

La mezcla anestésica Ketamina-Xilacina afecta la función ovárica e incide en el ciclo estral de la rata

MORÁN, José Luis^{1*}†, HANDAL, Anabella¹, DÍAZ, Alfonso² y PAVÓN, Selyna³

¹Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias

²Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

³Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Realística de México.

Recibido Enero 18, 2016; Aceptado Febrero 29, 2016

Resumen

Se estudiaron los efectos de la mezcla del anestésico-sedante Ketamina-Xilacina (K+X) para analizar sus efectos sobre la ovulación espontánea (OE) y el ciclo estral (CE) en ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV intactas y con CE regular de cuatro días (animales cíclicos: AC). A las 13:00 del proestro, un grupo de AC recibieron la dosis de K+X recomendada por la Universidad de Cornell para su uso en animales de laboratorio y se evaluaron sus efectos sobre la OE en la mañana del estro esperado. Otro grupo de AC recibieron media dosis de la misma mezcla K+X. Los efectos sedantes fueron 100% efectivos en todos los animales tratados; sin embargo, la dosis recomendada bloqueó la OE en todos los animales de este grupo pero la dosis media no la afectó (0/5 vs. 5/5, $p < 0.01$; prueba de probabilidad exacta de Fisher). Los resultados indican que la dosis de K+X recomendada por la Universidad de Cornell altera mecanismos neuroendocrinos y endocrinos que conducen a la OE, al afectar las señales neurales que llevan a la descarga preovulatoria de gonadotropinas y la secreción de estrógenos necesarios para su efecto *feedback positivo* al nivel central y regular la secreción de la GnRH.

Ketamina-Xilacina, Ciclo Estral, Ovulación Espontánea, Secreción de Gonadotropinas, Rata Hembra

Abstract

We studied the effects of mixture sedative-anesthetic Ketamine-Xilacine (K+X) to analyze its effects on spontaneous ovulation (SO) and the estrus cycle (EC) in intact CII-ZV female adult rats with regular EC-fourth days (cyclic animals: CA). At 13:00h in the proestrous day, a CA group was treated with Cornell's University recommended dosage of K+X and estimated its effects on SO in the morning of expected estrus day. Equally, other CA group was treated with half dosage of same K+X mixture. The sedative effects were effective at 100% in all treated animals; however, recommended dosage of K+X blocks SO in this experimental group but not in the group treated with half dosage (0/5 vs. 5/5, $p < 0.01$; Fisher's exact probability test). These results indicate that the mixture K+X of Cornell's University recommended dosage modifies the neuroendocrine and endocrine mechanisms lead ovulation, by disrupts the neural signs that lead to gonadotrophins preovulatory surge and estrogen secretion need for *positive feedback* into central regulatory circuits of GnRH hypothalamic secretion.

Ketamine-Xilacine, Estral Cycle, Spontaneous Ovulation, Gonadotrophin Secretion, Female Rat

Citación: MORÁN, José Luis, HANDAL, Anabella, DÍAZ, Alfonso y PAVÓN, Selyna. La mezcla anestésica Ketamina-Xilacina afecta la función ovárica e incide en el ciclo estral de la rata. Revista de Sistemas Experimentales. 2016, 3-6: 24-36.

*Correspondencia al Autor (Correo electrónico: moranperales@yahoo.com.mx)

†Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La pérdida de la sensibilidad dolorosa inducida por la utilización de fármacos anestésicos se denomina *anestesia* y es utilizada durante la realización de técnicas quirúrgicas que implican la remoción o abordaje de determinados tejidos corporales en los animales (Fish et al, 2008; Kohn et al, 1997; Vives et al, 1997). Existen anestésicos con diferentes potencias depresoras de la función nerviosa, pero invariablemente se utilizan para bloquear las señales dolorosas mediadas por los nervios que alcanzan los diferentes órganos y tejidos (López-Timoneda & Gasco, 2008; Marshall & Longnecker, 2010). En la actualidad, existen normas nacionales e internacionales que se recomiendan para los tratamientos quirúrgicos en animales de experimentación (roedores, lagomorfos, perros, gatos, porcinos y primates no-humanos), todas ellas aplicables bajo estrictos códigos de bioética y bienestar animal (NOM-062-ZOO-1999). Sin embargo, muchos estudios experimentales presentan un verdadero dilema entre lo bioético y la necesidad del avance en el conocimiento científico.

El presente trabajo aborda el estudio de una de las funciones reproductivas más esenciales como es la ovulación espontánea en la rata adulta ¿Cómo analizar un fenómeno crucial y estudiar sus mecanismos básicos si para estudiar la función de un órgano corporal se requiere de la aplicación de una técnica quirúrgica que causa lesión y dolor? Dado que todas las funciones del sistema endocrino requieren como mediador al sistema nervioso (Guyton & Hall, 2006), el estudio de la fisiología reproductiva de la hembra está forzosamente relacionada con la función neuroendocrina del hipotálamo como mediador de la descarga preovulatoria de las gonadotropinas, mismas que al actuar sobre las gónadas inducen el desarrollo folicular y la ovulación (Freeman, 2006; Guyton & Hall, 2006).

Por otra parte, existen numerosas pruebas experimentales que postulan que las funciones principales de los ovarios (la secreción de esteroides sexuales y la liberación de gametos viables) son moduladas por las señales nerviosas sensoriales y autonómicas que ingresan a la glándula por ramas nerviosas provenientes de diversos ganglios y plexos del Sistema Nervioso Periférico (Burden, 1985; Dissen et al, 1993; Lawrence & Burden; 1980; Mayerhofer et al, 1997; Strauss & Williams, 2009).

Las señales nerviosas en el control de las funciones endócrinas del ovario juegan un papel crítico y por tanto, el empleo de un anestésico acarrea el riesgo potencial de afectar indirectamente la secreción de gonadotropinas y así, la función ovárica ¿Qué hacer para estudiar el papel de estas señales nerviosas que inervan a los ovarios y que afectan su funcionamiento si tenemos que confrontar el compromiso ético del buen y mejor trato hacia nuestros animales de experimentación e infringir en ellos el menor dolor posible?

Existen evidencias claras que el efecto de anestésicos inyectables comunes como el pentobarbital sódico aplicado en la tarde del proestro, es capaz de bloquear la ovulación en la mañana del estro al inhibir la descarga hipotalámica de la GnRH y con ello suprimir el pico preovulatorio de las gonadotropinas que precede a la ovulación (Domínguez & Smith, 1974).

Por lo anterior, se decidió analizar hasta donde un anestésico no inhalable convencional puede ser utilizado en ratas adultas sabiendo que produzca alteraciones endocrinas, neuroendocrinas y/o neurales mínimas que no afecten los parámetros reproductivos fundamentales como son la secreción de gonadotropinas, la duración del ciclo estral y sobretodo, la ovulación espontánea en la rata de laboratorio.

En el presente estudio se buscó la dosis efectiva para inducir una anestesia y analgesia profunda que no afectara de modo crítico la ovulación espontánea en la rata adulta. Para ello, se probó un anestésico no inhalable como la mezcla de *Ketamina-Xilacina* que indujera una sedación profunda pero de duración no prolongada, en la dosis recomendada por la *Cornell University* (Gourdon J. CARE 101.01: Rodent Anesthesia, *Cornell University*, 2006) para realizar cirugías invasivas en roedores (Mason, 1997) y comparar este tiempo de sedación con el uso de la mitad de la dosis de la misma mezcla que no afecte la ovulación espontánea en ratas adultas.

Materiales y Métodos

Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV, con pesos corporales entre los 200 y 250 g y mantenidas en condiciones de iluminación controlada (14h Luz/ 10h Oscuridad; luces de las 05:00 a las 19:00 h) y libre acceso al agua y al alimento balanceado.

En todos los animales se realizaron frotis vaginales diariamente entre las 08:00 y 10:00 h, con el fin de detectar ratas con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro para asignarlos a los diferentes experimentos.

Preparación del anestésico. Para preparar 10 ml de una mezcla de anestésico se utilizaron 3.75 ml de *Ketamina* (100 mg/ml), 0.5 ml de *Xilacina* (100mg/ml) y 5.75 ml de solución salina (NaCl 0.9%).

Los animales de los diferentes grupos experimentales recibieron una dosis con 0.2 ml de la mezcla o la mitad de la dosis con 0.1 ml de la misma mezcla por cada 100 gramos de peso corporal vía intraperitoneal (i.p.).

Experimento 1. Evaluación de los efectos de la dosis recomendada de la mezcla de anestésico/sedante *Ketamina-Xilacina* sobre la duración del ciclo estral y la ovulación espontánea en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración. Luego de tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración, grupos de ocho animales con frotis vaginal característico del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro recibieron una única dosis completa de anestésico *Ketamina-Xilacina* (0.2 ml/100 gramos de p.c.; i.p) a las 13:00 h. Se registró el tiempo del efecto (latencia de inmovilidad) del anestésico hasta que el animal comenzó a moverse nuevamente.

Al día siguiente del tratamiento con la mezcla *Ketamina-Xilacina* se reanudó la toma de los frotis vaginales y cada grupo fue dividido en: 1) animales a los que se les aplicó eutanasia en la mañana del estro esperado o 2) animales a los que se les aplicó eutanasia hasta la mañana del siguiente estro vaginal observado. En este último grupo se analizó la duración del ciclo estral como estimador de la alteración en la secreción de gonadotropinas.

Experimento 2. Evaluación de los efectos de la mitad de la dosis de la mezcla de anestésico/sedante *Ketamina-Xilacina* sobre la duración del ciclo estral y la ovulación espontánea en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración. Luego de tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración, otros grupos de ocho animales con frotis vaginal característico del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro recibieron la mitad de la dosis del anestésico/sedante de *Ketamina-Xilacina* (0.1 ml/100 gramos de p.c.; i.p) a las 13:00 h. Se registró el tiempo del efecto (latencia de inmovilidad) del anestésico hasta que el animal comenzó a moverse nuevamente.

Al día siguiente del tratamiento con la mezcla Ketamina-Xilacina se reanudó la toma de los frotis vaginales y cada grupo fue dividido en: 1) animales a los que se les aplicó eutanasia en la mañana del estro esperado o 2) animales a los que se les aplicó eutanasia hasta la mañana del siguiente estro vaginal observado. En este último grupo se analizó la duración del ciclo estral como estimador de la alteración en la secreción de gonadotropinas.

Experimento 3. Reemplazo hormonal de las señales hipotalámica, adenohipofisiaria u ovárica sobre la capacidad ovulatoria inducida en los animales tratados con la combinación de anestésico/sedante Ketamina-Xilacina.

Luego de tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración, otros animales con frotis vaginal característico del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro que recibieron tratamiento con la dosis única de anestésico Ketamina-Xilacina a las 13:00 h. y presentaron signos de alteración en la duración del ciclo estral, fueron tomados como modelo para la realización del reemplazo hormonal.

Con base en los resultados de los Experimentos 1 o 2, tres grupos de cuatro animales con tratamiento de la dosis única de anestésico Ketamina – Xilacina a las 13:00 h recibieron una hora después (14:00 h.) el reemplazo hormonal de las señales hipotalámicas, adenohipofisiarias u ováricas, sobre la respuesta ovulatoria inducida:

Grupo I.- Tratamiento con GnRH [3.7 µg/ Kg, i.m]

Grupo II.- Tratamiento con hCG [5 ui, i.m.]

Grupo III.- Tratamiento con BE [BE; 10 µg i.m.]

Al día siguiente del tratamiento con la mezcla Ketamina-Xilacina más el reemplazo hormonal se reanudó la toma de los frotis vaginales y cada grupo fue dividido en: 1) animales a los que se les aplicó eutanasia en la mañana del estro esperado (animales que recibieron tratamiento con GnRH, hCG) o 2) animales a los que se les aplicó eutanasia la mañana del siguiente diestro-1 esperado (BE).

Eutanasia y Autopsia. Todos los animales fueron sacrificados por medio de una sobredosis con pentobarbital sódico (80mg/kg de peso; i.p.). A la autopsia se disecaron los oviductos, ovarios y útero; los oviductos fueron inspeccionados bajo estereomicroscopio en busca de los signos de ovulación (ovocitos liberados, en cuyo caso fueron contados). Los ovarios y el útero fueron pesados en balanza analítica con precisión de 0.1mg e inmediatamente colocados en solución de Böuin durante 24 horas para su posterior análisis histológico.

Análisis Histológico de los Ovarios. Todos los ovarios disecados de los animales fueron procesados para su inclusión en bloques de parafina y un análisis morfo-histológico que comprendió seis etapas (Luna, 1975):

1.-Fijación. Los ovarios fueron colocados en solución de Böuin por un periodo no mayor de 24 horas. Después los órganos se cambiaron a alcohol 70% por tiempo indefinido hasta la siguiente etapa.

2.-Deshidratación. La deshidratación se inició con el cambio de alcohol 70% a dos cambios consecutivos en alcohol 96% de una hora cada uno, seguidos de dos cambios en alcohol absoluto de una hora cada uno.

3.-Aclaramiento. Seguido de la deshidratación y con el fin de eliminar las trazas de alcohol, los órganos se colocaron en un primer cambio de cloroformo puro durante un periodo de 2 a 24 horas, al cabo de las cuales los ovarios fueron colocados en cloroformo puro durante un periodo de 2 horas.

4.-Inclusión en Parafina. En un horno de inclusión ajustado a 56-57°C, los ovarios fueron colocados en recipientes con parafina fundida durante un tiempo máximo de dos horas. Al cabo de este tiempo, cada órgano fue depositado en un bloque de parafina pre-solidificada. Cada bloque se dejó enfriar a temperatura ambiente por un periodo no menor de 24 horas.

5.- Corte Seriado. Utilizando un micrótomo de rotación RM-2125RT (LEICA Inc., USA), los bloques fueron cortados en serie a 10 µm de grosor y extendidos en baño de flotación a 45°C. Los cortes se colocaron en portaobjetos gelatinizados (Solución de gelatina para inclusión 3%) y numerados. Los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente en una cámara hermética de vapores de formol 37% durante 24 horas.

6.-Tinción y Montaje de los Cortes Histológicos. Los cortes fueron teñidos con la técnica de hematoxilina–eosina (Luna, 1975) y montados en resina sintética.

Los portaobjetos numerados permanecieron en una superficie plana dejándose secar a temperatura ambiente durante una semana. Al cabo de este periodo de secado, a cada portaobjetos se le eliminan los residuos de resina con un paño de algodón embebido con xilol.

Análisis de la Población Folicular del Ovario. Para el análisis de la población folicular se eligieron al azar los ovarios de tres animales de cada grupo experimental.

Se contó el número total de folículos con núcleo y nucleolo del ovocito bien definidos y que presentaran al menos dos capas de células de la granulosa en cada folículo. De estos, se registró la presencia o ausencia de antro.

Asimismo, en todos los folículos se registró la presencia o ausencia de los signos propios de atresia. De acuerdo a los criterios establecidos por Hsueh y colaboradores (1994), se consideró como folículo atrésico aquél que presentó una o más de las siguientes características:

- Presencia de tejido conjuntivo vascularizado.
- Localización excéntrica del núcleo del ovocito
- Granulación del núcleo y nucleolo del ovocito.
- Desprendimiento de las células de la granulosa en el antro.
- Engrosamiento (hipertrofia) de las capas de la teca.
- Teca interna separada de la membrana basal.
- Picnosis nuclear de las células de la granulosa.

Conteo de Cuerpos Lúteos Frescos. Con el fin de confirmar el número de ovocitos liberados en el día del sacrificio, se contó el número de cuerpos lúteos frescos en los ovarios de los animales. Las características que se tomaron en cuenta para considerar un cuerpo lúteo fresco fueron las siguientes:

- Extravasación central de sangre en el cuerpo lúteo.
- Presencia de cavidades rellenas de sangre.

- Presencia de poblaciones celulares heterogéneas: las células de la granulosa luteinizadas tienen formas poligonales, de aspecto pálido y pueden ser grandes ó chicas con núcleo y citoplasma bien definidos. Las células luteinizadas de la teca son más pequeñas que las del folículo.
- Tamaño del cuerpo lúteo fresco aproximadamente de tamaño similar a un folículo preovulatorio.

Análisis Estadístico. Los datos de número de ovocitos liberados, cuerpos lúteos y de los días de duración del ciclo estral fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguido por la prueba de Dunn o con la U de Mann-Whitney para comparar pares de medias. Los pesos relativos de los ovarios y del útero se analizaron por Análisis de Varianza Múltiple, seguido de la prueba de Tukey-Kramer. Las tasas de animales ovulantes, de estro vaginal, de diestro vaginal y de útero distendido serán analizadas por la prueba de Probabilidad Exacta de Fisher. En todos los casos, se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad sea igual o menor del 5 %.

Resultados

Independientemente de la dosis de anestésico sedante utilizada en los grupos experimentales, se observó diferencia en el efecto sedante, estimado como por el lapso en que el animal está absolutamente inmóvil y en posición decúbito lateral hasta que cambió a la posición decúbito dorsal, entre los grupos de animales tratado con la mezcla de anestésico-sedante Ketamina-Xilacina a las 13:00h del día del Proestro y que recibieron la dosis completa o media dosis (Dosis Completa: 209±5 minutos vs. Dosis Media: 165±3 minutos; $p < 0.01$, U de Mann-Whitney).

Experimento 1. Evaluación de los efectos de la dosis recomendada de la combinación de anestésico/sedante Ketamina-Xilacina sobre la duración del ciclo estral y la ovulación espontánea en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración.

La administración de la dosis combinada de Ketamina-Xilacina recomendada por la Universidad de Cornell que se suministró a cada animal de este experimento equivalen a 75 µg de Ketamina + 10 µg de Xilacina por cada 100 g de peso corporal, vía intraperitoneal (i.p.). Aparentemente, la administración de Ketamina pura (75µg/100 g peso corporal, i.m.) a las 13:00h del día del proestro en un grupo de animales cíclicos intactos no afectó la ovulación en la mañana siguiente (4/4) pero indujo la presencia de útero distendido en todos los casos (4/4).

En cambio, la administración de Xilacina pura (10µg/100 g peso corporal, i.m.) a las 13:00h del día del proestro inhibió relativamente la ovulación a la mañana siguiente (1/4) y presencia de útero distendido en todos los casos (4/4) (Tabla 1).

Con base en la apariencia del frotis vaginal en la mañana del sacrificio y en comparación con el grupo de animales intactos, la dosis recomendada de Ketamina-Xilacina (dosis completa) afectó significativamente la duración del ciclo estral (estimada por la presencia del estro vaginal) en el grupo de animales tratados a las 13:00 h del día del Diestro-1, sin afectar la presencia del estro vaginal en los animales tratados en los otros días del ciclo (Tabla 2).

Grupo	TAO	Ovocitos del Lado Izquierdo	Ovocitos del Lado Derecho	Total de Ovocitos Liberados	TUD
Control Absoluto	26/26	6.3 ± 0.3	5.4 ± 0.2	11.7 ± 0.3	4/26
Ketamina	4/4	6.6 ± 0.6	7.0 ± 0.6	13.6 ± 0.9	4/4 *
Xilacina	1/4 *	0	6	6	4/4 *

* p<0.001 comparado con el Control Absoluto (Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher).

Tabla 1 Tasas de animales ovulantes (TAO), de estro vaginal (TEV) y de útero distendido (TUD) que presentaron las ratas adultas con ciclo estral regular de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) al momento del sacrificio y media±e.e.m. del número de ovocitos liberados por los animales a los que se les administró la dosis recomendada de la mezcla de anestésico Xilacina y el sedante Ketamina (10 µg de Xilacina + 75 µg de Ketamina /100 g peso; i.p) a las 13:00 h en diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron en la mañana del estro esperado luego del tratamiento con la mezcla Ketamina-Xilacina

Grupo	TEV	TAO	Ovocitos del Lado Izquierdo	Ovocitos del Lado Derecho	Total de Ovocitos Liberados	TUD
Control Absoluto	26/26	26/26	6.3 ± 0.3	5.4 ± 0.2	11.7 ± 0.3	4/26
Estro	5/5	5/5	7.0 ± 0.7	5.6 ± 1.6	12.6 ± 2.0	3/5
Diestro-1	2/5**	2/5**	7.5 ± 0.5	6.0 ± 0.0	13.5 ± 0.5	5/5 *
Diestro-2	4/4	0/4 *	0	0	0	4/4 *
Proestro	5/5	0/5 *	0	0	0	4/5 *

* p<0.003 comparado con el Control Absoluto y el grupo tratado en el Día del Estro (Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher); **p<0.003 comparado con el Control Absoluto (Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher).

Tabla 2 Tasas de animales ovulantes (TAO), de estro vaginal (TEV) y de útero distendido (TUD) que presentaron las ratas adultas con ciclo estral regular de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) al momento del sacrificio y media±e.e.m. del número de ovocitos liberados por los animales a los que se les administró la dosis recomendada de la mezcla de anestésico Xilacina y el sedante Ketamina (10 µg de Xilacina + 75 µg de Ketamina /100 g peso; i.p) a las 13:00 h en diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron en la mañana del estro esperado luego del tratamiento con la mezcla Ketamina-Xilacina

El signo de la aparente ausencia del estro vaginal en el grupo tratado en el día del Diestro-1 es significativamente menor comparada con los grupos tratados con la dosis completa de Ketamina-Xilacina a las 13:00 h de los otros días del ciclo (Diestro-1: 2/5 vs. Otros Días: 14/14; p<0.01 Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher). De los cuatro grupos experimentales, solo los animales tratados con la dosis completa de Ketamina-Xilacina a las 13:00h del día del Estro ovularon en la mañana del estro esperado y liberaron una cuota normal de ovocitos comprado con el grupo control.

Se observó una caída significativa en la tasa de animales ovulantes en el grupo tratado con la mezcla de anestésico/sedante a las 13:00 h del Diestro-1, sin cambios en el número de ovocitos liberados respecto al grupo de animales intactos. Sin embargo, en los grupos de animales tratados a las 13:00 h del día del Diestro-2 o Proestro se observó la ausencia absoluta de ovulación en la mañana del estro esperado aunque el 100% de los animales presentó el signo de estro vaginal (Tabla 2).

En los diferentes grupos tratados con la dosis completa de la mezcla de anestésico/sedante se observó una notable presencia del signo de útero distendido (Ketamina-Xilacina: 16/19 vs. Control Absoluto: 4/26, p>0.0001; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher). Sin embargo, este signo es significativamente mayor solo en los grupos tratados en los días del Diestro-1, Diestro-2 y Proestro, respecto al grupo de animales tratados con Ketamina-Xilacina en el día del Estro (Estro: 3/5 vs. Otros Días: 13/14, p<0.04; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher) (Tabla 2).

El análisis histológico de los ovarios de los animales que recibieron la dosis completa de la mezcla Ketamina-Xilacina en el grupo tratado en la tarde del proestro y sacrificado en la mañana siguiente (estro esperado), mostró un gran número de folículos grandes con apreciables signos de atresia, presencia de folículos pequeños sin antro y una población de cuerpos lúteos viejos.

Experimento 2. Evaluación de los efectos de la mitad de la dosis de la mezcla de anestésico/sedante Ketamina-Xilacina sobre la duración del ciclo estral y la ovulación espontánea en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración.

La administración de la mitad de la dosis recomendada por la Cornell University de la mezcla Ketamina-Xilacina que se suministró a cada animal del presente experimento equivalen a 37.5 µg de Ketamina + 5 µg de Xilacina por cada 100 g de peso corporal, vía intraperitoneal (i.p.). Con excepción del grupo de animales tratados a las 13:00 h del Diestro-1, la mitad de la dosis de la mezcla de sedantes/anestésicos Ketamina-Xilacina no afectó la duración del ciclo estral ni la ovulación espontánea en los grupos tratados en el día del Estro, Diestro-2 o del Proestro, pese a que el 100% de los animales de este último grupo presentó el signo de distención uterina.

Al igual que en el Experimento No. 1, el tratamiento con la mezcla del sedante/anestésico a las 13:00 h del Diestro-1 indujo una caída significativa en la tasa de animales ovulantes (Tabla 3).

El número de ovocitos liberados en el grupo de animales tratados con la mitad de la dosis recomendada de Ketamina-Xilacina a las 13:00 h del día del Proestro fue relativamente mayor respecto al grupo de animales intactos, acompañado de la presencia de útero distendido en el 100% de los animales (Tabla 3).

El análisis histológico de los ovarios de los animales que recibieron la dosis media de la mezcla Ketamina-Xilacina en el grupo tratado en la tarde del proestro y sacrificado en la mañana siguiente (estro esperado), se observaron claros signos de ovulación revelado por la presencia de cuerpos lúteos frescos, acompañados de una población heterogénea de folículos medianos y pequeños.

Grupo	TEV	TAO	Ovocitos del Lado Izquierdo	Ovocitos del Lado Derecho	Total de Ovocitos	TUD
Control Absoluto	26/26	26/26	6.3 ± 0.3	5.4 ± 0.2	11.7 ± 0.3	4/26
Estro	10/11	9/11	6.7 ± 0.8	7.0 ± 0.7	13.7 ± 0.5	2/11
Diestro-1	6/9*	4/9*	7.2 ± 1.1	6.2 ± 0.2	13.5 ± 1.3	4/9
Diestro-2	7/8	7/8	6.7 ± 0.6	6.0 ± 0.7	12.7 ± 0.5	1/8
Proestro	5/5	5/5	7.4 ± 0.7	6.2 ± 0.4	13.6 ± 0.5**	5/5*

* p<0.05 comparado con el Control Absoluto y el grupo tratado en el Día del Estro (Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher); **p<0.0001 comparado con el Control Absoluto (U de Mann-Whitney).

Tabla 3 Tasas de animales ovulantes (TAO), de estro vaginal (TEV) y de útero distendido (TUD) que presentaron las ratas adultas con ciclo estral regular de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) al momento del sacrificio y media±e.e.m. del número de ovocitos liberados por los animales a los que se les administró la dosis media de la mezcla de anestésico Xilacina y el sedante Ketamina (5µg de Xilacina + 37.5 µg de Ketamina /100 g peso; i.p) a las 13:00 h en diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron en la mañana del estro esperado luego del tratamiento con la mezcla Ketamina-Xilacina

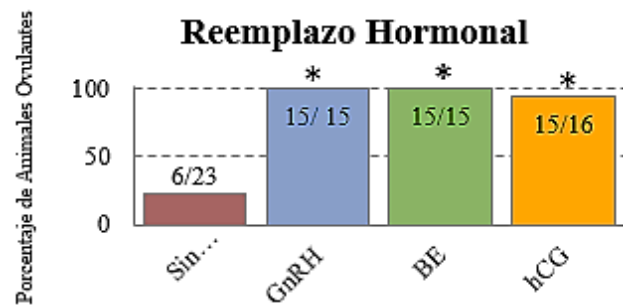


Gráfico 1 Efecto del reemplazo hormonal sobre el porcentaje de ovulación en los animales tratados con la dosis completa de la mezcla de anestésico Xilacina y el sedante Ketamina (i.p) a las 13:00 h del proestro vaginal. Una hora después (14:00 h), grupos de animales fueron tratados con: 1) GnRH [3.7 µg/ Kg, i.m], 2) benzoato de estradiol [BE; 10 µg i.m.], 3) hCG [5 ui, i.m.]. En los grupos tratados con GnRH o hCG, la autopsia se realizó entre las 09:00 y 10:00h del día del estro esperado; en cambio en los grupos tratados con BE, la autopsia se realizó entre las 09:00 y 10:00h en la mañana del diestro-1 esperado (* p<0.001 comparado con el grupo sin tratamiento hormonal; prueba de Probabilidad Exacta de Fisher)

Grupo	Reemplazo Hormonal Con:	TAO	Ovocitos del Lado Izquierdo	Ovocitos del Lado Derecho	Total de Ovocitos Liberados	TUD
Diestro-1 DM	GnRH	4/4	7.0±0.7	7.0±0.2	14.0±1.2	4/4
Diestro-1 DC	GnRH	4/4	6.7±1.0	7.5±0.3	14.2±0.7	4/4
Diestro-2 DC	GnRH	4/4	5.7±1.3	8.7±0.6	14.4±1.3	4/4
Proestro DC	GnRH	3/3	7.0±1.5	4.6±0.3	11.6±1.4	1/3
Diestro-1 DM	hCG	4/4	5.2±1.4	5.7±1.2	10.9±2.0	4/4
Diestro-1 DC	hCG	4/4	4.3±1.9	7.8±1.9	12.1±1.3	4/4
Diestro-2 DC	hCG	4/4	5.8±0.9	5.0±0.8	10.8±1.3	4/4
Proestro DC	hCG	3/4	4.7±0.3	6.3±0.3	11.0±0.6	0/4*
Diestro-1 DM	BE	4/4	5.2±0.8	3.7±0.2	8.9±0.8	4/4
Diestro-1 DC	BE	4/4	5.7±1.2	4.0±0.6	9.7±0.9	4/4
Diestro-2 DC	BE	4/4	6.2±0.5	6.2±0.5	12.4±0.3	4/4
Proestro DC	BE	3/3	4.0±1.1	4.0±0.6	8.0±1.7	0/3*

* $p < 0.03$ comparado contra los grupos tratados en Diestro-1 y Diestro-2 (Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher)

Tabla 4 Tasas de animales ovulantes (TAO) y de útero distendido (TUD) y media±e.e.m. del número de ovocitos liberados por los animales a los que se les administró la dosis media (DM) a las 13:00 h del Diestro-1 y la dosis completa (DC) a las 13:00 h del Diestro-1, Diestro-2 o Proestro de la mezcla de anestésico/sedante Xilacina-Ketamina (i.p) seguido del reemplazo hormonal con GnRH (3.7 µg/kg de peso corporal; i.m.), hCG (5 ui; i.m.) o BE (Benzoato de Estradiol; 10µg/animal; i.m.). Todos los animales se sacrificaron en la mañana del estro esperado luego del tratamiento con la mezcla Ketamina-Xilacina y el reemplazo hormonal

Experimento 3. Evaluación de los efectos del reemplazo hormonal de las señales hipotalámica, adenohipofisiaria u ovárica sobre la capacidad ovulatoria inducida en los animales tratados con la mezcla de anestésico/sedante Ketamina-Xilacina.

El reemplazo de las señales hipotalámica, adenohipofisiaria u ovárica restableció la ovulación en prácticamente todos los grupos que presentaron fallas en la ovulación por el tratamiento con la mezcla de anestésico/sedante Ketamina-Xilacina (Con Reemplazo Hormonal: 45/46 vs. Sin Reemplazo Hormonal: 6/23; $p < 0.0001$, Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher) (Gráfico 1; Tabla 4).

La frecuencia de útero distendido entre los grupos con reemplazo hormonal fue significativamente baja en los animales tratados en la tarde del proestro (Diestro-1 + Diestro-2: 36/36 vs. Proestro: 1/10, 0.001; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher).

Discusión

Los resultados del presente estudio muestran claramente que la interrupción de las señales nerviosas inducida por la administración de la dosis recomendada por la Universidad de Cornell de la mezcla de los fármacos sedantes/anestésicos Ketamina-Xilacina altera los mecanismos endócrinos y neuroendócrinos que controlan el ciclo estral y la secreción de gonadotropinas, lo que aparentemente depende de la dosis de la mezcla de los sedantes/anestésicos utilizados en el estudio e incluso del día del ciclo en que es administrado.

La Ketamina es considerada un anestésico disociativo que actúa inhibiendo el movimiento y el dolor de modo muy efectivo, sin embargo, su empleo como anestésico puro no es recomendable para la rata (Shibutani, 2000; Svendsen, 1994), ya que sus efectos colaterales pueden resultar en alteraciones indeseadas sobre la actividad cardíaca y múltiples cambios autonómicos. Como pre-anestésico es ampliamente utilizado en la clínica de pequeñas especies y en los animales del presente trabajo su empleo como anestésico-sedante puro no mostró alteraciones en la ovulación espontánea ni el número de ovocito liberados.

La Xilacina es el sedante más común empleado en la medicina veterinaria y en los animales de laboratorio (Shibutani, 2000), pero se han descrito efectos adversos en la rata desde hace más de cuarenta años (Green, 1975). En dosis recomendadas para su uso veterinario en la rata produce una sedación profunda pero acompañada de efectos colaterales de difícil manejo y que pueden ocasionar la muerte por hipotermia.

El grupo control tratado con Xilacina pura resultó en la inhibición absoluta del pico preovulatorio de la GnRH y de las gonadotropinas, lo cual confirma graves alteraciones en el funcionamiento y control que el sistema nervioso autónomo debe desempeñar para garantizar la supervivencia.

Aunque no reportamos la tasa de mortalidad en los animales tratados con la mezcla de Ketamina-Xilacina del presente trabajo y que por descuido inicial no se colocaron en un ambiente tibio, el índice de mortalidad fue superior al 70%. Esta letalidad es muy probablemente atribuible a la Xilacina ya que la hipotermia es uno de sus efectos colaterales más notables y que suele ocasionar falla cardiorrespiratoria.

Con base en lo anterior, se recomienda utilizarla en dosis perfectamente calculadas y tomando en cuenta el índice de grasa corporal para evitar sobredosificaciones. También es recomendable el monitoreo permanente en los animales bajo sus efectos hasta que los animales puedan moverse nuevamente.

Independientemente de la dosis utilizada de la mezcla de Ketamina-Xilacina, el periodo de sedación profunda se mantuvo casi por 190 minutos. De no vigilar esta condición, es altamente probable que los casos de hipotermia fatal se incrementen considerablemente.

En los grupos control tratados con Ketamina pura o Xilacina pura, mostraron alteraciones en la secreción de estrógenos ya que la tasa de útero distendido en la mañana del estro esperado fue del 100% en ambos grupos.

Este resultado apoya la hipótesis general de nuestro grupo de trabajo y que postula que las funciones endócrinas están bajo la influencia del sistema nervioso autónomo.

Cualquier alteración de la calidad en la información nerviosa, necesariamente incide en el control del funcionamiento de glándulas y efectores, que en nuestro caso pueden ocasionar falla en los mecanismos que controlan la ovulación espontánea en la rata (Cruz et al, 1986; Cruz et al, 1989, Cruz et al, 1992; Chávez & Domínguez, 1994; Domínguez & Smith, 1974; Domínguez et al, 1985; Domínguez et al, 1989).

La dosis recomendada de la mezcla con Ketamina-Xilacina por la Universidad de Cornell tuvo efectos sobre la capacidad del sistema para lograr la ovulación exitosa que dependieron del día del ciclo estral en que los animales fueron tratados con la mezcla de anestésico-sedante.

Aparentemente, solo los animales tratados en el día del Estro lograron ovular normalmente (5/5) pero aquellos tratados en los otros días del ciclo estral fueron prácticamente ineficaces en lograr la ovulación (2/14) y todos estos presentaron signos de útero distendido (14/14).

Pese a lo anterior, el uso de la dosis media de la mezcla de Ketamina-Xilacina produjo efectos diferentes que dependieron del día del ciclo estral en que se realizó la sedación.

Con excepción de los grupos tratados en el día del Diestro-1, hubo una notable recuperación del signo de ovulación espontánea (21/24) y no se observaron cambios en el número de ovocitos liberados entre los grupos tratados con la mezcla de sedante-anestésico. Sin embargo, queda analizar porqué en el día del Diestro-1 el sistema no logra recuperar la capacidad ovulatoria independientemente de la dosis de Ketamina-Xilacina que hayan recibido (Tasa de Animales Ovulantes en los grupos tratados en Diestro-1: 6/14).

Por otra parte, resulta de particular interés que el empleo de la dosis completa de la mezcla de sedante-anestésico Ketamina-Xilacina en los animales, ellos hayan presentado el signo de estro vaginal acompañado de la presencia de ovocitos ocurre únicamente en el grupo tratado a las 13:00 h del día del Estro, pero que esto no haya ocurrido con los animales tratados en los días del Diestro-2 y del Proestro, a pesar de que todos ellos muestren el signo de estro vaginal pero con ausencia de ovocitos en los oviductos.

Finalmente, las fallas en la ovulación espontánea en los grupos tratados con la mezcla del sedante- anestésico son el resultado de la alteración de las señales ováricas que regulan la actividad del eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario, ya que el reemplazo hormonal con estrógenos indujo la ovulación en el 100% de los casos. La falta de esta señal ovárica, ocasiona la ausencia de la señal hipotalámica y en consecuencia, la ausencia de gonadotropinas en los animales sedados con la mezcla de Ketamina-Xilacina.

Conclusiones

Los resultados del presente estudio muestran que la dosis recomendada de la mezcla anestésica Ketamina+Xilacina para uso veterinario altera los mecanismos neuroendocrinos y endocrinos que conducen a la ovulación, por interrumpir las señales nerviosas que condicionan la secreción pre-ovulatoria de las gonadotropinas y la secreción de estrógenos necesaria para su efecto *feedback positivo* en los centros neurales que regulan la secreción de la GnRH. Además, la utilización de la mitad de la dosis recomendada de la mezcla Ketamina+Xilacina es adecuada para inducir una sedación profunda de más de 180 minutos bajo la cual podría emplearse una técnica quirúrgica común.

Agradecimientos

Agradecemos al MVZ Carlos Escamilla Weinmann, director del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a todo su personal, su muy apreciable apoyo en el suministro y alojamiento de los animales de experimentación utilizados en el presente trabajo.

Referencias

- Burden, H. W. (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: Catecholamines As Hormone Regulators. Eds. N. Ben Jonathan, J.M. Bahr & R.I. Weiner. Sero Symposia Publications. Raven Press. New York, pp. 262-278
- Cruz, M. E., J. Castro & R. Domínguez (1992). A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *J Endocrinol* 133: 205-210.
- Cruz, M. E., L. P. Jaramillo & R. Dominguez (1989). Asymmetric Ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J Endocrinol* 123: 437-439.
- Cruz, M. E., R. Chavez & R. Domínguez (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adults rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Rev. Inv. Clin.* 38:167-171.
- Dissen, G.A., W.L. Dees & S.R. Ojeda (1993). Neuronal and neurotrophic control of ovarian development. En: *The Ovary*. Eds. E.Y. Adashi & P.C.K. Leung. Raven Press. New York, pp 1-19

Domínguez R & E.R. Smith (1974). Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology* 14:212-223

Domínguez, R., L. Riboni, D. Zipitria & R. Revilla (1985). Differences in the ability of reserpine and chlorpromazine to block ovulation throughout the oestrous cycle of the rat. *J Interdis Cycle Res* 16: 285-294.

Domínguez, R., M. E. Cruz & R. Chavez (1989). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En "Growth Factors and the Ovary". Eds. A. N. Hirshfield. Plenum Press, New York. pp 321-325.

Fish R.E., Brown M.J., Danneman P.J. & Karas A.Z. (2008). Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. En: American College of Laboratory Animal Medicine series. USA. Chapter 10 Anesthesia and Analgesia for Laboratory Rodents. Pgs. 239-268. Chapter Ethical Issues in Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animal. Pags. 561-567.

Freeman, M.E. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Reproductive Processes and Their Control. 3th Edition. Volume 2. Chapter 43. Editor in Chief J. D. Neill. Elsevier Academic Press. London. Pags. 2327-2387.

Gourdon J. (2006). Rodent Anesthesia. CARE 101.01. Cornell Center for Animal Resources an Education. Cornell University.

Green, C.J. (1975). Neuroleptanalgesic drug combinations in the anaesthetic management of small laboratory animals. *Laboratory Animals* 9(3): 161-178

Guyton A.C. & J.E. Hall (2006). Pituitary hormones and their control by the hypothalamus. En: "Textbook of Medical Physiology". 11th Edition. Eds. A.C. Guyton and J.E. Hall. Unit XIV. Chapters 74, 75 and 81. Elsevier Saunders. Philadelphia Pag. 918-929

Hsueh, A. J. W. H. Billig & A. Tsafriiri (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Rev* 15:707-724.

Kohn, D.F., Benson, G.J., Wixson, S.K., White, W.J. (1997), *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*; Academic Press, New York; Chapter 15.

Lawrence, L. E. & H. W. Burden (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anatomical Records* 196:51-59.

Luna, L.G. (1975). Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Phatology. McGraw-Hill Book Company. New York. pp. 21 y 52.

López-Timoneda F. & Gasco, M. C. (2008). Fármacos Anestésicos Generales. En: Velazquez: Farmacología Básica y Clínica. 18ª. Edición. Capítulo 13. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. Pags. 229-242.

Marshall, B.E & D.E. Longnecker (2010). Anestésicos Generales. En: Goodman-Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica. 9ª. Edición. Tomo 1, Sección III. Editorial McGraw-Hill/Interamericana, México. 327-351.

Mason, D.E. (1997). Anesthesia, analgesia, and sedation for small mammals. En: "Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery". Eds. E.V. Hiller E.V. & K.E. Quesenberry W.B. Saunders Company. Philadelphia. Pp. 378-391

Mayerhofer, A., G.A. Dissen, M.E Costa & S.R. Ojeda (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 178: 3320-3329

NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Senasica, Dirección General de Salud Animal. SAGARPA.

Shibutani M. (2000). Anesthesia, Artificial Ventilation and Perfusion Fixation. En: *The Laboratory Rat. The Handbook of experimental animals*. Edit. Academic Press, pp 512-521.

Svendsen, P. (1994). In Svendsen, P. and Hau, J. Eds *Handbook of Laboratory Animal Science, Vol 1, Selection and Handling of Animals in Biomedical Research*, pp, 311-337. Boca Raton: CRC Press

Vives M.A., M. T. Higuera y A. Leuza. (1997). Antecedentes históricos de la anestesia veterinaria. En: *Anestesia Práctica de Pequeños Animales*, eds. L.J. Esquerro Calvo, M.A. Vives Valles & J. Uson Gargallo. McGraw-Hill / Interamericana. Madrid. Pags. 1-14.