitor de la actividad simpatoadrenal por el halotano (Lunn y Rorie, 1984; Bloor *et al.*, 1989), aunque hay autores que no están de acuerdo con esto y no consideran que la dosis sea un factor importante (Lacoumenta *et al.*, 1986). Además, las posibles variaciones entre especies podrían ser un factor a tener en cuenta. Igualmente, la edad del paciente podría influir, ya que las concentraciones plasmáticas de norepinefrina fueron significativamente más elevadas en ratas adultas comparadas con ratas jóvenes bajo anestesia con halotano, aunque no hubo diferencias significativas en esos niveles entre ratas anestesiadas o no. El incremento de las catecolaminas en animales adultos podría ser necesario para mantener un estado cardiovascular normal (Hoffman *et al.*, 1985). También, el que el halotano vaya acompañado o no con óxido

nitroso, puede tener influencia ya que, ha sido señalado el efecto estimulante de éste sobre la epinefrina (Abdulla *et al.*, 1983).

Respecto a los niveles de catecolaminas encontrados durante la recuperación de la anestesia, numerosos autores han señalado que, si bien durante la anestesia, acompañada o no de cirugía, los niveles de epinefrina y norepinefrina fueron inhibidos o mantenidos, durante la recuperación de la anestesia y de la cirugía, las concentraciones de catecolaminas aumentaron significativamente (Freiberger *et al.*, 1975; Balogh *et al.*, 1979). Este aumento ha sido registrado en el periodo de recuperación del halotano, sólo o con cirugía (Pflug y Halter, 1981; Adams y Hempelmann, 1991; Chave *et al.*, 1996).

En nuestro experimento, no se apreciaron incrementos significativos en los niveles de catecolaminas durante la recuperación de la anestesia (**Gráfica 28 y 32**). Probablemente, esto es debido a que nuestra primera toma de sangre durante la recuperación de la anestesia fue a los 30 minutos del cese de la misma. Estos autores señalan que este incremento tuvo lugar durante el periodo de recuperación inmediato después del cierre del vaporizador o la extubación. Por tanto, si nuestra toma de sangre hubiese sido inmediata a la extubación es posible que se hubiese observado un incremento en esas catecolaminas. Por otro lado, estos incrementos de catecolaminas observados por estos autores ocurrieron, en su mayor parte, tras una cirugía, algo que no tuvo lugar en nuestro experimento. Además, habría que añadir otros posibles factores como las diferencias entre especies, distinta duración de la anestesia, dosis administrada o la combinación con óxido nitroso.

En cuanto a la respuesta de la médula adrenal tras la administración del isoflurano, habría que señalar que observamos un mantenimiento de las concentraciones de epinefrina y norepinefrina durante la fase anestésica (Gráfica 29 Y 33). Un minuto tras la intubación, ya no se detectó el incremento de las catecolaminas encontrado en el grupo Halotano y que atribuíamos a la intubación. Pensamos que el isoflurano, al contrario de lo sucedido con el

halotano, sí inhibe la respuesta simpática provocada por la intubación y consigue mantener estables los niveles de catecolaminas. Algunos autores coinciden con esta afirmación y también señalan que el isoflurano parece atenuar la respuesta al estrés mejor que el halotano, basándose en los niveles de epinefrina y norepinefrina hallados al provocar hipotensión en los pacientes (Macnab *et al.*, 1988). Además, los niveles de norepinefrina durante la anestesia con isoflurano se mantuvieron durante toda la fase de anestesia, por debajo de los niveles del grupo control, aunque sin llegar a ser significativo este descenso.

Según algunos autores, el isoflurano (1-6%) puede inhibir, dependiendo de la dosis administrada, la secreción de catecolaminas estimulada por la inoculación de carbacol, nicotina y dimetil-4 fenilpiperazina. Concentraciones anestésicas de isoflurano, inhiben la respuesta del receptor nicotínico acetilcolina, así como la producción de guanosina 5-monofosfato (GMP) cíclico mediada por el receptor muscarínico en células de la médula adrenal (Minami *et al.*, 1994).

Por otro lado, la excitación o inhibición de los sistemas de receptores GABAA, glicina, glutamato y alfa-2 adrenérgicos constituye una importante acción de los anestésicos inhalatorios (Yamauchi *et al.*, 2003). El isoflurano, también podría actuar a través de receptores alfa2-adrenérgicos, ya que los agonistas alfa2-adrenérgicos disminuyen los incrementos de epinefrina y norepinefrina asociados a la intubación (Nishina *et al.*, 1995).

El efecto depresor del isoflurano sobre la actividad del sistema nervioso autónomo, también fue descrito por otros autores en humanos (Muzi *et al.*, 1996). Igualmente, se ha comprobado que el isoflurano, en concentraciones del 2%, inhibe los incrementos en el flujo sanguíneo de la médula adrenal, tanto de epinefrina como de norepinefrina, observados durante la hipotensión hemorrágica. Por tanto, estos autores consideran al isoflurano como una de las drogas más efectivas para la inhibición de las respuestas del sistema simpático

periférico en perros (Jordan *et al.*, 1993) y en ratas (Mackensen *et al.*, 1999). Además, en pacientes sedados con isoflurano se observó una reducción progresiva de las concentraciones de epinefrina y norepinefrina durante el periodo de sedación (Kong *et al.*, 1990).

Otros autores, sin embargo, observaron que el isoflurano no podía suprimir el incremento en las catecolaminas tras inducir un cierto grado de hipoxia mediante la mezcla de determinados gases en perros (Sugai, 1996).

El descenso o, al menos, mantenimiento de las concentraciones de catecolaminas, podría resultar paradójico teniendo en cuenta que, con el isoflurano encontramos un ligero incremento de la frecuencia cardiaca. Sin embargo, otros autores también han observado este efecto tras la administración del isoflurano. Así, Marano y col., en 1996, indicaron también en conejos, que el isoflurano producía taquicardia mientras reducía la actividad nerviosa simpática y la función barorefleja. Los análisis bioquímicos señalaban que los efectos cardiovasculares mediados por el isoflurano no fueron acompañados por cambios en los niveles plasmáticos de epinefrina y norepinefrina. Comprobaron que la taquicardia no estaba influenciada por una vagotomía bilateral y llegaron a la conclusión que la taquicardia inducida por el isoflurano era principalmente, el resultado de la supresión vagal más que una respuesta barorefleja. No obstante, señalaron que no debería ser excluido un papel marginal baroreflejo en la respuesta cardiaca a altas concentraciones de isoflurano.

También, otros autores observaron un descenso en los niveles de catecolaminas junto con un aumento en la frecuencia cardiaca señalando que, el mecanismo por el cual el isoflurano actúa sobre el sistema simpático es probablemente distinto del de la intubación endotraqueal (Yang *et al.*, 2000). Hay otros autores que tampoco han encontrado ninguna relación entre los niveles de catecolaminas y la frecuencia cardiaca (Adams *et al.*, 1988; Hertel *et al.*, 1995).

Existen resultados que indican que la combinación de isoflurano con sufentanilo y midazolam o con fentanilo, previene los incrementos de epinefrina y norepinefrina en pacientes de cirugía cardíaca durante la operación (Roth-Isigkeit *et al.*, 1998) o en pacientes con altos niveles de catecolaminas (McCoy *et al.*, 1993).

Según la bibliografía consultada, podemos afirmar que los factores que pueden influir en la respuesta del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) al isoflurano son varios. Así, dependiendo de la dosis administrada, el efecto del isoflurano sobre la activación del sistema nervioso autónomo puede ser distinto. Dosis relativamente bajas de isoflurano (1,2%) pueden activar al SNA mientras que dosis más altas (2,4%) tienen el efecto contrario y deprimen el SNA (Pac-Soo *et al.*, 2000). También, otros autores señalaron que hay un descenso, dosis-dependiente, en la actividad del sistema nervioso autónomo, tanto en el vago como en los nervios simpáticos cardíacos (Kato *et al.*, 1992; Deegan *et al.*, 1993). Otros investigadores, como Gelman y col., en 1984, observaron incrementos en los niveles de epinefrina y norepinefrina durante el periodo postoperatorio, tras administrar el isoflurano a dosis bajas. Sin embargo, con dosis más altas, no se observaban estos incrementos.

Además de la dosis, también puede resultar importante el protocolo de administración o de inducción de la anestesia con isoflurano. Así, rápidos incrementos en las concentraciones de isoflurano, inducen taquicardia e incrementos en las concentraciones plasmáticas de catecolaminas (Yli-Hankala *et al.*, 1993; Weiskopf *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1996). El incremento rápido durante la inducción de la anestesia con otros anestésicos, como el desflurano, también ha sido asociado con la activación simpática, taquicardia e hipertensión (Muzi *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando se administraban pequeños incrementos en la concentración de este anestésico, los incrementos en la frecuencia cardíaca, presión arterial y epinefrina plasmática fueron mucho menos frecuentes que cuando se realizaba una administración rápida (Moore *et al.*, 1994).

En nuestro caso, como ya señalamos anteriormente, la inducción fue lenta y progresiva, de ahí que, el nivel de catecolaminas sea distinto del que probablemente obtendríamos con una inducción rápida. Otro factor que podría influir en la capacidad del isoflurano para bloquear o no los incrementos de catecolaminas sería la severidad de la cirugía (Chang *et al.*, 1990). Incluso, las variaciones entre individuos pueden afectar a esos niveles de catecolaminas (Holst *et al.*, 1993; Hertel *et al.*, 1995).

Al comparar nuestros resultados con otros trabajos, observamos que otros autores tampoco han encontrado incrementos significativos en las concentraciones de catecolaminas tras la administración de isoflurano, algunos de ellos incluso acompañados de cirugía (Seitz *et al.*, 1985b; Tandonnet *et al.*, 1991; Zubicki *et al.*, 1998; Grouzmann *et al.*, 2000; Lattermann *et al.*, 2001).

Respecto a la epinefrina, algunos autores han descrito un descenso en las concentraciones de epinefrina en humanos (Diltoer y Camu, 1988; Castillo *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000), mientras que, no observaron cambios en la epinefrina, o bien, un bloqueo en la respuesta simpática, otros autores (Holst *et al.*, 1993; Yli-Hankala *et al.*, 1993; Daniel *et al.*, 1998; Hase y Meguro, 2000).

En cuanto a la norepinefrina, Castillo y col., en 1997, observaron un descenso significativo de sus concentraciones tras la administración de isoflurano. Otros autores señalaron que estos niveles hormonales fueron mucho mayores tras la anestesia intravenosa que durante la anestesia balanceada con isoflurano y que, excepto en el hígado, el isoflurano reducía la liberación de norepinefrina a nivel sistémico, mesentérico y renal, considerando al isoflurano como simpático-depresor en humanos (Aneman *et al.*, 1997). Por otro lado, también se observó que el isoflurano disminuía la liberación de norepinefrina a medida que iba aumentando la dosis de isoflurano de 1 a 1,5 y a 2% (Deegan *et al.*, 1993). Otros autores, no observaron variaciones en los niveles de norepinefrina (Daniel *et al.*, 1998; Leung y Pastor, 1998; Delogu *et al.*, 1999; Hase y Meguro, en 2000).

Sin embargo, existe una gran variación en la respuesta del SNA a la acción del isoflurano. Así, Balasarawathi y col., en 1982, observaron un incremento en la epinefrina plasmática asociado con un aumento de la frecuencia cardíaca, tras la anestesia con isoflurano acompañado de cirugía. Sin embargo, también observaron una disminución en los niveles de norepinefrina plasmática, que posiblemente fueron debidos a una reducción en la resistencia sistémica vascular. A diferencia de lo expuesto anteriormente, algunos autores han señalado que la inhalación de altas concentraciones de isoflurano, incrementa la frecuencia cardíaca y la concentración sérica de catecolaminas en conejos (Okamoto *et al.*, 1996). También, Bernard y col., en 1989, observaron incrementos de epinefrina y norepinefrina significativamente mayores en el grupo al que se le administró isoflurano que en el de enflurano debido a una mayor hipotensión durante la cirugía.

Tras la administración de isoflurano, otros autores han encontrado incrementos de epinefrina (Takeda *et al.*, 1998; Segawa *et al.*, 1998) o de norepinefrina (Diltoer y Camu, 1988; Segawa *et al.*, 1998). También, un incremento rápido y repentino de las concentraciones de isoflurano ha sido asociado con un momentáneo, aunque significativo, incremento en las concentraciones de norepinefrina en humanos (Yli-Hankala *et al.*, 1993). Es posible que haya influido que esa administración fue rápida mientras que, en nuestro caso, fue más progresiva y lenta. Además, la administración de óxido nítrico ha sido asociada a la activación del sistema nervioso autónomo renal y la presión arterial media (Pac-Soo *et al.*, 2000).

Igualmente, se ha señalado que un pequeño cambio observado en los niveles de norepinefrina podría estar relacionado con la intubación endotraqueal y no por el efecto del isoflurano (Amar *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2000).

La extubación y el periodo postoperatorio inmediato son periodos críticos con fuerte estimulación simpato-adrenérgica (Apitzsch *et al.*, 1999). Numerosos

autores han hallado niveles normales de catecolaminas durante la anestesia junto a la cirugía, pero que tras la extubación y durante el periodo inicial de recuperación, se veían incrementadas notablemente (Adams *et al.*, 1988; Tandonnet *et al.*, 1991; Hase y Meguro, 2000; Geisser *et al.*, en el 2003). También se ha observado que tras la ovariectomía en perras anestesiadas con isoflurano, aumentaban tanto las concentraciones de epinefrina como las de norepinefrina y que este aumento era bloqueado con la premedicación con medetomidina (Benson *et al.*, 2000). También se hallaron incrementos en los niveles de epinefrina y norepinefrina durante el periodo de recuperación tras la anestesia con isoflurano (0,65 CAM) junto a óxido nitroso pero no después de la administración de isoflurano (1-1,2 CAM) junto con óxido nitroso (Gelman *et al.*, 1984). En nuestro caso, observamos un incremento significativo de las concentraciones séricas de epinefrina, aunque no de norepinefrina, durante el periodo de recuperación.

A las 24 horas, los niveles de ambas catecolaminas habían vuelto a los valores normales, lo que coincide con lo señalado por otros autores, como Udelsman y col., en 1987.

Al comparar los dos anestésicos, podemos afirmar que, ambos bloquean la respuesta de la médula adrenal, aunque parece que este bloqueo es más eficaz con el isoflurano que con el halotano. Como ya señalamos anteriormente, otros autores también han observado que el isoflurano parece atenuar, mejor que el halotano, la liberación de epinefrina y norepinefrina provocada por la inducción de hipotensión (Macnab *et al.*, 1988). Según Pocok y Richards, en 1988, tanto halotano como isoflurano inhiben la secreción de epinefrina y norepinefrina inducida por carbacol, a concentraciones empleadas durante la anestesia general.

Otros autores no han observado diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de catecolaminas entre el halotano y el isoflurano (Adams *et al.*, 1987; Zubicki *et al.*, 1998). En nuestro caso, durante la fase de

anestesia, encontramos un aumento significativo de las concentraciones de catecolaminas, inmediatamente después de la intubación, en el grupo Halotano respecto al grupo Isoflurano. Sin embargo, a los diez minutos del inicio de la anestesia, ya no se observaron diferencias entre ambos anestésicos, lo que continuó hasta el final del periodo anestésico.

El efecto inhibitorio sobre la secreción de las catecolaminas de la médula adrenal, también se ha observado con otros anestésicos volátiles como el enflurano, atribuido en parte a un efecto directo sobre las células cromafines (Gothert y Wendt, 1977).

Finalmente, durante el periodo de recuperación, los niveles de epinefrina fueron mayores en el grupo Isoflurano que en el grupo Halotano. Otros autores, como Adams y col., (1991), encontraron incrementos de las concentraciones de epinefrina y norepinefrina más tempranos y marcados durante la recuperación de la anestesia con el isoflurano que con el halotano, lo que demuestra una eliminación más rápida del isoflurano.

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS SOBRE LA SEROTONINA

La serotonina (5-hidroxitriptamina) cumple el papel de neurotransmisor y neuromodulador. Además, presenta una gran diversidad de acciones farmacológicas relacionadas con una amplia variedad de receptores (se han identificado hasta siete familias) y mecanismos efectores. Su distribución es muy amplia por todo el organismo, en los sistemas nervioso central y periférico, músculo liso y plaquetas (Gyermek, 1996). Además, la neurotransmisión serotoninérgica se ha visto implicada en el nivel de profundidad anestésica tanto en humanos como en animales (Dringenberg, 2000).

Al analizar el efecto del halotano y del isoflurano sobre las concentraciones séricas de serotonina, observamos un efecto completamente distinto entre ambos anestésicos. Como hemos visto, son muchos los posibles

mecanismos y lugares de acción de la serotonina. En cuanto al posible modo de actuación de la serotonina a nivel central, hemos señalado anteriormente que existe una evidencia farmacológica de que los receptores de serotonina en el cerebro podían estar implicados en la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical en ratas (Fuller, 1990). Su secreción y acciones fisiológicas median el estrés y el dolor, afectando a las funciones del sistema inmunológico y nervioso a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Johnson *et al.*, 2003).

Existen neuronas que contienen serotonina y que inervan directamente a las células que contienen CRH localizadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo. A este nivel, la serotonina media la liberación de CRH, provocando la liberación de ACTH, la cual estimula la secreción de los glucocorticoides en la corteza adrenal. Los receptores 5HT1A y 5HT2A son los principales receptores que median la estimulación serotoninérgica del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Estos dos sistemas están, por tanto, interrelacionados y comunicados (Hanley y Van de Kar, 2003). A este nivel, podrían actuar ambos anestésicos, bien estimulando o bien inhibiendo la liberación de serotonina y provocando su correspondiente efecto sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

La íntima relación entre la serotonina y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal es de gran importancia en la fisiología y se ha visto su relación con el ritmo circadiano, con la activación por determinados tipos de estrés y con algunas alteraciones fisiológicas como depresión, ansiedad, etc. (Szafarczyk *et al.*, 1980; Fuller, 1992; Hanley y Van de Kar, 2003). La regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal puede ser positiva o negativa, implicando a distintas regiones del cerebro (Emerson *et al.*, 2000) y, según las concentraciones de serotonina, se puede facilitar o inhibir el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Herman y Cullinam, 1997).

Por otro lado, se ha observado que la probabilidad de la agresión es incrementada por una sobreestimulación o por el estrés, favoreciéndose la

transmisión de dopamina y de aminoácidos excitatorios frente a la transmisión de serotonina y de GABA (Swann, 2003). Además, en estudios con primates, se ha observado que la presencia de altos niveles en el líquido cerebroespinal del principal metabolito de la serotonina, el ácido 5 hidroxinolacético, estaba correlacionado con individuos de baja agresividad, y viceversa (Westergaard *et al.*, 2003). Es decir, podemos afirmar que niveles altos de serotonina ayudan a mantener estable la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, mientras que niveles bajos de serotonina pueden favorecer los estados de estrés y de agresividad.

En nuestro caso, observamos un descenso significativo de las concentraciones séricas de serotonina durante la anestesia con halotano al comparar con los datos del grupo control (**Gráfica 36**). Según Soubrie *et al.* (1981), existe un control GABAérgico sobre la liberación de la serotonina a nivel de la sustancia *nigra* en el cerebro. Al parecer, el GABA disminuye la liberación de serotonina (Tao y Auerbach, 1994). Por tanto, el halotano podría actuar a través del sistema GABA para inhibir la liberación de serotonina, de ahí el descenso observado en nuestros resultados tras la administración del halotano. Este posible mecanismo de acción del halotano sobre el sistema serotoninérgico también ha sido descrito por otros autores (Trulson y Crisp, 1984; Koshizaki *et al.*, 2003).

Muchos estudios apuntan a la relación entre el déficit o un descenso en la actividad del sistema nervioso serotoninérgico y la hiperactividad de la función del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Bush *et al.*, 2003). En nuestro caso, el descenso de las concentraciones séricas de serotonina coincide con un aumento en las concentraciones de cortisol y corticosterona durante la anestesia con halotano.

Otros autores han observado también una inhibición de la incorporación de serotonina, mediada por el halotano, en perros (Watkins *et al.*, 1983), en ratas (Hede y Post, 1982; Hede *et al.*, 1987) o en conejos (Cook y Brandom,

1982). Además, se ha descrito un efecto inhibitorio del halotano sobre la síntesis de serotonina en el cerebro (Bourgoin *et al.*, 1975).

Sin embargo, el efecto observado por nosotros al utilizar el isoflurano fue de un incremento significativo de las concentraciones de serotonina (**Gráfica 37**). Es posible que el isoflurano actúe a través de receptores alfa-1 o alfa-2 adrenérgicos, los cuales han sido implicados en la liberación de la serotonina. Por un lado, los antagonistas de los receptores alfa-1 adrenérgicos disminuyen la producción de serotonina (Heym *et al.*, 1984). Otros autores, sin embargo, han indicado que la activación de los receptores alfa-1 y alfa-2A adrenérgicos puede disminuir la liberación de serotonina a nivel del núcleo del rafe dorsal (Hopwood y Stamford, 2001). Según Bortolozzi y Artigas (2003), la liberación de serotonina (5-HT) está modulada por alfa-2 adrenoceptores en neuronas noradrenérgicas en el núcleo del rafe dorsal (Bortolozzi y Artigas, 2003). Es posible que el isoflurano pueda actuar sobre los receptores adrenérgicos, bien estimulando o bien inhibiendo, y provocando un incremento en la liberación de serotonina en sangre.

Como señalamos anteriormente, los niveles altos de serotonina en sangre pueden estar relacionados con un mejor mantenimiento del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, disminuyendo los estados de estrés o de agresividad. En nuestro experimento, observamos un incremento de las concentraciones séricas de serotonina, al mismo tiempo que señalábamos un descenso o mantenimiento de los glucocorticoides séricos por el isoflurano.

La influencia sobre los niveles de serotonina también se ha descrito con el uso de otros anestésicos. Por ejemplo, en la especie humana, estos niveles disminuyeron significativamente tras la administración del propofol, al compararlo con el isoflurano (Grouzmann *et al.*, 2000). Otros anestésicos, como la ketamina, no modificaron los niveles sanguíneos de serotonina (Brammer *et al.*, 1987).

Durante el periodo de anestesia, se observó una diferencia significativa de los niveles de serotonina en el suero, entre el halotano y el isoflurano, que podría haber tenido influencia en los niveles de glucocorticoides hallados **(Gráfica 38)**.

El mecanismo a través del cual la serotonina puede influir el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal no está claro aunque, parece ser, que puede actuar a través de dos tipos de receptores principalmente: 5-HT1 Y 5HT2. Respecto al receptor 5-HT1, ha sido observado que la administración de agonistas de este receptor, incrementaron la corticosterona plasmática en ratas (Welch *et al.*, 1993). En cuanto al receptor 5-HT2, ha sido señalado que, a nivel central y periférico, regula de forma distinta la secreción adrenocortical (Welch y Saphier, 1994). Los receptores 5-HT2 son inhibidos por anestésicos volátiles y esta acción es dependiente de la proteína kinasa C (Minami *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003).

La serotonina ha sido foco de interés durante la última década (Gyermek, 1996). Todavía hay mucho por investigar sobre los mecanismos por los cuales se incrementan o disminuyen los niveles de serotonina en sangre y las distintas funciones de la misma, así como, su implicación en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

RESUMEN

El trabajo realizado en esta Tesis, ha consistido en la observación de los efectos que ejercen dos de los anestésicos inhalatorios más comúnmente empleados, el halotano y el isoflurano, sobre la respuesta orgánica y la función adrenal.

Para ello, utilizamos 30 conejos hembra de la estirpe Blanco de Nueva Zelanda, distribuidos en tres grupos (n= 10): grupo control (recibió 100% oxígeno), grupo halotano (halotano + oxígeno) y grupo isoflurano (isoflurano + oxígeno). La inducción de la anestesia se realizó con mascarilla mientras que, para el mantenimiento de la misma, se procedió a intubar a los animales. La anestesia fue mantenida durante 30 minutos.

Las tomas de sangre fueron realizadas antes de la administración de oxígeno/anestesia, al minuto de la intubación, a los 10, 30, 60 y 120 minutos, y a las 24, 48 y 72 horas de la intubación. Además, se monitorizó la frecuencia cardiaca y respiratoria, la temperatura rectal y distintos reflejos (corneal, palpebral, pedal, auricular y de enderezamiento) para comprobar la respuesta orgánica a la anestesia y el nivel de profundidad del plano anestésico.

Con el fin de determinar la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, se evaluaron las concentraciones de las hormonas adrenocorticotropa (ACTH), corticosterona y cortisol. Para comprobar la respuesta de la médula adrenal a la anestesia, se midieron las concentraciones séricas de epinefrina y de norepinefrina. Además, también se procedió a la evaluación de las concentraciones séricas de serotonina, con el fin de evaluar su posible relación con la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

La técnica empleada para medir las concentraciones de corticosterona, cortisol, epinefrina, norepinefrina y serotonina fue la técnica EIA de competición, y la técnica RIA para evaluar las concentraciones de ACTH.

Al analizar la respuesta de la frecuencia respiratoria a la anestesia, observamos un efecto depresor significativo de ambos anestésicos, durante toda la fase de mantenimiento de la anestesia. Sin embargo, la respuesta de la frecuencia cardíaca fue distinta según el anestésico empleado, observándose un descenso significativo con el halotano, probablemente debido al efecto inotrópico del anestésico. Por el contrario, esta frecuencia no disminuyó con el isoflurano, incluso se elevó ligeramente durante el periodo anestésico.

Para ver los efectos de ambos anestésicos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, comprobamos, en primer lugar, las posibles variaciones en la secreción de ACTH hipofisaria. Así, observamos un incremento significativo de las concentraciones séricas de ACTH tras la administración de halotano, y que se mantuvo durante toda la anestesia. En el grupo isoflurano, este incremento sólo tuvo lugar al minuto de la intubación, probablemente debido a dicha intubación ya que, diez minutos después, los niveles ya no eran estadísticamente significativos.

Igualmente, fueron analizados los niveles de glucocorticoides, apreciándose un incremento significativo de las concentraciones séricas de corticosterona y de cortisol durante la anestesia con halotano, mientras que los niveles de glucocorticoides, tras la administración de isoflurano, estuvieron por debajo del grupo control durante toda la fase de mantenimiento de la anestesia.

Parece probable que el halotano pueda regular el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por estimulación de la síntesis y liberación de CRH hipotalámica, resultando en un incremento en la síntesis y liberación de ACTH hipofisaria, y el consecuente aumento en la producción de glucocorticoides. Un efecto directo del halotano sobre determinados receptores, como los opiáceos o el GABA, o bien la hipotensión provocada por el halotano, podrían ser responsables de esta activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

Cuando analizamos las concentraciones séricas de epinefrina y norepinefrina, observamos un incremento significativo al minuto de la intubación con halotano, sin embargo, a los diez minutos estos niveles eran parecidos a los del grupo control. En el grupo Isoflurano, no tuvo lugar este incremento inicial de las catecolaminas, lo que nos indica que el isoflurano contrarresta mejor que el halotano, una posible activación de la médula adrenal provocada por la intubación.

Esta inhibición de la actividad simpática, por ambos anestésicos, podría ser consecuencia de su efecto sobre los canales de calcio situados en células cromafines de la médula adrenal, a través de receptores de acetil colina.

Finalmente, al analizar las concentraciones séricas de serotonina, encontramos un aumento significativo en el grupo Isoflurano mientras que, en el grupo Halotano, observamos un descenso significativo en las concentraciones de serotonina.

Por tanto, el isoflurano parece atenuar mejor que el halotano una posible respuesta al estrés, provocada por el mismo proceso anestésico.

SUMMARY

The work achieved in this Thesis, was undertaken to determine the effects of two commonly used inhalation anaesthetics, halothane and isoflurane, on the organic response and the adrenal function.

Thirty female New Zealand white rabbits were assigned to three groups (n= 10): control group (received 100% oxygen), halothane group (halothane + oxygen) and isoflurane group (isoflurane + oxygen). The induction of the anaesthesia was achieved by a face-mask whereas the animals were intubated for the maintenance of the anaesthesia for 30 minutes.

Blood samples were obtained before intubation, at 1, 10, 30, 60, 120 min and 24, 48 and 72 h after intubation. Moreover, heart and respiratory rates, rectal temperature and some reflexes (corneal, palpebral, pedal, auricular and righting) were monitorized to check the organic response to anaesthesia and the depth of the anaesthesia.

In order to assess the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, serum adrenocorticotrophic (ACTH), corticosterone and cortisol concentrations were evaluated. To check the response of the adrenal medulla to anaesthesia, serum epinephrine and norepinephrine levels were measured. Moreover, serum serotonin concentrations were also evaluated to check its possible relationship with the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

Serum corticosterone, cortisol, epinephrine, norepinephrine and serotonin concentrations were measured by competitive enzymeimmunoassay EIA, and serum ACTH concentrations by RIA.

Respiratory rate was significantly decreased by both anaesthetics during the maintenance of the anaesthesia. However, heart rate response was different according to the anaesthetic used, and a significant decrease was observed with halothane, probably due to the inotropic effect of the

anaesthetic. On the contrary, heart rate was not decreased with isoflurane, even it was slightly elevated during the anaesthetic period.

In order to assess the effects of both anaesthetics on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, first we checked the possible changes on the pituitary ACTH release. So, we observed a significant increase of the serum ACTH concentrations after halothane administration, that supported at high levels for the anaesthetic period. This increase was only observed one minute after intubation in the isoflurane group, probably due to response at the same intubation, because the levels were not significant ten minutes later.

Likewise, glucocorticoid levels were analyzed, and we observed a significant increase of the serum corticosterone and cortisol concentrations during the halothane anaesthesia, whereas glucocorticoid levels after isoflurane administration were under the levels of the control group along the maintenance of the anaesthesia.

It is probably that halothane may regulate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by stimulation to the synthesis and release of hypothalamic CRH, inducing an increase in the synthesis and release of ACTH, and consequently, increasing glucocorticoid release. It is possible that the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis could be due to the direct effect of halothane on some receptors, as a opiates and GABA, or to the hypotension by halothane.

When the serum epinephrine and norepinephrine concentrations were analyzed, we observed a significant increase one minute after intubation with halothane, however, these levels had returned to control levels ten minutes later. We did not observe this increase in the isoflurane group, therefore, isoflurane seems to counteract intubation-induced activation of the adrenal medulla, better than halotane.

The inhibition of the sympathetic activity by both anaesthetics, may be due to the effect on the calcium channels placed in adrenal chromaffin cells, through acetyl-choline receptors.

Finally, when the serum serotonin concentrations were analyzed, we found a significant increase in the isoflurane group whereas, it was observed a significant decrease of the serotonin concentrations in the halothane group.

Therefore, isoflurane seems to attenuate the stress response better than halothane.

CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos deducir de ellos las siguientes conclusiones:

1ª CONCLUSIÓN: La inducción lenta de la anestesia con halotano o con isoflurano en el conejo, mediante incrementos de 0,5% cada 30 segundos, aumenta el tiempo de inducción, pero proporciona una mayor seguridad del paciente.

2ª CONCLUSIÓN: Tanto el halotano como el isoflurano provocan una disminución considerable de la frecuencia respiratoria durante todo el periodo de anestesia.

3ª CONCLUSIÓN: La anestesia con halotano induce una depresión de la frecuencia cardiaca importante mientras que el isoflurano no provoca ningún cambio considerable en esta frecuencia.

4ª CONCLUSIÓN: La anestesia con halotano provoca una activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, mientras que el isoflurano causa cierta inhibición de la activación de este eje.

5ª CONCLUSIÓN: La anestesia con halotano indujo unos niveles de serotonina en sangre inferiores a los observados con el isoflurano de forma que, bajos niveles de serotonina, estuvieron relacionados con una mayor activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, y viceversa.

6ª CONCLUSIÓN: Tanto el halotano como el isoflurano tienen cierta actividad bloqueante de la respuesta médulo

adrenal aunque, en el caso del halotano, no es suficiente como para bloquear la respuesta a la intubación.

7ª CONCLUSIÓN:

En la búsqueda de un mayor bienestar animal, el isoflurano se aproxima más que el halotano, basándonos en los distintos parámetros evaluados.

BIBLIOGRAFÍA

ABDULLA, Y.W., A.H. GIESECKE, H.A. HEIN y U. CORDES (1983). A comparison of the activity of the sympathoadrenal and adrenocortical system under inhalation anesthesia techniques. *Acta anaesthesiologica Belgica*, **34**: 257-264.

ADACHI, Y., M. TAODA, Y. UCHIHASHI, K. WATANABE, y T. SATOH (1999). The effect of sevoflurane and isoflurane on striatal dopamine of awake freely moving rats observed in an in vivo microdialysis study. *Masui. The Japanese journal of anesthesiology*, **48**: 960-965.

ADAMS, H.A., W. RUSS, M. LEISIN, U. BORNER, H. GIPS y G. HEMPELMANN (1987). Untersuchungen zur endokrinen Stress-Antwort bei Halothan-, Enfluran- und Isofluran-Narkosen für unfallchirurgische Eingriffe. [Endocrine stress response in halothane, enflurane and isoflurane anesthesia in surgical interventions]. *Der Anaesthesist*, **36**: 159-165.

ADAMS, H.A., W. RUSS, D. KLING, R. MOOSDORF y G. HEMPELMANN (1988). Sympathikus-Reaktion, Kreislaufverhalten und endokrine Stress-Antwort bei desobliterierenden Eingriffen an den Karotiden. Ein Vergleich von Isofluran-Narkose und modifizierter Neurolept-Anaesthesie. [Reaction of the sympathetic nervous system, cardiovascular parameters and endocrine stress response in disobliterating interventions of the carotid arteries. A comparison of isoflurane anesthesia and modified neurolepto-anesthesia]. *Der Anaesthesist*, **37**: 224-230.

ADAMS, H.A. y G. HEMPELMANN (1991). Die endokrine Stressreaktion in Anästhesie und Chirurgie--Ursprung und Bedeutung. [The endocrine stress reaction in anesthesia and surgery--origin and significance]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie*, **26**: 294-305.

ADAMS, H.A., R. TENGLER y G. HEMPELMANN (1991). Die Stressreaktion in der Ausleitungsphase von Halothan- und Isofluran-Narkosen. [The stress reaction in the recovery phase from halothane and isoflurane anesthesia]. *Der Anaesthesist*, **40**: 446-451.

ADAMS, H.A., R. BAUER, B. GEBHARDT, W. MENKE y B.B. GOTZ (1994). Total i.v. anesthesia with S-(+)-ketamine in orthopedic geriatric surgery. Endocrine stress reaction, hemodynamics and recovery. *Der Anaesthesist*, **43**: 92-100.

ADAMS, H.A. (1997). Endocrine reactions following S-(+)-ketamine. *Der Anaesthesist*, **46**: 30-37.

AGARWAL, R.K., M. COURT, V.K. CHANDNA, A. MOHAN, L.R. EUGELKING y A. M. KUMAR (1994). Influence of halothane and methoxyflurane on regional brain and spinal cord concentrations of methionine-enkephalin in the rat. *Brain research bulletin*, **35**: 273-277.

AMAR, D., H. SHAMOON, W.H. FRISHMAN, E.J. LAZAR y M.D. SALAMA (1991). Effects of labetalol on perioperative stress markers and isoflurane requirements. *British journal of anaesthesia*, **67**: 296-301.

ANAND, K.J., W.G. SIPELL, N.M. SCHOFIELD y A. AYNSLEY-GREEN (1988). Does halothane anaesthesia decrease the metabolic and endocrine stress responses of newborn infants undergoing operation? *British medical journal (Clinical research ed.)*, **296**: 668-672.

ANEMAN, A., J. PONTEN, L. FANDRIKS, G. EISENHOFER, P. FRIBERG y B. BILBER (1997). Hemodynamic, sympathetic and angiotensin II responses to PEEP ventilation before and during administration of isoflurane. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **41**: 41-48.

ANTKOWIAK, B. (1999). Different actions of general anesthetics on the firing patterns of neocortical neurons mediated by the GABA (A) receptor. *Anesthesiology*, **91**: 500-511.

ANTOGNINI, J.F. (1993). Hypothermia eliminates isoflurane requirements at 20 degrees C. *Anesthesiology*, **78**: 1152-1156.

ANTOGNINI, J.F. y P.H. EISELE (1993). Anesthetic potency and cardiopulmonary effects of enflurane, halothane, and isoflurane in goats. *Laboratory animal science*, **43**: 607-610.

APITZSCH, H., D. OLTHOFF, V. THIEME, M. WIEGEL, V. BOHNE y B. VETTER (1999). Remifentanil und Alfentanil: Sympathiko-adrenerge Effekte in der fruhen postoperativen Phase beim kardiovaskularen Risikopatienten. [Remifentanil and alfentanil: Sympathetic-adrenergic effect in the first postoperative phase in patients at cardiovascular risk]. *Der Anaesthetist*, **48**: 301-309.

AX, A. (1953). The physiological differentiation between fear and anger in humans. *Psychosomatic medicine*, **15**: 433-442.

BACHMANN, M.B., H.A. ADAMS, J. BISCOPING, A. SOKOLOVSKI y A. HEMPELMANN (1989). Die sympathoadrenerge Stressreaktion bei Ohroperationen unter verschiedenen Anästhesietechniken. [The sympatho-adrenergic stress reaction in ear surgery using various anesthesia technics]. *Laryngorhinootologie*, **68**: 493-498.

BALASARAWATHI, K., S.N. GLISSON, A.A. EL-ETR y N. MUMMANENI (1982). Haemodynamic and catecholamine response to isoflurane anaesthesia in patients undergoing coronary artery surgery. *Canadian Anaesthetists' Society journal*, **29**: 533-538.

BALOGH, D., A.F. HAMMERLE, H. HORTNAGL, T. BRUCKE y R.S. WOLFFERSGRUN (1979). Plasma-Katecholamine bei Halothan-N₂O-Anaesthesie und Neuroleptanalgesie. Intra- und postoperative Vergleichsstudie. [A comparative study on the effect of halothan-N₂O-anaesthesia and neuroleptanalgesia on plasma catecholamines during the intra- and postoperative period (author's transl)]. *Der Anaesthetist*, **28**: 517-522.

BAZIL, C.W. y K.P. MINNEMAN (1989). Effects of clinically effective concentrations of halothane on adrenergic and cholinergic synapses in rat brain in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **248**: 143-148.

BENSON, G.J., T.L. GRUBB, C. NEFF-DAVIS, W.A. OLSON, J.C. THURMON, D.L. LINDNER, W.J. TRANQUILLI y O. VANIO (2000). Perioperative stress response in the dog: effect of pre-emptive administration of medetomidine. *Veterinary surgery : VS : the official journal of the American College of Veterinary Surgeons*, **29**: 85-91.

BERNARD, J.M., M. PINAUD, I.M. MAVIER, J.P. REMI y N. PASSUTI (1989). Hypotensive anesthesia with isoflurane and enflurane during total hip replacement: a comparative study of catecholamine and renin angiotensin responses. *Anesthesia and analgesia*, **69**: 467-472.

BIENERT, A., C.P. BARTMANN, T. VON OPPEN, C. POPPE, V. SCHIEMANN y E. DEEGEN (2003). Standing behavior in horses after inhalation anesthesia with isoflurane (Isoflo) and postanesthetic sedation with romifidine (Sedivet) or xylazine (Rompun) [Aufstehverhalten bei Pferden nach Inhalationsnarkose mit Isofluran (Isoflo) und postanästhetischer Sedierung mit Romifidin (Sedivet) bzw. Xylazin (Rompun)]. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **110**: 244-248.

BITO, L.Z. y K.E. EAKINS (1969). The effect of general anesthesia on the chemical composition of blood plasma of normal rabbits. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **169**: 277-286.

BLAKE, D.W., D. WAY, L. TRIGG, D. LANGTON y B.P. MCGRATH (1991). Cardiovascular effects of volatile anesthesia in rabbits: influence of chronic heart failure and enalaprilat treatment. *Anesthesia and analgesia*, **73**: 441-448.

BLOOR, B.C., S.W. STEAD, D.M. SNIPPER y W.E. FLACKE (1989). Effect of halothane concentration on tachyphylaxis to sodium nitroprusside. *Journal of cardiovascular pharmacology*, **13**: 398-404.

BOARINI, D.J., N.F. KASELL, H.C. COESTER, M. BUTLER y M.D. SOKOLL (1984). Comparison of systemic and cerebrovascular effects of isoflurane and halothane. *Neurosurgery*, **15**: 400-409.

BOOTH, N.H. y L.E. MCDONALD (1988). *Farmacología y terapéutica veterinaria*. Ed. Acribia, S.A. 5ª ed. Vol I.

BORKOWSKI, G.L., P.L. DANNEMAN, G.B. RUSELL y C.M. LANG (1990). An evaluation of three intravenous anesthetic regimens in New Zealand rabbits. *Laboratory animal science*, **40**: 270-276.

BORTOLOZZI, A y F. ARTIGAS (2003). Control of 5-hydroxytryptamine release in the dorsal raphe nucleus by the noradrenergic system in rat brain. Role of alpha-adrenoceptors. *Neuropsychopharmacology*, **28**: 421-434.

BOSNJAK, Z.J., J.L. SEAGARD, A. WU y J.P. KAMPINE (1982). The effects of halothane on sympathetic ganglionic transmission. *Anesthesiology*, **57**: 473-479.

BOURGOIN, S., J.P. TEMAUX, A. BOIREAU, F. HERY y M. HAMON (1975). Effects of halothane and nitrous oxide anaesthesia on 5-HT turn-over in the rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's archives of pharmacology*, **288**: 109-121.

BRAMMER, G.L., M.J. RALEIGH, M.T. MCGUIRE y E.H. RUBINSTEIN (1987). Comparison of ketamine, physical restraint, halothane and pentobarbital: lack of influence on serotonergic measures in monkeys and rats. *Neuropharmacology*, **26**: 1615-1621.

BRISMAR, B., G. HEDENSTIERNA, R. LUNDH y L. TOKICS (1982). Oxygen uptake, plasma catecholamines and cardiac output during neurolept-nitrous oxide and halothane anaesthesias. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **26**: 541-549.

BRODBELT, D.C., J. HARRIS, y P.M. TAYLOR (1998). Pituitary-adrenocortical effects of methohexamine infusion on halothane anaesthetised ponies. *Research in veterinary science*, **65**: 119-123.

BRUNSON, D.B. (1990). Use of halothane and isoflurane in the horse. *Veterinary Clinics of North America. The equine practice*, **6**: 529-541.

BUSH, B.M. (1982). Recogida de sangre, plasma y suero. En: Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos. Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp.94-120.

BUSH, V.L., D.N. MIDDLEMISS, C.A. MARSDEN y K.C. FONE (2003). Implantation of a slow release corticosterone pellet induces long-term alterations in serotonergic neurochemistry in the rat brain. *Journal of neuroendocrinology*, **15**: 607-613.

CAMPBELL, B.C., R.K. PARIKH, A. NAISMITH, D. SEWNAUTH y J.L. REID (1984). Comparison of fentanyl and halothane supplementation to general anaesthesia on the stress response to upper abdominal surgery. *British journal of anaesthesia*, **56**: 257-261.

CARLBERG, K.A., A.R. GWOSDOW y B.L. ALVIN (1995). Effects of anesthesia with halothane and metoxyflurane on plasma corticosterone concentration in rats at rest and after exercise. *Laboratory animal science*, **45**: 584-587.

CARLI, F., G. RONZONI, J. WEBSTER, K. KHAN y M. ELIA (1993). The independent metabolic effects of halothane and isoflurane anaesthesia. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **37**: 672-678.

CARLSON, N. (1996). *Fundamentos de Psicología Fisiológica*. (3era. Edición). México: Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A.

CARRUBA, M.O., G. BONDILOTTI, G.B. PICOTTI, N. CATTERUCCIA y M. DA-PRADA (1987). Effects of diethyl ether, halothane, ketamine and urethane on sympathetic activity in the rat. *European journal of pharmacology*, **134**: 15-24.

CASTILLO, V., E. NAVAS, R. NARANJO y L. JIMENEZ (1997). Changes in the concentrations of catecholamines and cortisol in balanced anesthesia and total intravenous anesthesia. *Revista española de anestesiología y reanimación*, **44**: 52-55.

CHALMERS, D.T., J.F. LÓPEZ, H. AKIL y S.J. WATSON (1993). Molecular aspects of the stress axis and serotonergic function in depression. *Clinical neuroscience*, **1**: 122-128.

CHALMERS, D.T., J.F. LÓPEZ, D.M. VÁZQUEZ, H. AKIL y S.J. WATSON (1994). Regulation of hippocampal 5-HT 1A receptor gene expression by dexamethasone. *Neuropsychopharmacology*, **10**: 215-222.

CHANG, C.L., S.S. LIN, C.C. TZENG, F.C. YEH, Y.Y. LAI, S.J. HWANG, P.O. LEUNG, H.P. SU y J.T. CHENG (1990). Study of plasma neuropeptide Y (NPY) and catecholamines levels during isoflurane anesthesia. *Ma zui xue za zhi; Anaesthesiologica Sinica*, **28**: 265-271.

CHARLESWORTH, P., G. POCOCK y C.D. RICHARDS (1994). Calcium channel currents in bovine adrenal chromaffin cells and their modulation by anaesthetic agents. *The journal of physiology*, **481**: 543-553.

CHAVARRIA, J.A. (1999). La anestesia del nuevo siglo. En busca del anestésico ideal. (on line). Disponible en <http://www.grupoese.com.ni/1999/bmedica/ed31/siglo31.htm>. GRUPOESE, Managua, Nicaragua. Edición nº 31 (del 12 al 18 de agosto de 1999).

CHAVE, S., T. KUSHIKATA, H. OHKAWA, H. ISHIARA, D. GRIMAUD y A. MATSUKI (1996). Effects of two volatile anesthetics (sevoflurane and halothane) on the hypothalamic noradrenaline release in rat brain. *Brain research*, **706**: 293-296.

CHI, O.Z., Y.K. CHOI, D.I. LEE, Y.S. KIM y I. LEE (2001). Intraoperative mild hypothermia does not increase the plasma concentration of stress hormones during neurosurgery. *Canadian journal of anaesthesia*, **48**: 815-818.

CLEMENT, C.I., K.A. KEAY y R. BANDLER (1998). Medullary catecholaminergic projections to the ventrolateral periaqueductal gray region activated by halothane anaesthesia. *Neuroscience*, **86**: 1273-1284.

CLUTTON (2001). Manual de anestesia y analgesia en pequeños animales (SEYMOUR, C. Y R. GLEED, Eds.). Barcelona: Ediciones S, D.L.

COLLADO, P.S., M.J. POZO-ANDRADA, J. GONZÁLEZ, R. JIMÉNEZ y A. ESTELLER (1987). Effect of pentobarbital or urethane on bile secretion and chemical composition of blood in the rabbit. *Laboratory animals*, **21**: 11-17.

COOK, D.R. y B.W. BRANDOM (1982). Enflurane, halothane, and isoflurane inhibit removal of 5-hydroxytryptamine from the pulmonary circulation. *Anesthesia and analgesia*, **61**: 671-675.

CORLETA, O., H. HABAZETTL, U. KREIMEIER y B. VOLLMAR (1992). Modified retrograde orotracheal intubation technique for airway access in rabbits. *European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Europeenes*, **24**: 129-132.

CRATTY, M.S. y D.L. BIRKLE (1999). N-methyl-d-aspartate (NMDA)-mediated corticotropin-releasing factor (CRF) release in cultured rat amygdala neurons. *Peptides*, **20**: 93-100.

CRAWFORD, M.W., J. LERMAN, V. SALDIVIA y F.J. CARMICHAEL (1992). Hemodynamic and organ blood flow responses to halothane and sevoflurane anesthesia during spontaneous ventilation. *Anesthesia and analgesia*, **75**: 1000-1006.

CROZIER, T.A., A. MORAWIETZ, L. DROBNIK, H. RIEKE, M. SYDOW, M. RADKE y D. KETTLER (1992). The influence of isoflurane on peri-operative endocrine and metabolic stress responses. *European journal of anaesthesiology*, **9**: 55-62.

CROZIER, T.A., J.E. MULLER, D. QUITTKAT, M. SYDOW, W. WUTTKE y D. KETTLER (1994). Effect of anaesthesia on the cytokine responses to abdominal surgery. *British journal of anaesthesia*, **72**: 280-285.

CRUZ, J.L. y J.M. LASAOSA (1996). Anestesia de animales de laboratorio y de otras especies. En: Cirugía Veterinaria (GONZALO, J.M., I. AVILA, F. SAN ROMÁN, A. ORDEN, M.A. SÁNCHEZ-VALVERDE, I. BONAFONTE, J.L. PEREIRA y F. GARCÍA). Interamericana, McGraw-Hill, pp. 605-628.

DALIN, A.M., U. MAGNUSSON, J. HÄGGENDAL y L. NYBERG (1993). The effect of thiopentone-sodium anesthesia and surgery, relocation, grouping, and hydrocortisone treatment on the blood levels of cortisol, corticosteroid-binding globulin, and catecholamines in pigs. *Journal of animal science*, **71**: 1902-1909.

DANIEL, M., R.B. WEISKOPF, M. NOORANI y E.I. EGER (1998). Fentanyl augments the blockade of the sympathetic response to incision (MAC-BAR) produced by desflurane and isoflurane: desflurane and isoflurane MAC-BAR without and with fentanyl. *Anesthesiology*, **88**: 43-49.

DARDAI, E. y J.E. HEAVNER (1987). Respiratory and cardiovascular effects of halothane, isoflurane and enflurane delivered via a Jackson-Rees breathing system in temperature controlled and uncontrolled rats. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, **9**: 717-720.

DAUNT, D.A., E.P. STEFFEY, J.R. PASCOE, N. WILLITS y P.F. DAELS (1992). Actions of isoflurane and halothane in pregnant mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **201**: 1367-1374.

DAVIS, N.L., R.L. NUNNALLY y T.I. MALININ (1975). Determination of the alveolar concentration (MAC) of halothane in the white New Zealand rabbit. *British Journal of anaesthesia*, **47**: 341-345.

DAVIS, P.J., I.T. COHEN, F.X. MCGOWAN y K. LATTA (1994). Recovery characteristics of desflurane versus halothane for maintenance of anesthesia in pediatric ambulatory patients. *Anesthesiology*, **80**: 298-302.

DEEGAN, R., H.B. HE, A.J. WOOD y M. WOOD (1991). Effects of anesthesia on norepinephrine kinetics. Comparison of propofol and halothane anesthesia in dogs. *Anesthesiology*, **75**: 481-488.

DEEGAN, R., H.B. HE, A.J. WOOD y M. WOOD (1993). Effect of enflurane and isoflurane on norepinephrine kinetics: a new approach to assessment of sympathetic function during anesthesia. *Anesthesia and analgesia*, **77**: 49-54.

DEEGAN, R., H.B. HE, Y. KRIVORUK, A.J. WOOD y M. WOOD (1995). Regulation of norepinephrine release by beta 2-adrenergic receptors during halothane anesthesia. *Anesthesiology*, **82**: 1417-1425.

DELOGU, G., G. FAMULARO, S. LUZZI, P. RUBCICH, A. GIARDINA, R. MASCIANGELO, A. ANTONUCCI y L. SIGNORE (1999). General anesthesia mode does not influence endocrine or immunologic profile after open or laparoscopic cholecystectomy. *Surgical laparoscopy, endoscopy and percutaneous techniques*, **9**: 326-332.

DE PAOLO, L.V. y E.J. MASONO (1989). Endocrine hormones in laboratory animals. En: The clinical chemistry of laboratory animals (LOEB, W.F. y F.W. QUIMBY, eds.). Pergamon Press, pp. 279-308.

D'ERAMO, C. y S. LUNARDI (1990). Variazione perioperatorie della cortisolemia e prolattinemia in corso di chirurgia di superficie: anestesia totalmente endovenosa con propofol vs anestesia bilanciata. [Intraoperative changes in blood cortisol and prolactin during surface surgery: totally intravenous anesthesia with propofol vs balanced anesthesia]. *Acta biomedica de L'Ateneo parmense organo della Societa di medicina e scienze naturali di Parma*, **61**: 219-225.

DICKER, A., K.B. OHLSON, L. JOHNSON, B. CANNON, S.G. LINDAHL y J. NEDERGAARD (1995). Halothane selectively inhibits nonshivering thermogenesis. Possible implications for thermoregulation during anesthesia of infants. *Anesthesiology*, **82**: 491-501.

DILTOER, M. y F. CAMU (1988). Glucose homeostasis and insulin secretion during isoflurane anesthesia in humans. *Anesthesiology*, **68**: 880-886.

DOI, K. T. KASABA y Y. KOSAKA (1989). A comparative study of the depressive effects of halothane and isoflurane on medullary respiratory neurons in cats. *Masui. The japanese journal of anesthesiology*, **38**: 1427-1437.

DONALDSON, L.L., G.S. DUNLOP, M.S. HOLLAND y B.A. BURTON (2000). The recovery of horses from inhalant anesthesia: a comparison of halothane and isoflurane. *Veterinary surgery: VS : the official journal of the American College of Veterinary Surgeons*, **29**: 92-101.

DRINGENBERG, H.C. (2000). Serotonergic receptor antagonists alter responses to general anaesthetics in rats. *British journal of anaesthesia*, **85**: 904-906.

DROLET, G., E.C. DUMONT, I. GOSSELIN, R. KINKEAD, S. LAFOREST y J.F. TROTTIER (2001). Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, **25**: 729-741.

EBERT, T.J., C.P. HARKIN y M. PUZI (1995). Cardiovascular responses to sevoflurane: a review. *Anesthesia and analgesia*, **81** (Suppl.6): S 11-22.

EGER, E.I. (1984). The pharmacology of isoflurane. *British journal of anaesthesia*, **56** (Suppl.1): 71S-99S.

EL-SHAFEI, S., E. SHETA, M. EL-BAKRY y T. KHALIL (1980). Plasma levels of ACTH and cortisol in bilharzial and non-bilharzial individuals during halothane and nitrous oxide anaesthesia. *Middle East journal of anaesthesiology*, **5**: 407-416.

EMERSON A.J., D.P. KAPPENMAN, P.J. RONAN, K.J. RENNETH, y C.H. SUMMERS (2000). Stress induces rapid changes in serotonergic activity: restraint and exertion. *Behavioural brain research*, **111**: 83-92.

ESPLUGUES, J. (1981). Perspectivas terapéuticas con sus fundamento farmacológico. Sistema Nervioso Central. Ed. Fundación García Muñoz – Sección SABER. 2ª ed. Vol V.

FEDERATION OF EUROPEAN LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATIONS (FELASA) (1994). Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory animals*, **28**: 97-112.

FELDMAN, S., M.E. NEWMAN y J. WEIDENFELD (2000). Effects of adrenergic and serotonergic agonists in the amygdala on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Brain research bulletin*, **52**: 531-536.

FISHER, D.M., S. ROBINSON, C.M. BRETT, G. PERIN y G.A. GREGORY (1985). Comparison of enflurane, halothane, and isoflurane for diagnostic and therapeutic procedures in children with malignancies. *Anesthesiology*, **63**: 647-650.

FLECKELL, P.A., I.J. CRUZ, J.H. LILES y G. WHELAN (1996). Induction of anaesthesia with halothane and isoflurane in the rabbit: a comparison of the use of a face-mask or an anaesthetic chamber. *Laboratory animal*, **30**: 67-74.

FLECKNELL, P.A. y J.H. LILES (1996). Halothane anaesthesia in the rabbit: a comparison of the effects of medetomidine, acepromazine and midazolam on breath-holding induction. *Journal of veterinary anaesthesia*, **23**: 11-14.

FLECKNELL, P.A. (1998). Anestesia de animales de laboratorio: Introducción práctica para investigadores y técnicos. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España.

FLECKNELL, P.A., J.V. ROUGHAN y P. HEDENQVIST (1999). Induction of anaesthesia with sevoflurane and isoflurane in the rabbit. *Laboratory animals*, **33**: 41-46.

FLECKNELL, P.A. (2001). Conejos, roedores y hurones. En: Manual de anestesia y analgesia en pequeños animales (SEYMOUR, C. y R. GLEED, Eds.). Barcelona: Ediciones S, D.L., pp. 397-410.

FLEZZANI, P., N.D. CROUGHWELL, R.W. MCINTYRE y J.G. REVES (1986). Isoflurane decreases the cortisol response to cardiopulmonary bypass. *Anesthesia and analgesia*, **65**: 1117-1122.

FLOOD, P. y L.W. ROLE (1998). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulation by general anesthetics. *Toxicological letters*, **23**: 149-153.

FLUGGE, G. (1999). Effects of cortisol on brain alpha2-adrenoceptors: potential role in stress. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **23**: 949-956.

FORMAN, S.A. (1998). Direct interactions of anesthetics and nonanesthetics with the nicotinic acetylcholine receptor pore. *Toxicology letters*, **23**: 169-178.

FOX, S.M., D.J. MELLOR, E.C. FIRTH y H. HODGE (1994). Changes in plasma cortisol concentrations before, during and after analgesia, anaesthesia and anaesthesia plus ovariohysterectomy in bitches. *Research in veterinary science*, **57**: 110-118.

FREIBERGER, K.U., G. HACK y L. HAVERS (1975). Verhalten der Harnkatecholamine bei der Kombinationsnarkose mit Halothan-Thalamonal. [The course of the catecholamine excretion during combination anaesthesia with halothane and thalamonal (author's transl)]. *Der Anaesthetist*, **24**: 465-470.

FRID, I.A., B.A. IVIN, G.P. ALEKSANDRIN, M.V. KORSKOV y L.N. KORSKOVA (1983). Kонтратсия фторотана в крови и ее влияние на содержание катехоламинов и гемодинамику у онкологических больных во время операции. [Blood concentration of halothane and its effect on catecholamine levels and hemodynamics in cancer patients during surgery]. *Vestnik khirurgii imeni I. I. Grekova*, **130**: 106-108.

FRIESEN, R.H. y J.L. LICHTOR (1983). Cardiovascular effects of inhalation induction with isoflurane in infants. *Anesthesia and analgesia*, **62**: 411-414.

FRIESEN, R.H., J.L. WURL y G.A. CHARLTON (2000). Haemodynamic depression by halothane is age-related in paediatric patients. *Paediatric anaesthesia*, **10**: 267-272.

FULLER, R.W. (1990). Serotonin receptors and neuroendocrine responses. *Neuropsychopharmacology*, **3**: 495-502.

FULLER, R.W. (1992). The involvement of serotonin in regulation of pituitary-adrenocortical function. *Frontiers in neuroendocrinology*, **13**: 250-270.

GANONG, W. (1992). *Fisiología Médica*. (13ª Edición). México, D.F.: Manual Moderno.

GARCÍA-SÁNCHEZ, M.J., A. POLO y F. PERÁN (1993). Effects of halothane and isoflurane on beta-endorphin release in children. *Anaesthesia*, **48**: 38-40.

GAUMANN, D.M., E. TASSONYI, F. FATHI y M. GRIESSEN (1992). Effects of topical laryngeal lidocaine on sympathetic response to rigid panendoscopy under general anesthesia. *ORL journal for otorhinolaryngology and its related specialties*, **54**: 49-53.

GAUTHIER, A., F. GIRARD, D. BOUDREAU, M. RUEL y A. TODOROV (2002). Sevoflurane provides faster recovery and postoperative neurological assessment than isoflurane in long-duration neurosurgical cases. *Anesthesia and analgesia*, **95**: 1384-1388.

GEISSER, W., M. SCHREIBER, H. HOFBAUER, R. LATTERMANN, S. FUSSEL, U. WACHTER, M. GEORGIEFF y T. SCHRICKER (2003). Sevoflurane versus isoflurane--anaesthesia for lower abdominal surgery. Effects on perioperative glucose metabolism. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **47**: 174-179.

GELMAN, S., J.E. RIVAS, H. ERDEMIR, S. OPARIL, J. PROCTOR, T. MACKRELL y L. SMITH (1984). Hormonal and haemodynamic responses to upper abdominal surgery during isoflurane and balanced anaesthesia. *Canadian Anaesthetists' Society journal*, **31**: 509-516.

GERARD, H., P.L. SENSKY, D.M. BROOM, S. PERREMANS y R. GEERS (1996). Influences of type of anaesthesia on cortisol, β -endorphin and heart rate in pigs. *Veterinary research*, **27**: 219-226.

GONZÁLEZ GIL, A., J.C. ILLERA, G. SILVÁN y M. ILLERA (2001,a). Plasma glucocorticoid concentrations after fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anaesthesia in New Zealand white rabbits. *The veterinary record*, **148**: 784-786.

GONZÁLEZ GIL, A., J.C. ILLERA, G. SILVÁN y M. ILLERA (2001,b). Plasma glucocorticoid levels after pentobarbitone and thiopentone anaesthesia in New Zealand white rabbits. *The veterinary record*, **149**: 654-656.

GOTHERT, M., D. BISCHOFF y C. DREYER (1975). Einfluss von Inhalationsnarkotica auf die Katecholaminsekretion aus dem Nebennierenmark in vivo [The influence of inhalation anaesthetics on catecholamine secretion from the adrenal medulla in vivo]. *Der Anaesthetist*, **24**: 19-26.

GOTHERT, M., W. DORN y I. LOEWENSTEIN (1976). Inhibition of catecholamine release from the adrenal medulla by halothane. Site and mechanism of action. *Naunyn Schmiedeberg's archives of pharmacology*, **294**: 239-249.

GOTHERT, M. y J. WENDT (1977). Inhibition of adrenal medullary catecholamine secretion by enflurane: I. Investigations in vivo. *Anesthesiology*, **46**: 400-403.

GRANDY, J.L., D.S. HODGSON, C.I. DUNLOP, C.R. CURTIS y R.B. HEATH (1989). Cardiopulmonary effects of halothane anesthesia in cats. *American journal of veterinary research*, **50**: 1729-1732.

GREEN, D., y R.M. MOOR (1977). The influence of anaesthesia on the concentrations of progesterone and cortisol in peripheral blood plasma of sheep. *Research in veterinary science*, **22**: 122-123.

GROSENBAUGH, D.A. y W.W. MUIR (1998). Cardiorespiratory effects of sevoflurane, isoflurane, and halothane anesthesia in horses. *American journal of veterinary research*, **59**: 101-106.

GROUZMANN, E., A. BORGEAT, M. FATHI, R.C. GAILLARD y P. RAVUSSIN (2000). Plasma and cerebrospinal fluid concentration of neuropeptide Y, serotonin, and catecholamines in patients under propofol or isoflurane anesthesia. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, **78**: 100-107.

GUERTIN, P.A. y J. HOUNSGAARD (1999). L-type calcium channels but not N-methyl-D-aspartate receptor channels mediate rhythmic activity induced by cholinergic agonist in motoneurons from turtle spinal cord slices. *Neuroscience letters*, **261**: 81-84.

GYERMEK, L. (1996). Pharmacology of serotonin as related to anesthesia. *Journal of clinical anesthesia*, **8**: 402-425.

HADLEY, M.E. (1997). Las catecolaminas y el sistema simpaticoadrenal En: Endocrinología. Prentice Hall. International (UK) Ltd. Capítulo 14, pp.367-394.

HAGA, H.A., A. TEVIK y H. MOERCH (2000). Electroencephalographic and cardiovascular indicators of nociception during isoflurane anaesthesia in pigs. *Veterinary anaesthesia and analgesia*, **28**: 126-131.

HAGEN, C., M.R. BRANDT y H. KEHLET (1980). Prolactin, LH, FSH, GH and cortisol response to surgery and the effect of epidural analgesia. *Acta endocrinologica*, **94**: 151-154.

HALL, G.M., C. YOUNG, A. HOLDCROFT y J. ALAGHBAND-ZADEH (1978). Substrate mobilisation during surgery. A comparison between halothane and fentanyl anaesthesia. *Anaesthesia*, **33**: 924-930.

HALTER, J.B. y A.E. PFLUG (1980). Relationship of impaired insulin secretion during surgical stress to anesthesia and catecholamine release. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **51**: 1093-1098.

HANAGATA, K., T. MATSUKAWA, D.I. SESSLER, T. MIYAJI, T. FUNAYAMA, M. KOSHIMIZU, S. KASHIMOTO y T. KUMAZAWA (1995). Isoflurane and sevoflurane produce a dose-dependent reduction in the shivering threshold in rabbits. *Anesthesia and analgesia*, **81**: 581-584.

HANLEY, N.R. y L.D. VAN DE KAR (2003). Serotonin and the neuroendocrine regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and disease. *Vitamins and hormones*, **66**: 189-255.

HASE, K. y K. MEGURO (2000). Perioperative stress response in elderly patients for elective gastrectomy_ the comparison between isoflurane anesthesia and sevoflurane anesthesia both combined with epidural anesthesia. *Masui. The japanese journal of anesthesiology*, **49**: 121-129.

HAUSDORFER, J., H. HAGEMANN, M. BELL y M. MERTINAT (1986). Isofluran in der Kinderanaesthesie. [Isoflurane in pediatric anesthesia]. *Der Anaesthesist*, **35**: 345-352.

HAWKINS, M.F., A.A. BAUMEISTER, R.H. LAURE, S.M. UZELAC, L.T. FOUNTAIN y A.C. HINDELANG (2000). Manipulations of central gabaergic and dopaminergic systems alters stress responding in the rat. *Pharmacology biochemistry and Behavior*, **66**: 667-670.

HEDE, A.R. y C. POST (1982). Trichloroethylene and halothane inhibit uptake of 5-hydroxytryptamine in the isolated perfused rat lung. *Biochemical pharmacology*, **31**: 353-358.

HEDE, A.R., B.G. BERGLUND y C. POST (1987). Trichloroethylene and halothane inhibit uptake and metabolism of 5-hydroxytryptamine in rat lung slices. *Pharmacology and toxicology*, **61**: 191-194.

HEDENQVIST, P., J.V. ROUGHAN, L. ANTUNES, H. ORR y P.A. FLECKNELL (2001). Induction of anaesthesia with desflurane and isoflurane in the rabbit. *Laboratory animals*, **35**: 172-179.

HEDNER, J., T. HEDNER, B. BERGMAN y D. LUNDBERG (1980). Respiratory depression by GABA-ergic drugs in the preterm rabbit. *Journal of developmental physiology*, **2**: 401-407.

HELLEBREKERS, L.J. (1986). Comparison of isoflurane and halothane as inhalation anaesthetics in the dog. *The veterinary quarterly*, **8**: 183-188.

HELLEBREKERS, L., E.L.W. DE BOER, M.A. VAN ZUYLEN y H. VOSMEER (1997). A comparison between medetomidine-ketamine and medetomidine-propofol anaesthesia in rabbits. *American journal of veterinary research*, **52**: 669-674.

HENKE, J., M. KOCH, T. BRILL, B. BOLKART, M. JANCZEWSKI y W. ERHARDT (1996). Zur Isoflurannarkose beim Kaninchen im geschlossenen Narkosesystem [Isoflurane anesthesia in rabbits in a closed anesthetic system]. *Tierärztliche Praxis. Supplement*. **24**: 604-609.

HERMAN, J.P. y W.E. CULLINAN (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends in neuroscience*, **20**: 78-84.

HERTEL, V.G., D. OLTHOFF, B. VETTER, O. GIESSNER y S. LANGE (1995). Vergleich verschiedener Anesthesiemethoden mittels Plasma-Katecholamin-Bestimmungen. [Comparison of various methods of anesthesia by plasma catecholamine determination]. *Anaesthesiologie und reanimation*, **20**: 116-125.

HEYM, J., G.F. STEINFELS y B.L. JACOBS (1984). Chloral hydrate anesthesia alters the responsiveness of central serotonergic neurons in the cat. *Brain research*, **291**: 63-72.

HIKASA, Y., N. OHE, K. TAKASE y S. OGASAWARA (1997). Cardiopulmonary effects of sevoflurane in cats: comparison with isoflurane, halothane, and enflurane. *Research in veterinary science*, **63**: 205-210.

HO, W.M., Y.S. WANG, C.T. TSOU, W.H. LIN, S.Q. LIAO, J.M. HERSMAN y K.C. WONG (1989). Thyroid function during isoflurane anesthesia and valvular heart surgery. *Journal of cardiothoracic anesthesia*, **3**: 550-557.

HOBBS, B.A., T.G. ROLHALL, T.L. SPRENKEL y K.L. ANTHONY (1991). Comparison of several combinations for anesthesia in rabbits. *American journal of veterinary research*, **52**: 669-674.

HOFFMAN, W.E., D.J. MILETICH y R.F. ALBRECHT (1982). Cardiovascular and regional blood flow changes during halothane anesthesia in the aged rat. *Anesthesiology*, **56**: 444-448.

HOFFMAN, W.E., C. SEALS, D.J. MILETICH y R.F. ALBRECHT (1985). Plasma and myocardial catecholamine levels in young and aged rats during halothane anesthesia. *Neurobiology of aging*, **6**: 117-120.

HOFFMAN, W.D., S.M. BANKS, D.W. ALLING, P.W. EICHENHOLZ, P.Q. EICHACKER, J.E. PARRILLO y C. NATANSON (1991). Factors that determine the hemodynamic response to inhalation anesthetics. *Journal of applied physiology*, **70**: 2155-2163.

HOFFMAN, W.E., C. THOMAS y R.F. ALBRECHT (1993). The effect of halothane and isoflurane on neurologic outcome following incomplete cerebral ischemia in the rat. *Anesthesia and analgesia*, **76**: 279-283.

HOLST, D., C. ANGER y H.J. BAUCH (1993). N₂O-suplementierte, intravenöse Anästhesie versus Inhalationsanästhesie. Vergleichende Untersuchung der sympathoadrenergen Reaktion und der postoperativen Vigilanz. [N₂O-supplemented intravenous anesthesia versus inhalation anesthesia. A comparative study of the sympathoadrenergic reaction and postoperative vigilance]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie*, **28**: 18-22.

HOPWOOD, S.E. y J.A. STAMFORD (2001). Noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via alpha(1) and alpha(2A) adrenoceptors. *Neuropharmacology*, **41**: 433-442.

HOUSMANS, P.R., L.A. WANERK, E.G. CARTON y A.E. BARTUNEK (2000). Effects of halothane and isoflurane on the intracellular Ca²⁺ transient in ferret cardiac muscle. *Anesthesiology*, **93**:189-201.

HUGHAN, S.C., J.M. LOOSE, D.J. CADDY, B.J. CANNY, A.J. TILBROOK y I.R. YOUNG (2001). Combined xylazine and ketamine as an analgesic regimen in sheep. *Australian veterinary journal*, **79**: 207-211.

HUMBER, G. (1986). *Stress y conflictu*. Madrid: Parainfo.

HURLEY, R.J., R.P. MARINI, D.L. AVISON, J.C. MURPHY, J.M. OLIN y N.S. LIPMAN (1994). Evaluation of detomidine anesthetic combinations in the rabbit. *Laboratory animal science*, **44**: 472-478.

ILLERA, J.C., D.L. BROOKS, M.J. ILLERA, G. SILVÁN y M. ILLERA (1990). Repercusiones hematológicas de las extracciones sanguíneas reiteradas de sangre en el conejo NZW. *Revista de experimentación animal*, **1**: 53-58.

ILLERA, J.C., G. SILVÁN y M. ILLERA (1992). Obtención de anticuerpos frente a esteroides para estudios inmunológicos. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, **58**: 475-482.

ILLERA, J.C., G. SILVÁN, A. PORTELA, M.J. ILLERA, M. ILLERA, L. GARCÍA-ALONSO, G. CORNELISSEN y F. HALBERG (1993,a). Circadian cortisol rhythm of rabbits kept on different lighting regimens. *Cronobiología*, **20**: 219-232.

ILLERA, J.C., G. SILVÁN, M.J. ILLERA y M. ILLERA (1993,b). Steroid hormone profiles in several domestic species and the methodology of determination thereof. Trends in Comparative Biochemistry and Physiology. Trivandrum, India, pp. 869-879.

ILLERA, J.C., P.L. LORENZO, G. SILVÁN, C.J. MUNRO, M.J. ILLERA y M. ILLERA (1997). Enzyme immunoassay for testosterone and androstenedione in culture maturation medium from rabbits oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, **47**: 1375-1388.

ILLERA, J.C. (2000). Repercusiones del estrés en el bienestar animal. Instituto de España Real Academia de Ciencias Veterinarias.

ILLERA, J.C., A. GONZÁLEZ GIL, G. SILVÁN y M. ILLERA (2000). The effects of different anaesthetic treatments on the adreno-cortical functions and glucose levels in NZW rabbits. *Journal of physiology and biochemistry*, **56**: 329-336.

IMAI, A., E.P. STEFFEY, J.E. ILKIW y T.B. FARVER (1999,a). Comparison of clinical signs and hemodynamic variables used to monitor rabbits during halothane and isoflurane induced anesthesia. *American journal of veterinary research*, **60**: 1189-1195.

IMAI, A., E.P. STEFFEY, T.B. FARVER y J.E. ILKIW (1999,b). Assessment of isoflurane-induced anesthesia in ferrets and rats. *American journal of veterinary research*, **60**: 1577-1583.

INGWERSEN, W., D.G. ALLEN, D.H. DYSON, P.J. PASCOE y M.R. O'GRADY (1988). Cardiopulmonary effects of a halothane/oxygen combination in healthy cats. *Canadian journal of veterinary research*, **52**: 386-391.

IRIFUNE, M., T. SHIMIZU, M. NOMOTO y T. FUKUDA (1992). Ketamine-induced anesthesia involves the N-methyl-D-aspartate receptor-channel complex in mice. *Brain research*, **596**: 1-9.

ITO, C. (2000). The role of brain histamine in acute and chronic stresses. *Biomedicine and pharmacotherapy*, **54**: 263-267.

IZUMI, Y., T. KOCHI y T. MIZUGUCHI (1991). An analysis of the ventilatory response to carbon dioxide during halothane, isoflurane, or enflurane anesthesia in humans. *Masui. The japanese journal of anesthesiology*, **40**: 1222-1227.

JENKINS, A., N.P. FRANKS y W.R. LIEB (1999). Effects of temperature and volatile anesthetics on GABA (A) receptors. *Anesthesiology*, **90**: 484-491.

JOHNSON, M.T., J. MCCULLOGH, G. NINDL y J.K. CHAMBERLAIN (2003). Autoradiographic evaluation of electromagnetic field effects on serotonin (5HT1A) receptors in rat brain. *Biomedical sciences instrumentation*, **39**: 466-470.

JOHNSTONE, R.E., E.M. KENNEL, W. BRUMMUND, L.M. SHAW y R.C. EBERSOLE (1976). Effect of halothane anesthesia on muscle, liver, thyroid, and adrenal-function tests in man. *Clinical chemistry*, **22**: 217-220.

JONES, R.S. y S.L. SNOWDON (1986). Experimental investigation of the cardiovascular and respiratory effects of increasing concentrations of isoflurane in the dog. *Research in veterinary science*, **40**: 89-93.

JONES, R.S. (2001). La práctica de la anestesia y la analgesia veterinarias. En: Manual de anestesia y analgesia en pequeños animales (SEYMOUR, C. y R. GLEED, eds.). Barcelona: Ediciones S, D.L., pp. 3-9.

JONSSON, L.O. y C. WAHLGREEN (1989). Respiratory flow characteristics during isoflurane/nitrous oxide anaesthesia. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **33**: 331-335.

JORDAN, D., S.M. SHULMAN y E.D. MILLER (1993). Esmolol hydrochloride, sodium nitroprusside, and isoflurane differ in their ability to alter peripheral sympathetic responses. *Anesthesia and analgesia*, **77**: 281-290.

JOYCE, J.T., M.F. ROIZEN, J.I. GERSON, H. GROBECKER, E.I. EGER y A.R. FORBES (1982). Induction of anesthesia with halothane increases plasma norepinephrine concentrations. *Anesthesiology*, **56**: 286-290.

KAGAWA, K., T. MAMMOTO, Y. HAYASHI, T. KAMIBAYASHI, T. MASHIMO, y I. YOSHIYA (1997). The effect of imidazoline receptors and alpha2-adrenoceptors on the anesthetic requirement (MAC) for halothane in rats. *Anesthesiology*, **87**: 963-967.

KAMATH, G.S., D.K. RORIE y G.M. TYCE (1993). Altered release and metabolism of norepinephrine in superfused canine saphenous veins in the presence of halothane and hypoxia. *Anesthesiology*, **78**: 553-561.

KANIARIS, P., A. FASSOULAKI y A. PARASCHOU (1979). Cortisol levels during enflurane anesthesia in man. *Acta anaesthesiologica Belgica*, **30**: 225-229.

- KARURI, A.R., L.R. ENGELKING y M.S.A. KUMAR (1998,a). Effects of halothane and methoxyflurane on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rat. *Brain research bulletin*, **47**: 205-209.
- KARURI, A.R., R.K. AGARWAL, L.R. ENGELKING y M.S.A. KUMAR (1998,b). Effects of halothane and methoxyflurane on regional brain and spinal cord substance P-like and beta-endorphin-like immunoreactivities in the rat. *Brain research bulletin*, **45**: 501-506.
- KATO, M., T. KOMATSU, T. KIMURA, F. SUGIYAMA, K. NAKASHIMA y Y. SHIMADA (1992). Spectral analysis of heart rate variability during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology*, **77**: 669-674.
- KAUKINEN, S. (1978). The combined effects of antihypertensive drugs and anaesthetics (halothane and ketamine) on the isolated heart. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **22**: 649-657.
- KEHLET, H. (1984). The stress response to anaesthesia and surgery: release mechanisms and modifying factors. *Clinics in Anaesthesiology*, **2**: 315-339.
- KHANNA, A.K., W.N. MCDONELL, D.H. DYSON y P.M. TAYLOR (1995). Cardiopulmonary effects of hypercapnia during controlled intermittent positive pressure ventilation in the horse. *Canadian journal of veterinary research*, **59**: 213-221.
- KIDD, J.E., N.L. GILCHRIST, R.J. UTLEY, M.G. NICHOLLS, E.A. ESPINER y T.G. YANDLE (1987). Effect of opiate, general anaesthesia and surgery on plasma atrial natriuretic peptide levels in man. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, **14**: 755-760.
- KINGSTON, H.G. (1986). Halothane and isoflurane anesthesia in pediatric outpatients. *Anesthesia and analgesia*, **65**: 181-184.
- KO, J.C., R.E. MANDSAGER, D.N. LANGE y S.M. FOX (2000). Cardiorespiratory responses and plasma cortisol concentrations in dogs treated with medetomidine before undergoing ovariohysterectomy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **217**: 509-514.
- KOCAN, M. (1987). The Triservice anaesthetic apparatus. Trial of isoflurane and enflurane as alternatives to halothane. *Anaesthesia*, **42**: 1101-1104.
- KOMAI, H. Y B.F. RUSY (1984). Differences in the myocardial depressant action of thiopental and halothane. *Anesthesia and analgesia*, **63**: 313-318.
- KONG, K.L., S.M. WILLATTS, C. PRYS-ROBERTS, J.T. HARVEY y S. GORMAN (1990). Plasma catecholamine concentration during sedation in ventilated patients requiring intensive therapy. *Intensive care medicine*, **16**: 171-174.
- KONO, K., D.M. PHILBIN, C.H. COGGINS, J. MOSS, C.E. ROSOW, R.C. SCHNEIDER y E.E. SLATER (1981). Renal function and stress response during halothane or fentanyl anesthesia. *Anesthesia and analgesia*, **60**: 552-556.
- KOSHIZAKI, M., M. KAWAMATA, S.G. SHIMADA, Y. SAITO y J.G. COLLINS (2003). 5-HT₃ receptors partially mediate halothane depression of spinal dorsal horn sensory neurons. *Anesthesia and analgesia*, **96**: 1027-1031.
- KRÜGER, J., W. ZELLER y E. SCHOTTMANN (1994). A simplified procedure for endotracheal intubation in rabbits. *Laboratory animals*, **28**: 176-177.
- KULIER, A.H., L.A. TURNER, S. VODANOVIC, S. CONTNEY, D.A. LATHROP y Z.J. BOSNJAK (2000). Multiple agents potentiate alpha1-adrenoceptor induced conduction depression in canine cardiac purkinje fibers. *Anesthesiology*, **92**: 1713-1721.

LACOURMONTA, S., J.L. PATERSON, J. BURRIN, R.C. CAUSON, M.J. BROWN y G.M. HALL (1986). Effects of two differing halothane concentrations on the metabolic and endocrine responses to surgery. *British journal of anaesthesia*, **58**: 844-850.

LACOURMONTA, S., T.H. YEO, J.M. BURRIN, S.R. BLOOM, J.L. PATERSON y G.M. HALL (1987). Fentanyl and the beta-endorphin, ACTH and glucoregulatory hormonal response to surgery. *British journal of anaesthesia*, **59**: 713-720.

LANZA, V., S. MERCADANTE, S. LATTEI, M.T. LATTEI y L. BELLANCA (1986). La reponse neuro-endocrinienne a l'anesthesie par isoflurane. [Neuroendocrine response to anesthesia with isoflurane]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*, **5**: 120-123.

LASAOSA, J.M. y F.G. LAREDO (1996). Anestesia general II. Anestesia inhalatoria. Respiración asistida. En: Cirugía Veterinaria (GONZALO, J.M., I. AVILA, F. SAN ROMÁN, A. ORDEN, M.A. SÁNCHEZ-VALVERDE, I. BONAFONTE, J.L. PEREIRA y F. GARCÍA). Interamericana, McGraw-Hill, pp. 503-523.

LATTERMANN, R., T. SCHRICKER, U. WATCHER, A. GOERTZ y M. GEORGIEFF (2001). Intraoperative epidural blockade prevents the increase in protein breakdown after abdominal surgery. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **45**: 1140-1146.

LATTERMANN, R., U. WATCHER, M. GEORGIEFF, A. GOERTZ y T. SCHRICKER (2003). Katabole Stressantwort während und nach abdominalchirurgischen Eingriffen. Ein Vergleich zwischen zwei Anesthesieverfahren. [Catabolic stress response during and after abdominal surgery. Comparison between two anaesthesia procedures]. *Der Anaesthetist*, **52**: 500-506

LEACH, M.C., V.A. BOWELL, T.F. ALLAN y D.B. MORTON (2002). Degrees of aversion shown by rats and mice to different concentrations of inhalational anaesthetics. *The veterinary record*, **150**: 808-815.

LEE, J.S., D. MORROW, M.C. ANDRESEN y K.S. CHANG (2002). Isoflurane depresses baroreflex control of heart rate in decerebrate rats. *Anesthesiology*, **96**: 1214-1222.

LENG, G. y A. RUSSELL (1998). Learning to cope with repeated stress. *The journal of physiology*, **510**: 331.

LERMAN, J., J.P. OYSTON, T.M. GALLAGHER, K. MIKASAKA, G.A. VOLGYESI y F.A. BURROWS (1990). The minimum alveolar concentration (MAC) and hemodynamic effects of halothane, isoflurane, and sevoflurane in newborn swine. *Anesthesiology*, **73**: 717-721.

LEUNG, J.M. y D.A. PASTOR (1998). Dissociation between haemodynamics and sympathetic activation during anaesthetic induction with desfluranes. *Canadian journal of anaesthesia*, **45**: 533-540.

LOPER, K., J. REITAN, H. BENNETT, J. BENTHUYSEN y L. SNOOK (1987). Comparison of halothane and isoflurane for rapid anesthetic induction. *Anesthesia and analgesia*, **66**: 766-768.

LÓPEZ, J.F., H. AKIL, y S.J. WATSON (1999). Role of biological and psychological factors in early development and their impact on adult life: Neural circuits mediating stress. *Biological psychiatry*, **46**: 1461-1471.

LUDDERS, J.W. (2001). Anestésicos inhalatorios. En: Manual de anestesia y analgesia en pequeños animales (SEYMOUR, C. Y R. GLEED). Barcelona: Ediciones S, D.L.

LUMB, W.V. y E.W. JONES (1981). Anestesia veterinaria. Compañía Editorial Continental, S.A., México.

LUNA, S.P. y P.M. TAYLOR (1995). Pituitary-adrenal activity and opioid release in ponies during thiopentone/halothane anaesthesia. *Research in veterinary science*, **58**: 35-41.

LUNA, S.P., P.M. TAYLOR y M.J. WHEELER (1996). Cardiorespiratory, endocrine and metabolic changes in ponies undergoing intravenous or inhalation anaesthesia. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **19**: 251-258.

LUNA, S.P., P.M. TAYLOR y F. MASSONE (1997,a). Midazolam and ketamine induction before halothane anaesthesia in ponies: cardiorespiratory, endocrine and metabolic changes. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **20**: 153-159.

LUNA, S.P., P.M. TAYLOR y M. BLOOMFIELD (1997,b). Endocrine changes in cerebrospinal fluid, pituitary effluent, and peripheral plasma of anesthetized ponies. *American journal of veterinary research*, **58**: 765-770.

LUNA, S.P., P.M. TAYLOR y J.C. BREARLEY (1999). Effects of glucose infusion on the endocrine, metabolic and cardiorespiratory responses to halothane anaesthesia of ponies. *The veterinary record*, **145**: 100-103.

LUNA, S.P. y P.M. TAYLOR (2001). Cardiorespiratory and endocrine effects of endogenous opioid antagonism by naloxone in ponies anaesthetised with halothane. *Research in veterinary science*, **70**: 95-100.

LUNN, J.J. y D.K. RORIE (1984). Halothane-induced changes in the release and disposition of norepinephrine at adrenergic nerve endings in dog saphenous vein. *Anesthesiology*, **61**: 377-384.

MACK, P.O., T.H. NG y I.C. SONG (1994). Anaesthesia for animals in experimental research. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, **23**: 470-474.

MACKENSEN, G.B., B. NELLGARD, Y. MIURA, C.T. CHU, F. DEXTER, R.D. PEARLSTEIN y D.S. WARNER (1999). Sympathetic ganglionic blockade masks beneficial effect of isoflurane on histologic outcome from near-complete forebrain ischemia in the rat. *Anesthesiology*, **90**: 873-881.

MACNAB, M.S., P.H. MANNINEN, A.M. LAM y A.W. GELB (1988). The stress response to induced hypotension for cerebral aneurysm surgery: a comparison of two hypotensive techniques. *Canadian journal of anaesthesia*, **35**: 111-115.

MACRAE, D.J. y D. GUERREIRO (1989). A simple laryngoscopic technique for the endotracheal intubation of rabbits. *Laboratory animals*, **23**: 59-61.

MAINIERI, R. (1999), Estrés (on line). Disponible en <http://healthclub.fortunecity.com/hockey/91/estres.html#cap1> (3 noviembre de 1999).

MALATINSKY, J., M. VIGAS, J. JURCOVICOVA, D. JEZOVA, S. GARAYOVA y M. MINARIKOVA (1986). The patterns of endocrine response to surgical stress during different types of anesthesia and surgery in man. *Acta anaesthesiologica Belgica*, **37**: 23-32.

MAMMOTO, T., Y. YAMAMOTO, K. KAGAWA, Y. HAYASHI, T. MASHIMO, I. YOSHIYA y A. YAMATODANI (1997). Interactions between neuronal histamine and halothane anesthesia in rats. *Journal of neurochemistry*, **69**: 406-411.

MANTZ, J., C. VARLET, J.B. LECHARNY, D. HENZEL, P. LENOT, y J.M. DESMONTS (1994). Effects of volatile anesthetics, thiopental, and ketamine on spontaneous and depolarization-evoked dopamine release from striatal synaptosomes in the rat. *Anesthesiology*, **80**: 352-363.

MARANO, G., M. GRIGIONI, F. TIBURZI, A. VERGARI y F. ZANGHI (1996). Effects of isoflurane on cardiovascular system and sympathovagal balance in New Zealand white rabbits. *Journal of cardiovascular pharmacology*, **28**: 513-518.

MARANO, G., R. FORMIGARI, M. GRIGIONI y A. VERGARI (1997). Effects of isoflurane versus halothane on myocardial contractility in rabbits: assessment with transthoracic two-dimensional echocardiography. *Laboratory animals*, **31**: 144-150.

MARTIN, D.C., M. PLAGENHOEF, J. ABRAHAM, R.L. DENNISON y R.S. ARONSTAM (1995). Volatile anesthetics and glutamate activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochemical pharmacology*, **49**: 809-817.

MATSUKAWA, T., M. MANABE, T. KUMAZAWA, T. MIYAJI, M. IRIKI y M. HASHIMOTO (1992). Effect of halothane on the peripheral cutaneous vasoconstriction and shivering induced by internal body cooling in rabbits. *Masui. The japanese journal of anesthesiology*, **41**: 245-250.

MATTHEWS, N.S., S.M. MILLER, S.M. HARTSFIELD y M.R. SLATER (1992). Comparison of recoveries from halothane vs isoflurane anesthesia in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **201**: 559-563.

MAURER, A.J., D.I. SESSLER, E.I. EGER y J.M. SONNER (2000). The nonimmobilizer 1,2-dichlorohexafluorocyclobutane does not affect thermoregulation in the rat. *Anesthesia and analgesia*, **91**: 1013-1016.

MAYNE, A., P. RANDOUR y K. JOUCKEN (1987). Halothane versus isoflurane for short ENT procedures with spontaneous respiration in children. *Acta anaesthesiologica Belgica*, **38**: 139-146.

MCATEER, P.M., J.A. CARTER, G.M. COOPER y C. P. ROBERTS (1986). Comparison of isoflurane and halothane in outpatients paediatric dental anaesthesia. *British journal of anaesthesia*, **58**: 390-393.

MCCALLUM, J.B., T.A. STEKIEL, Z.J. BOSNJAK y J.P. KAMPINE (1993). Does isoflurane alter mesenteric venous capacitance in the intact rabbit?. *Anesthesia and analgesia*, **76**: 1095-1105.

MCCOY, D., K. HARGADEN, S. KILFEATHER, D. BOUCHIER-HAYES y A.J. CUNNINGHAM (1993). Neuroendocrine and haemodynamic responses to abdominal aortic cross clamp and release during high-dose opiate-oxygen-isoflurane anaesthesia. *European journal of vascular surgery*, **7**: 648-653.

MCEWEN, B. (1999). Stress an hippocampal plasticity. *Annual review neuroscience*. **22**: 105-122.

MCKINNEY, M.S., J.P. FEE y R.S. CLARKE (1993). Cardiovascular effects of isoflurane and halothane in young and elderly adult patients. *British journal of anaesthesia*, **71**: 696-701.

METHA, A.K. y M.K. TICKU (1999). An update on GABA A receptors. *Brain research reviews*, **29**: 196-217.

MILLIGAN, K.R., J.P. HOWE y J.W. DUNDEE (1988). Halothane and isoflurane in outpatient anaesthesia. A comparison of recovery. *Anaesthesia*, **43**: 2-4.

MINAMI, K., N. YANAGIHARA, Y. TOYOHIRA, M. TSUTSUI, A. SHIGEMATSU, A. WADA y F. IZUMI (1994). Isoflurane inhibits nicotinic acetylcholine receptor-mediated Na⁺ influx and muscarinic receptor-evoked cyclic GMP production in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedeberg's archives of pharmacology*, **349**: 223-229.

MINAMI, K., M. MINAMI y R.A. HARRIS (1997). Inhibition of 5-hydroxytryptamine type 2A receptor-induced currents by n-alcohols and anesthetics. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **281**: 1136-1143.

MOHAMED, F.H.A. y J.E. COX (1987). The effect of pentobarbitone sodium anaesthesia on plasma LH, cortisol and testosterone in goats. *British veterinary journal*, **143**: 513-519.

MOORE, M.A., R.B. WEISKOPF, E.I. EGER, M. NOORAMI, L. MCKAY y M. DAMASK (1994). Rapid 1% increases of end-tidal desflurane concentration to greater than 5% transiently increase heart rate and blood pressure in humans. *Anesthesiology*, **81**: 94-98.

MUNCK, A., P.M. GUYRE y N.J. HOLBROOK (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine review*, **5**: 25-44.

MUNRO, C. y G. STABENFELDT (1984). Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for determination of progesterone. *Journal of endocrinology*, **101**: 41-49.

MUTOH, T., R. NISHIMURA, H.Y. KIM, S. MATSUNAGA, T. KADOSAWA, M. MOCHIZUKI y N. SASAKI (1995). Rapid inhalation induction of anesthesia by halothane, enflurane, isoflurane and sevoflurane and their cardiopulmonary effects in dogs. *Journal of veterinary medical science*, **57**: 1007-1013.

MUTOH, T., K. KOJIMA, K. TAKAO, R. NISHIMURA y N. SASAKI (2001). Comparison of sevoflurane with isoflurane for rapid mask induction in midazolam and butorphanol sedated dogs. *Journal of veterinary medicine A. Physiology, pathology, clinical medicine*, **48**: 223-230.

MUZI, M., C.W. LOPATKA y T.J. EBERT (1996). Desflurane-mediated neurocirculatory activation in humans. Effects of concentration and rate of change on responses. *Anesthesiology*, **84**: 1035-1042.

NAGASAKI, G., M. TANAKA y T. NISHIKAWA (2001). The recovery profile of baroreflex control of heart rate after isoflurane or sevoflurane anesthesia in humans. *Anesthesia and analgesia*, **93**: 1127-1131.

NAKAMURA, T. y M. TAKASAKI (1991). Metabolic and endocrine responses to surgery during caudal analgesia in children. *Canadian journal of anaesthesia*, **38**: 969-973.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1996). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C., USA.

NEUBERT, E., H. GURTLER y G. VALLENTIN (1996). Einfluss einer akuten Belastung auf die Plasmakonzentrationen an Catecholaminen und Cortisol sowie an Metaboliten bei stressempfindlichen Mastschweinen. [Effect of acute stress on plasma levels of catecholamines and cortisol in addition to metabolites in stress-susceptible growing swine]. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, **109**: 381-384.

NIETGEN, G.W., C.W. HONEMANN, C.K. CHAN, G.L. KAMATCHI y M.E. DURIEUX (1998). Volatile anaesthetics have differential effects on recombinant m1 and m3 muscarinic acetylcholine receptor function. *British journal of anaesthesia*, **81**: 569-577.

NIR, I., D. YAM y M. PEREK (1976). Inhibition of adrenocortical function by intravenous administration of sodium pentobarbital in cocks. *Poultry science*, **55**: 450-451.

NISHIKAWA, K. y M.B. MACIVER (2001). Agent-selective effects of volatile anesthetics on GABA A receptor-mediated synaptic inhibition in hippocampal interneurons. *Anesthesiology*, **94**: 340-347.

NISHINA, K., K. MIKAWA, N. MAEKAWA y H. OBARA (1995). The efficacy of guanfacine in reducing perioperative hemodynamic changes and volatile anesthetic requirement. *Journal of clinical anesthesia*, **7**: 211-218.

OKAMOTO, H., S. HOKA, T. HAWASAKI, T. OKUYAMA y S. TAKAHASHI (1996). Dose-dependent increases in the renal sympathetic nerve activity during rapid increase in isoflurane concentration in intact, lower airway-deafferented, and baroreceptor-deafferented rabbits. *Anesthesiology*, **84**: 1196-1204.

ORDEN, M.A., J.M.GONZALO-ORDEN y J. DEL RÍO (1996). Anestesia. En: Cirugía Veterinaria (GONZALO, J.M., I. AVILA, F. SAN ROMÁN, A. ORDEN, M.A. SÁNCHEZ-VALVERDE, I. BONAFONTE, J.L. PEREIRA y F. GARCÍA). Interamericana, McGraw-Hill, pp. 445-455.

OTSUKA, H. (1998). Effects of volatile anesthetics on respiratory activity and chemosensitivity in the isolated brainstem-spinal cord of the newborn rat. [*Hokkaido igaku zasshi*] *The Hokkaido journal of medical science*, **73**: 117-136.

OYAMA, T., P. LATTO y D.A. HOLADAY (1975). Effect of isoflurane anaesthesia and surgery on carbohydrate metabolism and plasma cortisol levels in man. *Canadian anaesthetists' Society journal*, **22**: 696-702.

OYAMA, T., K. TANIGUCHI, T. JIN, T. SATONE y M. KUDO (1979). Effects of anaesthesia and surgery on plasma aldosterone concentration and renin activity in man. *British journal of anaesthesia*, **51**: 747-752.

OYAMA, T., K. TANIGUCHI, T. TAKAZAWA, A. MATSUKI y M. KUDO (1980). Effect of anaesthesia and surgery on endocrine function in elderly patients. *Canadian anaesthetists' Society journal*, **27**: 556-559.

OYAMA, T. y S. WAKAYAMA (1988). The endocrine responses to general anesthesia. *International anesthesiology clinics*, **26**: 176-181.

OZAKI, S., Y. GOTOH, H. NAKAYA, M. AZUMA y M. KANNO (1985). Electrophysiologic effects of enflurane and halothane on isolated rabbit hearts in the presence and absence of metabolic acidosis. *Anesthesia and analgesia*, **64**: 1060-1064.

ÖZKAN, S., B.Y. CINGÖZBAY, S. USYILMAZ, Z.ÇANKIR, B.S. CEBECI y M. GÖKBEN (2001). Comparison of hemodynamic and neuroendocrine changes during total intravenous anesthesia and inhalation anesthesia. *Current therapeutic research*, **62**: 142-152.

PÀCAK, K (2000). Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiological research*, **49** (Suppl.1): S11-17.

PAC-SOO, C.K., C. WANG, M.K. CHAKRABARTI y J.G. WHITWAM (2000). Comparison of the effects of inhalational anaesthetic agents on sympathetic activity in rabbits. *European journal of anaesthesiology*, **17**: 311-318.

PALMISANO, B.W., R.W. MEHNER, D.F. STOWE, Z.J. BOSNJAK y J.P. KAMPINE (1994). Direct myocardial effects of halothane and isoflurane. Comparison between adult and infant rabbits. *Anesthesiology*, **81**: 718-729.

PANDIT, U.A., G.M. STEUDE y A.B. LEACH (1985). Induction and recovery characteristics of isoflurane and halothane anaesthesia for short outpatient operations in children. *Anaesthesia*, **40**: 1226-1230.

PASHKOV, V.N. y H.C. HEMMINGS (2002). The effects of general anesthetics on norepinephrine release from isolated rat cortical nerve terminals. *Anesthesia and analgesia*, **95**: 1274-1281.

PASQUALLI, R., V. VICENNATI, F. CALZONI, U. GNUDI, A. GAMBINERI, L. CERONI, P. CORTELLI, R. MENOZZI, R. SINISI y G.D. RIO (2000). Alpha2-adrenoceptor regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in obesity. *Clinical endocrinology*, **52**: 413-421.

PEETERS, M.E., D. GIL, E. TESKE, V. EYZENBACH, W.E. BROM, J.T. LUMEIJ y H.W. DE VRIES (1988). Four methods for general anaesthesia in the rabbit: a comparative study. *Laboratory animals*, **22**: 355-360.

PEREIRA ESPINEL, J.L., A. BARREIRO y C. VÁZQUEZ (1996). Anestesia general. En: Cirugía Veterinaria (GONZALO, J.M., F. SAN ROMÁN, A. ORDEN, M.A. SÁNCHEZ-VALVERDE, I. BONAFONTE, J.L. PEREIRA y F. GARCÍA). Interamericana, McGraw-Hill, pp. 493-502.

PESOTTO, P., R. LIBERATI, O. PETRELLA y W.C. HULSMANN (1995). Alteration of tissue carnitine content following anaesthesia with barbiturate and surgery in rat. *International journal of clinical and pharmacology research* **15**: 191-199.

PFLUG, A.E. y J.B. HALTER (1981). Effect of spinal anesthesia on adrenergic tone and the neuroendocrine responses to surgical stress in humans. *Anesthesiology*, **55**: 120-126.

PICKER, O., T.W. SCHEEREN y J.O. ARNDT (2001). Inhalation anaesthetics increase heart rate by decreasing cardiac vagal activity in dogs. *British journal of anaesthesia*, **87**: 748-754.

PIRIOU, V., S. ROSS, O. BASTIEN, D. PIGOTT, F. TRIVIN y P. FOEX (1998). Cardiovascular effects of concomitant administration of isoflurane and nicorandil in dogs. *British journal of anaesthesia*, **80**: 481-487.

PLOTSKY, P.M., S. OTTO y S. SUTTON (1987). Neurotransmitter modulation of corticotropin releasing factor secretion into the hypophysial portal circulation. *Life sciences*, **41**: 1311-1317.

POCOCK, G. y C.D. RICHARDS (1988). The action of volatile anaesthetics on stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cells. *British journal of pharmacology*, **95**: 209-217.

POLIS, I., F. GASTHUYS, L. VAN HAM y H. LAEVENS (2001). Recovery times and evaluation of clinical hemodynamic parameters of sevoflurane, isoflurane and halothane anaesthesia in mongrel dogs. *Journal of veterinary medicine A. Physiology, pathology, clinical medicine*, **48**: 401-411.

POON, K.S., W.K. CHANG, Y.C. CHEN, K.H. CHAN y T.Y. LEE (1995). Evaluation of stress response to surgery under general anesthesia combined with spinal analgesia. *Acta anaesthesiologica Sinica*, **33**: 85-90.

POUNDER, D.R., D. BLACKSTOCK y D.J. STEWARD (1991). Tracheal extubation in children: halothane versus isoflurane, anesthetized versus awake. *Anesthesiology*, **74**: 653-655.

PRICE, H.L. y S.T. OHNISHI (1980). Effects of anesthetics on the heart. *Federation proceedings*, **39**: 1575-1579.

RAJ, P.P., M.J. TOD y M.T. JENKINS (1976). Clinical comparison of isoflurane and halothane anesthetics. *Southern medical journal*, **69**: 1128-1132.

RAMACHANDRA, V., C. MOORE, N. KAUR y F. CARLI (1989). Effect of halothane, enflurane and isoflurane on body temperature during and after surgery. *British journal of anaesthesia*, **62**: 409-414.

REITAN, J.A., N.D. KIEN, P.G. MOORE y D.A. WHITE (1994). Regional myocardial function during contiguous ischaemia in an anaesthetized canine model: comparison of six methods of measurement. *British journal of anaesthesia*, **73**: 371-379.

ROBERTS, D.R. y R.J. PETHYBRIDGE (1991). Ventilation with isoflurane in the Triservice anaesthetic apparatus: a comparison with halothane and trichlorethylene. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, **73**: 258-263.

ROBERTSON, S.A., C.J. STEELE y C.L. CHEN (1990). Metabolic and hormonal changes associated with arthroscopic surgery in the horse. *Equine veterinary journal*, **22**: 313-316.

ROIZEN, M.F., N.B. THOA, J. MOSS y I.J. KOPIN (1975). Inhibition by halothane of release of norepinephrine, but not of dopamine-beta-hydroxylase, from guinea-pig vas deferens. *European journal of pharmacology*, **31**: 313-318.

ROIZEN, M.F., R.W. HARRIGAN y B.M. FRAZER (1981). Anesthetic doses blocking adrenergic (stress) and cardiovascular responses to incision--MAC BAR. *Anesthesiology*, **54**: 390-398.

ROLLY, G., L. VERSICHELEN y E. MOERMAN (1984). Cardiovascular, metabolic and hormonal changes during isoflurane N2O anaesthesia. *European journal of anaesthesiology*, **1**: 327-334.

RORIE, D.K., G.M. TYCE y R.A. MACKENZIE (1984). Evidence that halothane inhibits norepinephrine release from sympathetic nerve endings in dog saphenous vein by stimulation of presynaptic inhibitory muscarinic receptors. *Anesthesia and analgesia*, **63**: 1059-1064.

ROSENDAHL, W., U. SCHULZ, T. TEUFEL, C. IRTEL VON BRENNENDORF y D. GUPTA (1995). Surgical stress and neuroendocrine responses in infants and children. *Journal of pediatric endocrinology and metabolism*, **8**: 187-194.

ROTH-ISIGKEIT, A., J. BRECHMANN, L. DIBBELT, H.H. SIEVERS, W. RAASCH y P. SCHMUCKER (1998). Persistent endocrine stress response in patients undergoing cardiac surgery. *Journal of endocrinological investigation*, **21**: 12-19.

SANHOURI, A.A., R.S. JONES y H. DOBSON (1990). Plasma concentrations of cortisol, testosterone, glucose and blood gases in male goats during anaesthesia with pentobarbitone sodium. *British veterinary journal*, **146**: 36-42.

SANHOURI, A.A., R.S. JONES y H. DOBSON (1991). Pentobarbitone inhibits the stress response to transport in male goats. *British veterinary journal*, **147**: 42-47.

SARTICK, M., M.L. ELDRIDGE, J.A. JOHNSON, K.D. KURZ, W.L. FOWLER y C.G. PAYNE (1979). Recovery rate of the cardiovascular system in rabbits following short-term halothane anaesthesia. *Laboratory animal science*, **29**: 186-190.

SCARLINO, F., F. ARBEZ-GINDRE, C. CLEMENT, F. BARALE y E. SCHALL (1986). Anesthésie générale et variations peropératoires de la beta endorphine plasmatique. [General anaesthesia and preoperative changes in plasma beta-endorphin]. *Cahiers d'anesthesiologie*, **34**: 635-639.

SCHIEBER, R.A., A. NAMNOUM, A. SUGDEN, G.K. SHIU, R.A. ORR y D.R. COOK (1986). Hemodynamic effects of isoflurane in the newborn piglet: comparison with halothane. *Anesthesia and analgesia*, **65**: 633-638.

SEAGARD, J.L., F.A. HOPP, J.H. DONEGAN, J.H. KALBFLEISCH y J.P. KAMPINE (1982). Halothane and the carotid sinus reflex: evidence for multiple sites of action. *Anesthesiology*, **57**: 191-202.

SEAR, J.W., C.R. EDWARDS y S.M. ATHERDEN (1988). Dual effect of etomidate on mineralocorticoid biosynthesis. *Acta anaesthesiologica Belgica*, **39**: 87-94.

SECKL, J.R., K.L. DICKSON y G. FINK (1990). Central 5, 7-dihydroxytryptamine lesions decrease hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic acid expression. *Neuroendocrinology*, **2**: 911-916.

SEGAL, I.S., J.K. WALTON, I. IRWIN, L.E. DELANNEY, G.A. RICAURTE, J.W. LANGSTON y M. MAZE (1990). Modulating role of dopamine on anesthetic requirements. *European journal of pharmacology*, **186**: 9-15.

SEGAWA, H., K. MORI, M. MURAKAWA, K. KASAI, G. SHIRAKAMI, T. ADACHI y T. ARAI (1998). Isoflurane and sevoflurane augment norepinephrine responses to surgical noxious stimulation in humans. *Anesthesiology*, **89**: 1407-1413.

SEITZ, W., N. LUBBE, W. BECHSTEIN, K. FRITZ y E. KIRCHNER (1985,a). Zum Verhalten des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems unter Inhalations- und Leitungsanästhesie. Eine Übersicht mit Vergleichsstudie. [Behavior of the hypophyseal-adrenal cortex system in inhalation and conduction anesthesia. A review with comparative study]. *Anästhesie, Intensivtherapie, Notfallmedizin*, **20**: 119-124.

SEITZ, W., W. BECHSTEIN, G. ONKEN, K. FRITZ y E. KIRCHNER (1985,b). Endokrine Reaktionsmuster bei abdominalchirurgischen Patienten unter Isofluraneanaesthesie. [Endocrine reaction pattern in abdominal surgical patients as affected by isoflurane anesthesia]. *Der anaesthetist*, **34**: 451-455.

SEITZ, W., N. LUEBBE, W. BECHSTEIN, K. FRITZ y E. KIRCHNER (1986). A comparison of two types of anaesthesia on the endocrine and metabolic responses to anaesthesia and surgery. *European journal of anaesthesiology*, **3**: 283-294.

SEITZ, W. (1991). Stress und Endokrinium. Ein Beitrag zur Wertigkeit endokriner Parameterunter Anästhesie und Operation. [Stress and the endocrine system. A contribution to the value of endocrine parameters in anesthesia and surgery]. *Anaesthesiologie und reanimation*, **16**: 147-158.

SHIMAZU, Y., K. UMEMURA, K. KAWANO, K. HOKAMURA, H. KAWAZURA y M. NAKASHIMA (1998). Respiratory effects of halothane and AMPA receptor antagonist synergy in rats. *European journal of pharmacology*, **342**: 261-265.

SIGURDSSON, G.H., S.G. LINDAHL y N.E. NORDEN (1984). Catecholamine and endocrine response in children during halothane and enflurane anaesthesia for adenoidectomy. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **28**: 47-51.

SILVÁN, G. (1991). Correlaciones entre tamaño folicular y niveles de hormonas esteroides en ganado vacuno. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

SILVÁN, G., J.C. ILLERA y M. ILLERA (1993). Determination of follicular fluid estradiol levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *Steroids*, **58**: 324-329.

SINGH, R.K., J.P.N. CHANSOURIA y K.N. UDUPA (1975). Circadian periodicity of plasma cortisol (17-OHCS) levels in normal, traumatized, corticotrophin and dexamethasone treated rabbits. *The Indian journal of medical research*, **63**: 793-798.

SMIRNOV, V.M. (1993). Vagus nerve tonus. *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, **116**: 566-568.

SOFIANOS, E., F. ALEVIZOU, N. ZISSIS, P. KOSTAKI y N. BALAMOUTSOS (1985). Hormonal response in thoracic surgery. Effects of high-dose fentanyl anesthesia, compared to halothane anesthesia. *Acta anaesthesiologica Belgica*, **36**: 89-96.

SOUBRIE, P., J.L. MONTSATRUC, S. BOURGOIN, T. REISINE, F. ARTAUD y J. GLOWINSKI (1981). In vivo evidence for GABAergic control of serotonin release in the cat substantia nigra. *European journal of pharmacology*, **69**: 483-488.

STEFFEY, E.P. y D. HOWLAND (1977). Isoflurane potency in the dog and cat. *American journal of veterinary research*, **38**: 1833-1836.

STEFFEY, E.P. (1995). Drugs acting on the central nervous system. En: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (ADAMS, H.R., ed.). Iowa State: University Press / Ames, pp 149-166.

STEFFEY, E.P. (1996). Inhalation anesthetics. En: *Veterinary Anesthesia* (Lumb & Jones) Williams & Wilkins, Baltimore, 3.^a ed. (1996), pp. 297-329.

STEFFEY, M.A., R.J. BROSANAN y E.P. STEFFEY (2003). Assessment of halothane and sevoflurane anesthesia in spontaneously breathing rats. *American journal of veterinary research*, **64**: 470-474.

STEGMANN, G.F. y R.S. JONES (1998). Perioperative plasma cortisol concentration in the horse. *Journal of the South African Veterinary Association*, **69**: 137-142.

STELZNER, J., K. REINHART, U. FOHRING, M. HENNEBERG, M. SCHAFFER y R. FITZNER (1988). Die Auswirkungen der thorakalen Periduralanalgesie auf die Kortisol- und Glukoseantwort bei Operationen an der abdominalen Aorta. [The effect of thoracic peridural analgesia on the cortisol and glucose response in surgery of the abdominal aorta]. *Regional anaesthesia*, **11**: 16-20.

SUGAI, M. (1996). Comparison of the effect of isoflurane and that of sevoflurane on hepatic circulation and oxygen metabolism during acute hypoxia in dogs. *Masui, The Japanese journal of anesthesiology*, **45**: 608-616.

SUMANO, H.S. y L. OCAMPO (1997). *Farmacología veterinaria*. Ed. McGraw-Hill. Interamericana. 2^a ed.

SUMIKAWA, K., T. MATSUMOTO, N. ISHIZAKA, H. NAGAI, Y. AMENOMORI y Y. AMAKATA (1982). Mechanism of the differential effects of halothane on nicotinic- and muscarinic-receptor-mediated responses of the dog adrenal medulla. *Anesthesiology*, **57**: 444-450.

SWANN, A.C. (2003). Neuroreceptor mechanisms of aggression and its treatment. *The journal of clinical psychiatry*, **64**: 26-35.

SZAFARCZYK, A., G. ALONSO, G. IXART, F. MALAVAL, J. NOUGUIER y I. ASSENMACHER (1980). Serotonergic system and circadian rhythms of ACTH and corticosterone in rats. *The American journal of physiology*, **239**: 482-489.

TAKEDA, S. T. TOMARU y Y. INADA (1998). Haemodynamic and catecholamine responses to calcitonin gene-related peptide during volatile anaesthesia. *Canadian journal of anaesthesia*, **45**: 1116-1122.

TANAKA, S., H. TSUCHIDA, K. NAKABAYASHI, S. SEKI y A. NAMIKI (1996). The effects of sevoflurane, isoflurane, halothane, and enflurane on hemodynamic responses during an inhaled induction of anesthesia via a mask in humans. *Anesthesia and analgesia*, **82**: 821-826.

TANDONNET, F., J.L. BOURGAIN, K. MCGEE, E. COMOY y J.T. BACHI (1991). Hemodynamic and catecholamine response to isoflurane versus droperidol in complement to fentanyl anaesthesia. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **35**: 123-128.

TAO, R., y S.B. AUERBACH (1994). Anesthetics block morphine-induced increases in serotonin release in rat CNS. *Synapse*, **18**: 307-314.

TAUBERGER, G., J. SCHULTE AM ESCH y W. STEINRINGER (1975). Der Einfluss kombinierter Narkosen mit Halothan und Neuroleptanalgesie auf die praeganglionare Sympathicusaktivitat, das Atemzentrum und den Kreislauf [The effects of combining halothane and neuroleptanalgesia on the preganglionic sympathetic activity, the respiratory centre and the circulation (author's transl)]. *Der Anaesthetist*, **24**: 491-495.

TAYLOR, P.M. (1987). Some aspects of the stress response to anaesthesia and surgery in the horse. PhD thesis, University of Cambridge.

TAYLOR, P.M. (1989). Equine stress responses to anaesthesia. *British journal of anaesthesia*, **63**: 702-709.

TAYLOR, P.M. (1990). The stress response to anaesthesia in ponies: barbiturate anaesthesia. *Equine veterinary journal*, **22**: 307-312.

TAYLOR, P.M. (1998,a). Endocrine and metabolic responses in sheep during halothane and pentobarbitone anaesthesia with dobutamine infusion. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **21**: 62-68.

TAYLOR, P.M. (1998,b). Endocrine and metabolic effects of hypotension or halothane inhalation in sheep anaesthetized with pentobarbital. *British journal of anaesthesia*, **80**: 208-212.

TAYLOR, P.M. (1998,c). Adrenocortical and metabolic responses to dobutamine infusion during halothane anaesthesia in ponies. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **21**: 282-287.

TAYLOR, P.M. (1998,d). Effects of surgery on endocrine and metabolic responses to anaesthesia in horses and ponies. *Research in veterinary science*, **64**: 133-140.

TAYLOR, P.M. (1998,e). Effects of hypercapnia on endocrine and metabolic responses to anaesthesia in ponies. *Research in veterinary science*, **65**: 41-46.

TAYLOR, P.M. (1999,a). Effects of hypertonic saline infusion on the adrenocortical response to thiopental-halothane anesthesia in sheep after premedication with acepromazine. *Veterinary surgery VS the official journal of the American College of Veterinary Surgeons*, **28**: 77-82.

TAYLOR, P.M. (1999,b). Effects of hypoxia on endocrine and metabolic responses to anaesthesia in ponies. *Research in veterinary science*, **66**: 39-44.

THOMPSON, S. y K. WAFFORD (2001). Mechanism of action of general anaesthetics - new information from molecular pharmacology. *Current opinion in pharmacology*, **1**: 78-83.

TIGHE, S.Q. y R.J. PETHYBRIDGE (1987). A comparison of halothane and trichloroethylene with isoflurane. A study of drawover air anaesthesia with the Triservice anaesthetic apparatus. *Anaesthesia*, **42**: 887-891.

TJURMINA, O.A., D.S. GOLDSTEIN, M. PALKOVITS y I.J. KOPIN (1999). Alpha2-adrenoceptor-mediated restraint of norepinephrine synthesis, release, and turnover during immobilization in rats. *Brain research*, **826**: 243-252.

TOHEI, A., T. TOMABECHI, M. MAMADA, M. AKAI, G. WATANABA y K. TAYA (1997). Effects of repeated ether stress on the hypothalamic-pituitary-testes axis in adult rats with special reference to inhibin secretion. *Journal of veterinary medical science*, **59**: 329-334.

TONNER, P.H. y K.W. MILLER (1992). Cholinergic receptors and anesthesia. *Anesthesiologie Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, **27**: 109-114.

TRAN, H.S., M.M. PUC, J.L.V. TRAN, A.J. DEL ROSSI y C.W. HEWITT (2001). A method of endoscopic endotracheal intubation in rabbits. *Laboratory animals*, **35**: 249-252.

TRAYNOR, C. y G.M. HALL (1981). Endocrine and metabolic changes during surgery: anaesthetic implications. *British journal of anaesthesia*, **53**: 153-160.

TRULSON, M.E. y T. CRISP (1984). Role of norepinephrine in regulating the activity of serotonin-containing dorsal raphe neurons. *Life sciences*, **35**: 511-515.

TURNER, D.A., A.J. SHRIBMAN, G. SMITH y K.J. ACHOLA (1986). Effect of halothane on cardiovascular and plasma catecholamine responses to tracheal intubation. *British journal of anaesthesia*, **58**: 1365-1370.

UDELSMAN, R., D.L. LORIAUX y G.P. CHROUSOS (1987). Responses of the hypothalamic-pituitary-adrenal and renin-angiotensin axes and the sympathetic system during controlled surgical and anesthetic stress. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, **64**: 986-994.

VACCARINO, A.L. y A.J. KASTIN (2000). Endogenous opiates:1999. *Peptides*, **21**: 1975-2034.

VALDÉS, M. y T. DE FLORES (1990). *Psicobiología del estrés*. Barcelona: Martínez Roca.

VAN DE BERG, A.A. y N.M. HONJOL (1993). Effects of heart rate, blood pressure and bronchomotor tone of halothane, enflurane and isoflurane in young fit patients. *Middle East journal of anaesthesiology*, **12**: 271-286.

VAN DE KAR, L.D. y M.L. BLAIR (1999). Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Frontiers in neuroendocrinology*, **20**:1-48.

WAKASUGI, M., K. HIROTA, S.H. ROTH y Y. ITO (1999). The effects of general anesthetics on excitatory and inhibitory synaptic transmission in the area XA1 of the rat hippocampus in vitro. *Anesthesia and analgesia*, **88**: 676-680.

WARREN, R.G. (1986). Anestesia de animales domésticos. Ed. Labor, S.A. 1ª Ed.

WATANABE, K., T. ARAI, M. AOKI, H. MORI y K. MORI (1993). Effects of halothane on the synthesis of neurotransmitter amino acids in mouse brain. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **37**: 706-709.

WATKINS, C.A., S.A. WARTELL y D.E. RANNELS (1983). Effect of halothane on metabolism of 5-hydroxytryptamine by rat lungs perfused in situ. *The biochemical journal*, **210**: 157-166.

WEISKOPF, R.B., M.A. MOORE, E.I. EGER, M. NOORANI, L. MCKAY, B. CHORTKOFF, P.S. HART y M. DAMASK (1994). Rapid increase in desflurane concentration is associated with greater transient cardiovascular stimulation than with rapid increase in isoflurane concentration in humans. *Anesthesiology*, **80**: 1035-1045.

WELCH, J.E., G.E. FARRAR, A.J. DUNN y D. SAPHIER (1993). Central 5-HT_{1A} receptors inhibit adrenocortical secretion. *Neuroendocrinology*, **57**: 272-281.

WELCH, J.E. y D. SAPHIER (1994). Central and peripheral mechanisms in the stimulation of adrenocortical secretion by the 5-hydroxytryptamine₂ agonist, (+)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **270**: 918-928.

WESTERGAARD, G.C., S.J. SUOMI, T.J. CHAVANNE, L. HOUSER, A. HURLEY, A. CLEVELAND, P.J. SNOY y J.D. HIGLEY (2003). Physiological correlates of aggression and impulsivity in free-ranging female primates. *Neuropsychopharmacology*, **28**: 1045-1055.

- WHELAN, G. y P.A. FLECKNELL (1992). The assessment of depth of anaesthesia in animals and man. *Laboratory animals*, **26**: 153-162.
- WHITEHAIR, K.J., E.P. STEFFEY, N.H. WILLITS y M.J. WOLINER (1993). Recovery of horses from inhalation anesthesia. *American journal of veterinary research*, **54**: 1693-1702.
- WINTERS, W.D. (1976). Effects of drugs on the electrical activity of the brain: anesthetics. *Annual review pharmacology and toxicology*, **16**: 413-426.
- YAMAUCHI, M., K. OMOTE, A. NAMIKI y J.G. COLLINS (2003). Inhibitory action of sensory transmission by inhalational anesthetics in the spinal cord. *Masui, The Japanese journal of anesthesiology*, **52**: 240-250.
- YANG, J.C., T.S. SIU, K.F. NG, Z. GONG, S.L. TSUI y J.S. WONG (2000). Combined effect of isoflurane and esmolol on sympathetic responses to tracheal intubation. *Acta anaesthesiologica Sinica*, **38**: 123-130.
- YASHIMA, N., A. WADA y F. IZUMI (1986). Halothane inhibits the cholinergic-receptor-mediated influx of calcium in primary culture of bovine adrenal medulla cells. *Anesthesiology*, **64**: 466-472.
- YLI-HANKALA, A., R. RANDELL, T. SEPPALA y L. LINDGREN (1993). Increases in hemodynamic variables and catecholamine levels after rapid increase in isoflurane concentration. *Anesthesiology*, **78**: 266-271.
- ZBINDEN, A.M., D.A. THOMSON, D.R. WESTENSKOW, F. FREI y J. MAERTENS (1988). Anaesthetic uptake and elimination: is there a difference between halothane and isoflurane in the dog?. *British journal of anaesthesia*, **60**: 395-401.
- ZELENA, D., D.T. KIEM, I. BARNA y G.B. MAKARA (1999). α 2-Adrenoreceptor subtypes regulate ACTH and β -endorphin secretions during stress in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, **24**: 333-343.
- ZHANG, Y., M.J. LASTER, E.I. EGER, C.R. STABERNACK y J.M. SONNER (2003). Blockade of 5-HT_{2A} receptors may mediate or modulate part of the immobility produced by inhaled anesthetics. *Anesthesia and analgesia*, **97**: 475-479.
- ZUBICKI, A., X. GOSTIN, D. MICLEA, B. RIOU, E. BUY, C. RICHER y P. CORIAT (1998). Comparison of the haemodynamic actions of desflurane/N₂O and isoflurane/N₂O anaesthesia in vascular surgical patients. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, **42**: 1057-1062.