

ROEDORES

Anestesia en el Animal de Laboratorio. Parte 2

Centro de Investigación. Hospital General Universitario de Valencia

Este capítulo es una continuación de la línea que iniciamos en el Suplemento 4, sobre anestesia en los animales de laboratorio. Después de haber dado unas nociones generales sobre los distintos fármacos y la anestesia en el conejo, ahora abordaremos los roedores que más se utilizan en experimentación, exponiendo de cada especie las posibles opciones para la inducción de la anestesia. Hemos ido recogiendo de la distinta bibliografía todos los métodos existentes especificando ventajas e inconvenientes, pero sin resaltar ninguno en particular que quedará en el juicio particular de cada experimentador.

COBAYA

Examen físico. Se recomienda un examen físico completo del animal antes de comenzar. Los promedios de temperatura, pulso y respiración deben ser de 38 °C, 280 pulsaciones/min y 90 respiraciones/min, respectivamente.

Suministro de alimento y agua. Generalmente en el caso de la utilización de éter, debe retirarse la comida durante al menos 12 h, antes de la inducción. Para la anestesia por barbitúrico no es necesario el ayuno. Si no existen instrucciones al contrario, puede suministrarse agua *ad libitum*.

Sujeción. Para sujetar incluso al animal más activo, se le coge con firmeza desde detrás, rodeando el área cervical con los dedos índice y pulgar. Los dedos restantes deben estar detrás de las patas delanteras y deben usarse para sujeción y apoyo. Este método es suficiente tanto para administración de un agente de anestesia por vía parenteral como por inhalación.

Método Físico

Hipnosis (preanestesia)

La hipnosis puede utilizarse en los cobayas de la misma forma que en los conejos. La reserpina facilita el comienzo del estado hipnótico debido a una disminución en la reacción del animal al estímulo externo.

Métodos Parenterales

Para la administración parenteral de los fármacos se utiliza una jeringuilla hipodérmica de 1 ml o una de 2-3 ml, acoplada a una aguja hipodérmica de 2.5 cm, del calibre 22-20.

Lugar de inyección:

- Subcutánea. En la punta del hombro.
- Intraperitoneal. Se introduce la aguja hipodérmica lateralmente a la línea media, próxima al vértice de la vejiga y distal al hígado y al estómago.
- Intramuscular. En la parte lateral de las patas traseras.

Vía intravenosa o intraperitoneal - Pentobarbital Sódico o Hexobarbital Sódico (anestesia)

El pentobarbital (25-40 mg/kg) puede administrarse intravenosamente, pero es más conveniente la ruta intraperitoneal. El mantener el animal cabeza-abajo ayuda a evitar la inyección errónea en uno de los órganos abdominales. Se ha observado que el 20% de las inyecciones peritoneales en los cobayas se hacen en los órganos abdominales en vez de la cavidad peritoneal y algunos animales tardan 12 h en recuperarse. El nivel de anestesia después de la inyección intraperitoneal de 40 mg/kg de pentobarbital puede ser imposible de pronosticar y algunos animales requieren un suplemento de morfina (1/16 - 1/18 g sc) mientras otros animales sufren una severa depresión y requieren un analéptico antes de la realización de la traqueotomía, aplicándoles un respirador y administrándoles oxígeno.

Normalmente, la anestesia quirúrgica actúa en 15 min y tiene una duración de una hora o más. Se ha atribuido una mortalidad del 13% a la anestesia por pentobarbital en los cobayas. La dosis letal de pentobarbital sódico que provoca paro respiratorio en los cobayas, varía de 45 a 70 mg/kg la cual es aproximadamente el doble de la dosis para la anestesia. Los cobayas jóvenes son menos sensibles a los efectos depresivos del pentobarbital que los animales mayores. Si un cobaya empieza a recuperarse del pentobarbital, puede administrarse éter, halotano o metoxiflurano con máscara o cono. El potente efecto parasimpático de los barbitúricos ayuda a disminuir la secreción de las mucosas y glándulas salivares con anterioridad a la administración del éter o halotano.

Vía intramuscular y subcutánea - Sulfato de Atropina (preanestesia)

La inyección subcutánea de atropina (0.1-0.2 mg/kg) puede ser conveniente para controlar la salivación y las secreciones respiratorias. Se administra 30 min antes de la administración de anestésicos inhalantes tales como el éter, pero se ha observado que, debido a la hipertensión, la atro-

pina puede aumentar la hemorragia durante la intervención. Las dosis recomendadas de atropina para los cobayas son mayores que para otras especies. Las dosis tóxicas de atropina dilatan los vasos cutáneos en ciertos lechos vasculares. Se ha descrito que el cobaya puede experimentar un espasmo laríngeo si se le expone al éter en una cámara de anestesia sin premedicación con atropina.

Vía intramuscular y subcutánea - Fentanil-Droperidol (Innovar-Vet) (preanestesia, anestesia y analgesia)

La administración de una combinación de droperidol (20 mg/ml) y fentanil (0.4 mg/ml) en la cantidad de 0.66 ml/kg proporciona una anestesia adecuada para una laparotomía, mientras que la enucleación del ojo puede realizarse utilizando una dosis de 0.88 ml/kg. Los animales no pueden incorporarse en esta última dosis, hasta pasados 120 min. La dosis letal es de aproximadamente 4.4 ml/kg, dosis menores (0.08 ml/kg im) de estas combinaciones se utilizan para procedimientos menores. Además de la muerte, se produce cojera y la automutilación en el lugar de la inyección intramuscular en el 33% de los animales que recibieron 0.88 ml/kg, por lo tanto se ha llegado a la conclusión de que esta dosis no debe utilizarse en los cobayas.

Vía intramuscular - Hidroclorato de Ketamina e Hidroclorato de Xilacina (preanestesia, anestesia)

La administración intramuscular de ketamina (44 mg/kg) produce una anestesia adecuada para los procedimientos quirúrgicos menores, de una duración de 15-25 min con la recuperación de los animales en un período de 30-45 min. Es necesaria la administración de atropina para inhibir la salivación. Las dosis recomendadas varían de una dosis mínima de 22 mg/kg como sedante, hasta 250 mg/kg para la anestesia. La ketamina es menos efectiva en los cobayas que en los monos, gatos y otros animales debido a que producen una analgesia pobre aún después de dosis altas (200-250 mg/kg). La ketamina no debe utilizarse como único agente anestésico en procedimientos de cirugía mayor como la cirugía ortopédica que se asocian con un proceso de notable dolor.

Vía intramuscular, subcutánea e intraperitoneal- Hidroclorato de Meperidina (preanestesia y analgesia)

La meperidina (2 mg/kg im) es de utilidad como analgésico o preanestesia antes de la administración de pentobarbital (30 mg/kg im). En este caso, la duración del efecto se aumenta considerablemente.

Métodos por Inhalación

Cámara de anestesia- Bióxido de Carbono (anestesia)

El bióxido de carbono se utiliza para proporcionar períodos cortos de anestesia con el objeto de extraer sangre del corazón, poner inyecciones o realizar diagnósticos cortos. La anestesia general tarda aproximadamente de 10 a 20 s y dura unos 45 s; aumenta el rendimiento de sangre del cobaya que se está desangrando. En un grupo de 1460 cobayas que se anestesiaron por este método, sólo hubo una muerte. Otra ventaja es que la sangre extraída de ani-

males bajo los efectos de la anestesia de CO₂ no contiene ningún contaminante químico que pudiera interferir en los procedimientos de laboratorio posteriores. La inmovilización producida por la exposición al bióxido de carbono puede suplirse con otras anestésicas intravenosas o inhalatorias.

Máscara, cono o cámara de anestesia, o ruta endotraqueal - Eter, Halotano, Metoxiflurano, (anestesia)

El éter puede administrarse con efectividad para los procedimientos de larga o corta duración, o puede utilizarse para potenciar los efectos de la anestesia por pentobarbital, peroero hay que tener en cuenta las complicaciones respiratorias que ocasiona. Debe retirarse la comida durante 12 h y los ojos deben estar protegidos con una pomada oftalmológica.

Con la utilización del éter, inicialmente el animal empezará a torcerse "en protesta" y entonces se tranquilizará durante 5 ó 7 min para volver a torcerse; no deben confundirse estos movimientos con una disminución del nivel de la anestesia. Tal suposición podría dar como resultado la administración de una sobredosis que causaría una fatalidad irreversible. Durante la inducción temprana, los reflejos de la extremidad tienen muy poco significado en la determinación del nivel de anestesia. Para evitar la eventración del contenido abdominal, se debe esperar hasta que el animal cese de torcerse o moverse y hasta que la respiración se regularice antes de entrar en la cavidad peritoneal. Una dosis inicial de sulfato de atropina quizás evite la dehiscencia.

Se recomienda la administración de sulfato de atropina (0.1-0.2 mg/kg) antes de la exposición al éter, lo cual estimula una secreción copiosa de la mucosa bucal y nasofaríngea en esta especie. Se cree que esta secreción contribuye a los problemas respiratorios posteriores. Se ha atribuido una mortalidad del 8% a la anestesia por éter en el cobaya.

La necesidad de administrar atropina es menor antes de usar el halotano e inexistente para la utilización de metoxiflurano, puesto que este agente no causa una salivación excesiva. Se sugiere el uso de un cono nasal para metoxiflurano, debido a su baja volatilidad. Ocasionalmente, se producen movimientos de "retorcimiento" en los animales. Primero, una de las patas traseras inicia un movimiento ondulado que puede extenderse al resto del cuerpo; esto no significa que se recupere el conocimiento, ni tampoco hace falta una cantidad superior de anestesia. El aumento de la concentración de la anestesia podría provocar un paro respiratorio, lo cual sin ventilación artificial, va seguido rápidamente por un paro cardíaco. Se ha observado que la premedicación con sulfato de atropina reduce la incidencia de movimientos de ondulación. La inducción es lenta, o sea, de 4-8 min con metoxiflurano. Puede rebajarse el tiempo de inducción con la administración inicial de CO₂, pero esto presenta riesgos para el animal. Las concentraciones de 3.0 a 3.5% de metoxiflurano pueden necesitar de 20 a 30 min para anestesiarse los cobayas, pero el uso de metoxiflurano sólo tiene una mortalidad del 2%.

La tráquea del cobaya es relativamente pequeña y de difícil acceso, puede realizarse la intubación endotraqueal, y manteniendo a los cobayas bajo anestesia controlada con metoxiflurano durante 4-6 h. Se han utilizado una variedad de sistemas abiertos, semi-cerrados y cerrados con o sin un tubo endotraqueal o traqueostomía. Las necesidades de oxígeno del animal deben considerarse con todos los sistemas, así como la baja volatilidad del metoxiflurano a temperatura ambiente. Los cobayas suelen recuperarse del metoxiflurano en 30-90 min después del cese de la anestesia. La nefrotoxicidad que se asocia al uso de metoxiflurano en el hombre no se ha observado en el cobaya.

El halotano es efectivo en los cobayas con una concentración de inducción del 3 al 5% y mantenimiento del 0.75 al 1.50%. La necrosis hepática se produce con la administración repetida de halotano a los cobayas.

HAMSTER

Examen físico. La temperatura, pulso y respiración normal de los hámsters deben ser 37 °C, 101 pulsaciones/min y 74 respiraciones/min, respectivamente. El hámster se libra relativamente, de la multitud de enfermedades que infectan otros pequeños animales roedores de laboratorio; pueden, sin embargo, sufrir neumonía.

Alimentación y suministro de agua. No es necesario retener la comida antes de la inducción. Puede suministrarse el agua *ad libitum* si no existen instrucciones al respecto.

Manejo y sujeción preliminar. Se coge el hámster por la nuca con los dedos índice y pulgar, empezará a menearse y intentará escapar. Las hembras que han criado recientemente, o los machos maduros provenientes de la misma jaula deben manipularse con precaución, puesto que si no se manejan con cierta frecuencia, tienden a morder.

Métodos Parenterales

Para la administración parenteral de un fármaco anestésico se puede utilizar una jeringuilla hipodérmica de 1 ml o una de 2 ml con una aguja hipodérmica de 1.8 cm del calibre 24-22.

Lugar de la inyección:

- Subcutánea. Sujetando el hámster en cualquiera de las dos manos, se introduce la aguja en sentido craneal debajo de la piel en dirección lateral a la línea media entre el ombligo y el tendón prepúbico.
- Intraperitoneal. De manera similar al anterior, pero más profundamente, teniendo cuidado de no introducir la aguja en el hígado o el estómago.

Vía intramuscular o intraperitoneal - Hidrocloruro de Ketamina (preanestesia, anestesia)

Se utiliza la Ketamina (40-150 mg/kg im ó 100-200 mg/kg ip) como preanestesia o anestesia en hamsters, pero para la analgesia y la relajación muscular es poco efectiva. La administración concurrente de xilacina (10 mg/kg) mejora el grado de relajación y analgesia. La duración de la anestesia varía de 30 min a 1 h según la dosis.

Vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal - Pentobarbital Sódico, Secobarbital Sódico y Tiopental Sódico (anestesia)

La ruta intraperitoneal es la más conveniente para la administración de pentobarbital y otros barbitúricos, pero se deben tomar precauciones, pues los hámsters son difíciles de sujetar y más agresivos que las ratas y ratones. Se ha sugerido la administración de pentobarbital (50-90 mg/kg, 10 mg/ml) para la anestesia quirúrgica de 15-17 min. En el caso de utilizarse una solución concentrada (60 mg/ml) se recomienda 90 mg/kg. La dosis mínima letal (DL₅₀) de pentobarbital es de 135 a 150 mg/kg.

La vía intravenosa a través de la vena lateral de la pata trasera se utiliza para administrar pentobarbital (30 mg/kg) y tiopental (20 mg/kg) a los hámsters. Un aparato especial para sujetar los animales facilita la inyección intravenosa en la vena safena, o puede utilizarse la exposición al bióxido de carbono para inmovilizar el animal.

Vía subcutánea o intramuscular - Sulfato de Morfina (preanestesia)

Se ha observado que el sulfato de morfina en dosis tan altas como 150 mg/kg por inyección intramuscular, subcutánea e intraperitoneal produce analgesia sin narcosis o depresión respiratoria aparente. Esto parece aplicarse únicamente a los hámsters. No se recomienda droperidol ni fentanil para hamsters ya que producen signos en el sistema nervioso central.

Método por Inhalación

Máscara, cono o cámara de anestesia- Éter, Halotano y Metoxiflurano (anestesia)

Se recomienda la atropina (0.2-0.5 mg/kg sc) antes de la aplicación de anestesia por éter o halotano. Las técnicas de anestesia que conllevan el uso de halotano y metoxiflurano como se describe para ratas y ratones también son de utilidad para los hámsters. Estas incluyen el uso de cámaras, conos y máscaras de anestesia.

El éter se administra hasta la efectividad para procedimientos de corta o larga duración.

Respuesta reflejo a la anestesia

El método más práctico para evaluar los distintos grados de la anestesia en este animal es notar si existe una pérdida del reflejo en la retracción de la extremidad seguida de la relajación de los músculos abdominales.

RATON

El ratón sigue siendo el animal más difícil para el logro de una verdadera anestesia quirúrgica sin que se produzca la muerte. Aparte de las sobredosis de anestesia, quizás las causas más comunes de los fallos sean una excesiva pérdida de calor y la hipotermia (relacionada con la alta proporción de superficie:masa) y las rápidas alteraciones de intercambios de gases (relacionadas con las altas velocidades metabólicas y respiratorias). Adicionalmente, al ser tan estrecha la vía de ventilación, ésta se obstruye fácilmente con las excesivas secreciones o acumulaciones de saliva de la faringe.

Otros problemas se experimentan debido al pequeño tamaño de estos animales.

La notable variedad de respuestas a los fármacos que se asocian con sexo, cepa, edad, peso, y estado de nutrición del animal aumenta el riesgo de una sobredosis.

Examen físico. La temperatura, pulso y respiración deben ser de 37.5 °C, 600 pulsaciones/min y 163 respiraciones/min, respectivamente. Los investigadores que contemplan la utilización de anestesia con ratones deben asegurarse de que los ratones estén libres de salmonella, catarro infeccioso, o neumonía viral.

Alimentación y suministro de agua. No es necesario retener la comida antes de la inducción. El agua puede suministrarse *ad libitum* si no existen instrucciones al contrario.

Manejo preliminar y sujeción. Se debe levantar los ratones de su caja sujetando la base de la cola entre los dedos índice y pulgar y transfiriéndolo inmediatamente a la reja de la parte superior de la jaula o una superficie entelada. Cuando intente escapar, se coge el ratón por la nuca con los dedos índice y pulgar, se expone la cola entre los dedos anular y meñique y se presenta para la inyección ip en posición decúbito supino. Si la cola se coge por la punta, es probable que el ratón trepe por su propia cola y muerda al trabajador. Es preferible un pequeño contenedor cilíndrico de plástico transparente, que tiene acoplado un tirador a un lado para ajustar según la medida del animal, y una ventanilla al otro para permitir acceso a la cola.

Método Físico

Hipotermia (anestesia)

Se ha utilizado la hipotermia antes de efectuar la timectomía en ratones neonatos libres de gérmenes. Esto se lleva a cabo colocando el animal en una probeta sellada en la pared de la cámara de enfriamiento de plexiglas, que debe estar forrada con fibra de vidrio y llenado con hielo seco. El ratón experimenta un paro respiratorio, pero la técnica permite la cirugía durante unos 6 min. De 1500 ratones que fueron timectomizados, la mortalidad rondaba el 3%, pero las madres mataron un tercio de los neonatos intervenidos. Los animales neonatos también pueden colocarse en una bandeja de cubos de hielo en un congelador hasta que cese la respiración y pierden su colorido rosado. Esto ocurre en un plazo de 6 a 12 min y el procedimiento quirúrgico debe realizarse en el plazo de 3 min o menos, lo cual suele ser satisfactorio para gonadectomía, timectomía y nefrectomía. De 150 intervenciones, sólo dos muertes fueron atribuidas directamente a la anestesia.

Métodos Parenterales

Para la administración parenteral de un fármaco anestésico, se utiliza una jeringuilla hipodérmica de 1 ml o una de 2 ml con una aguja hipodérmica de 0.48-0.72 cm del calibre 25-22.

Notas Generales. Debe cuidarse al máximo el mantenimiento del calor corporal en un animal tan pequeño. Esto puede lograrse situando una almohadilla caliente debajo del animal y lámparas de calor por encima, cuidando también que el calor no sea excesivo.

El mantenimiento de una vía de ventilación sin obstrucciones y la buena oxigenación es la siguiente preocupación principal del anestesta. Esto se logra con la administración de atropina a 0.04 mg/kg sc, la aspiración faríngea con catéteres finos de polietileno, la insuflación por catéter oral con una alta concentración de O₂ y un suministro de O₂ a las cámaras de inducción y recuperación, y tumbando los ratones de lado con el cuello extendido para lograr la mínima resistencia expiratoria al flujo laminar.

Lugar de la inyección:

a. Subcutánea. Sujetando el ratón en cualquiera de las dos manos, se introduce la aguja cranealmente debajo de la piel por lo menos 1 cm en dirección lateral a la línea media entre el ombligo y el tendón prepúbico.

b. Intraperitoneal. De manera similar al lugar anterior, pero más profundamente, teniendo cuidado de no introducir la aguja en el hígado o el estómago, estando el ratón en posición decúbito supino con la cabeza ligeramente hacia abajo.

c. Intravenosa. Se realiza por una vena lateral de la cola o por la vena metatarsiana dorsal utilizando agujas de 10 x 0.40 ó 0.35 mm (calibre 27 ó 28).

La cola del ratón es un órgano termorregulador, sensible a la humedad y la temperatura. Las venas ventrolaterales de la cola se hacen visibles al doblar la cola por el dedo índice y sujetándola con el dedo pulgar. El punzamiento de la vena de la cola se simplifica con una sujeción adecuada, calentando el ratón entero por medio de una lámpara e introduciendo la cola en agua caliente a una temperatura de 40-50 °C, durante 1-2 min antes del primer intento. Las agujas pueden fijarse envolviendo la cola con esparadrapo. En los casos en los que sea importante asegurar que se inyecten volúmenes exactos de líquido por medio iv, se pueden introducir las agujas después de la exposición quirúrgica de la vena bajo lente de aumento y atándolas en el sitio deseado por medio de ligaduras. Pueden ponerse entonces inyecciones secuenciales durante un período de varias horas. La vena metatarsiana dorsal puede apreciarse claramente si se recorta el pelo y se limpia con alcohol, y se facilita la entrada si se realiza bajo lente de aumento. Se introduce en la vena una aguja del número 25 al 27 acoplada a una jeringuilla de 1 ml o a una microjeringuilla. Normalmente el primer intento se hace en la parte distal de la cola para poder hacer un segundo intento más cranealmente. Un catéter o tubo de polietileno, fino y flexible, puede acoplarse a una aguja del 22 para la perfusión o posterior inyección. No se realiza ningún intento de extraer sangre, sin embargo, el anestesta debe procurar no inyectar aire en la vena, ya que los ratones son sensibles a las embolias de aire y 0.1 ml de aire puede matar un ratón.

Vía intravenosa - Alfaxalona-alfadolona, Metohexitona, Tiopentona y Pentobarbitona

La alfaxalona-alfadolona se administra (20 mg/kg iv) por inyección lenta (0.3 ml de una dilución al 1/10 del preparado comercial) induce una anestesia profunda con analgesia y buena relajación en 10 seg. El efecto máximo se mantiene durante 5-8 min, la duración del sueño es de

un promedio de 10 min y el tiempo de recuperación total es de 20-30 min. Incrementos adicionales (6 mg/kg iv) pueden administrarse a intervalos de 15 min a través de una canalización en la vena de la cola o vía la vena yugular cateterizada para períodos largos de anestesia estable. Hasta ahora sólo se va intentado mantener la anestesia en los ratones para períodos de hasta 4 h sin observar efectos acumulativos o tolerancia en este tiempo.

La metohexitona a 6 mg/kg por inyección iv lenta induce la anestesia en 10 s; esta dura de 3-4 min y la recuperación completa tarda unos 50 min. Se observa cierta acumulación si se administran inyecciones sucesivas para prolongar el período de anestesia.

La tiopentona (30-40 mg/kg iv) por inyección lenta induce una anestesia quirúrgica ligera en 10-15 s y tiene una duración de 10-12 min. Con este agente la acumulación es notable y no deben utilizarse dosis sucesivas para prolongar la anestesia.

La pentobarbitona debe ser de reciente preparación a 5 mg/ml en solución salina templada para obtener la máxima constancia en la respuesta. La dosificación varía debido a tantos factores que cuando sea factible debe anestesiar un grupo de prueba antes de cada experimento. En pruebas toxicológicas en las que se administre un agente para anestesiar ratones, un grupo control debe recibir la misma dosis de pentobarbitona que los grupos que se están evaluando.

Unos 40 mg/kg ip deben producir la narcosis basal, pero la anestesia quirúrgica puede requerir dosis de 50-90 mg/kg ip. La narcosis se desarrolla en 5-7 min y se mantiene un efecto máximo de meseta durante 20-40 min; el tiempo de sueño es de aproximadamente 120 min, mientras el tiempo de recuperación total puede ser de 6-24 h. La necesidad de evitar la pérdida de calor es de particular importancia con el uso de pentobarbitona, y el O₂ suministrado bien de forma local al individuo o a la incubadora de recuperación en el caso de grupos, es obligatorio si los ratones se han anestesiado profundamente.

Vía intravenosa - Pentobarbital Sódico, Tiamilal Sódico y Tiopental Sódico (anestesia)

El pentobarbital puede administrarse por la vena de la cola. La cantidad de pentobarbital necesaria varía de 35 a 70 mg/kg según el sexo, la cepa, etc.

La dosis intravenosa de tiamilal o tiopental es de 25-50 mg/kg. Existe poca ventaja en el uso de estos fármacos, ya que la duración de la anestesia después del pentobarbital es de unos minutos solamente. Es costumbre diluir el pentobarbital y otros fármacos parenterales al 1:10 con una solución salina fisiológica o con agua destilada antes de inyectarse.

Vía intraperitoneal - Pentobarbital Sódico (anestesia)

Esta vía de administración es la de uso más frecuente, aunque las grandes variaciones entre los diferentes ratones y cepas hacen que sea mucho más arriesgado que la ruta intravenosa. La necesidad de una extrema precaución en extrapolar datos de un especie a otra se demuestra al comparar la duración del sueño de ratas y ratones bajo la anestesia por pentobarbital. Los ratones machos son menos

susceptibles a los barbitúricos que las hembras, mientras los ratones Swiss-Webster duermen más tiempo que las ratones hembras con la misma dosis de pentobarbital.

La cantidad de pentobarbital necesaria para inducir la anestesia quirúrgica en ratones (60-90 mg/kg) es mucho más alta que los niveles de anestesia equivalentes para perros y gatos, la cual es de 30-35 mg/kg. La anestesia quirúrgica se produce unos 5-10 min después de la inyección intraperitoneal y dura unos 20-30 min. Para procedimientos más largos, es decir, 40-50 min una dosis intraperitoneal de 50 mg/kg puede seguirse de una dosis subcutánea de 25 mg/kg. Las dosis más pequeñas, es decir, 40-60 mg/kg de pentobarbital se utilizan con frecuencia, pero éstas se suelen usar para estudiar los efectos de los fármacos, la deshidratación, etc. en el tiempo de inconsciencia, pérdida de reflejo recuperativo y otras variables.

En un trabajo, 80 mg/kg produjo la anestesia quirúrgica en el 30% de los animales con el 0% de mortalidad, mientras 90 mg/kg produjo la anestesia en el 80% con una mortalidad del 20%. El suplir la anestesia de pentobarbital ligera con éter, halotano o metoxiflurano contribuye a la reducción de la alta mortalidad por una segunda inyección de pentobarbital. La temperatura corporal normal debe mantenerse durante la recuperación.

Los animales neonatos (de 1-4 días) pueden anestesiar durante aproximadamente 1 h con la administración intraperitoneal de 5 mg/kg de pentobarbital. Con el objeto de evitar la filtración a través de la fina pared abdominal, la aguja se introduce subcutáneamente al lado de las costillas, a través del diafragma hasta la cavidad peritoneal.

Vía intraperitoneal, subcutánea e intramuscular - Maleato de Acetilpromacina, Hidroclorato de Clorpromacina e Hidroclorato de Promacina (preanestesia)

La clorpromacina se administra antes de la anestesia para alargar el período de anestesia y reducir la mortalidad que se ha observado después de la inyección intraperitoneal de una dosis estándar de pentobarbital. Grandes dosis de clorpromacina (50 mg/kg im) seguidas de la administración intraperitoneal de pentobarbital (50 mg/kg) inducen la anestesia quirúrgica durante 22 min en el 80% de los animales, y el 87% están vivos al cabo de una semana. Dosis más pequeñas de clorpromacina (5-10 mg/kg) administradas subcutáneamente son efectivas y menos irritantes.

El acetilpromacina (0.75 mg/kg im) se ha combinado con ketamina y xilacina. También puede administrarse la promacina con la ketamina.

Otros utilizan tribromoetanol a 125 mg/kg ip, y sugieren que una solución al 0.25% no era viscerairritante e inducía una anestesia muy aceptable, mientras una solución al 2.50 % provocaba adherencias fibrosas entre estómago, hígado y bazo. Se encontró que este fármaco inducía una excelente anestesia quirúrgica en los ratones a 125 mg/kg ip, pero algunos grupos y cepas morían de complicaciones intestinales mientras otras no.

Vía intraperitoneal e intramuscular - Fentanil-Droperidol (Innovar-Vet), Hidroclorato de Meperidina, Sulfato de Morfina e Hidroclorato de Xilacina (preanestesia, anestesia)

La premedicación con meperidina (20 y 40 mg/kg ip) y morfina (5 y 10 mg/kg ip) 15 min antes de pentobarbital (50 mg/kg) en los ratones, prolonga los efectos del barbitúrico. De manera similar, la meperidina (20 mg/kg) y la morfina (5 mg/kg) convierten una dosis subefectiva de pentobarbital en efectiva. La administración crónica de meperidina durante varias semanas no influye significativamente en las respuestas a los barbitúricos.

Vía intramuscular, intraperitoneal e intravenosa - Hidroclorato de Ketamina (preanestesia-anestesia)

Se recomienda un amplio espectro de dosis para la preanestesia (22-50 mg/kg) y la anestesia (50-400 mg/kg) por las rutas intraperitoneal, intravenosa e intramuscular. La atropina (0.04 mg/kg im) seguida de la ketamina (44 mg/kg im) induce la catalepsis con la anestesia quirúrgica que permite el punzamiento del sinus orbital, la exposición de las venas y la laparotomía. La recuperación ocurre en un período de 15-30 min. La ketamina (22-44 mg/kg) puede combinarse con la acetilpromacina (0.75 mg/kg) y xilacina (2.50 mg/kg) para la inyección intramuscular. La combinación de la ketamina (80 mg/kg im) y la xilacina (16 mg/kg im) induce un excelente efecto sedante y relajante, pero la analgesia es inadecuada para la cirugía mayor. Cuando estos dos agentes se aumentan al nivel letal (la ketamina, 200 mg/kg im y xilacina, 16 mg/kg im) el grado de analgesia sigue siendo inadecuado antes de la muerte.

Algunos utilizan ketamina a 44 mg/kg im para ratones y afirmaron lograr la anestesia quirúrgica, recuperándose los animales en 15-30 min. Sin embargo, se ha podido conseguir una anestesia satisfactoria con este fármaco administrado a dosis que variaban de 20-300 mg/kg im o ip, ni siquiera al administrarlo con xilacina o diazepam. De no ser que hubiera una marcada variación de respuesta a la ketamina en los ratones, es difícil de entender esta disparidad de resultados.

Métodos por Inhalación

Los agentes volátiles y los gases pueden suministrarse a ratones en cámaras de inducción o por conos nasales conectados a los gases fluidos, estando el agente volátil dentro mismo del cono o por catéteres de insuflación que lleven las mezclas a la faringe o a una traqueostomía. Cuando sea posible, debe utilizarse un vaporizador de diseño adecuado, y debe considerarse un respirador para roedores en el caso de una anestesia prolongada.

Cámara de anestesia - Bióxido de Carbono con o sin oxígeno (anestesia)

$CO_2:O_2$ (1:1) premezclado es útil para la inducción rápida de anestesia en segundos dentro de una cámara y es adecuado para vacunas o punzamiento cardíaco. No se debe intentar su mantenimiento durante más de 2 min. Los ratones pierden el conocimiento en 10-15 s.

Se han logrado períodos cortos de anestesia con la inhalación del CO_2 en aire, mientras que otros recomiendan una mezcla de $CO_2:O_2$ (1:1) para la anestesia de hasta 10 min, subrayando la conveniencia de este método para el punzamiento cardíaco ya que se estimulan la respiración y el retorno venal al corazón; algunos opinan que no es recomendable tiempos tan largos.

Se han descrito varios circuitos y aparatos para la anestesia de los ratones por inhalación. El bajo coste, la sencillez, la posibilidad de lograr concentrados de anestesia de agentes volátiles a flujos bajos de gas, y la necesidad de anestesiar grupos de ratones simultáneamente, han sido los requerimientos más ventajosos de tales conjuntos. Las características que consideramos precisas en una cámara de inducción son una plataforma perforada y una reja entre el animal y el agente volátil para evitar quemaduras de contacto de la piel o las mucosas, una entrada para permitir el suministro de O_2 , $CO_2:O_2$ (1:1), $N_2O:O_2$ u otras mezclas gaseosas de anestesia si se requieren, y un escape para el aire expirado a fin de evitar una acumulación de CO_2 alrededor del animal.

Puede preferirse el uso de bióxido de carbono al éter, halotano o metoxiflurano, puesto que produce cambios mínimos en la glucosa de la sangre y otras variables.

Máscara, Cono o Cámara de Anestesia - Cloroformo (anestesia)

Merece especial consideración el uso del cloroformo para la anestesia o la eutanasia. Se ha observado que varias cepas de ratón, es decir, A, C_3H , C_3Hf , DBA y HR son susceptibles al envenenamiento involuntario por el cloroformo. La exposición durante 2 a 3 h produce lesiones renales en todos los machos pero en ninguna hembra. Algunos animales mueren poco después de la exposición, mientras otros mueren al cabo de varios meses. El uso o el almacenamiento del cloroformo en un área en la que los ratones pueden estar en contacto directo o indirecto, demuestra una tremenda negligencia. El cloroformo, el halotano, el tricloroetileno y el etil éter son hepatotóxicos en los ratones por administración esofageal. El cloroformo es el más tóxico, pero todos los agentes producen algún grado de toxicidad a las 72 h de la exposición. Algunos consideran que bajo ninguna circunstancia debe utilizarse el cloroformo en laboratorios para la anestesia o eutanasia de roedores. Este no sólo es un agente hepatotóxico, sino que se ha demostrado que las partículas minúsculas del ambiente afectan seriamente las funciones reproductoras del ratón macho.

Máscara, cono o cámara de anestesia - Eter, Halotano, Metoxiflurano (anestesia)

Estos agentes se utilizan con frecuencia para inducir la anestesia por medio de una cámara o cono.

Tradicionalmente, se ha utilizado el éter para la anestesia por inhalación en los ratones. Su ventaja es la de tener un coste bajo y de ser muy sencillo. Sin embargo, se han subrayado los inconvenientes de la reacción de las vías respiratorias a semejante agente irritante, y la inducción de excesivas secreciones mucosas, edemas pulmonares y la obstrucción de las vías de ventilación. Algu-

nos opinan que este agente es "totalmente inadecuado" para los ratones puesto que, además, es difícil mantener un nivel constante de anestesia quirúrgica.

Los ratones salivan cuando se les exponen al éter, de no ser que esté precedido por la administración de atropina (0.04 mg/kg sc o im). Para procedimientos cortos como la venipuntura, el éter puede utilizarse con seguridad en una capucha ventilada sin la premedicación con atropina. El éter causa una pérdida del reflejo corneal antes de la pérdida de la capacidad retráctil del pie. Los ratones tienen los pulmones pequeños, lo cual explica la rápida inducción y recuperación.

El éter mantiene un lugar de utilidad en la anestesia de ratones a pesar de los inconvenientes ya descritos. Es económico y puede usarse en los recipientes más sencillos en el caso de la falta de otros métodos. No obstante, para evitar que se utilicen concentraciones de éter innecesariamente altas, deben rociarse volúmenes medidos (2-4 ml) dentro del recipiente.

El metoxiflurano con O₂ o aire es el mejor agente volátil para la inhalación sea cual sea el método de aplicación. En estudios comparativos entre el halotano, el metoxiflurano y el éter, el metoxiflurano es el más adecuado. La inducción es rápida (1-3 min) si se introducen los ratones en una cámara en la que se ha evaporado metoxiflurano en una gasa (0.5-1.0 ml en una cámara de 1 l durante unos 10 min a temperatura ambiente). Siempre que se mantenga la temperatura corporal existe poco peligro de matar a los ratones con este agente incluso durante períodos prolongados de anestesia. La recuperación es suave, pero el período hasta la recuperación completa puede ser muy prolongado (hasta 24 h), según la duración de la administración. Se necesitan para la anestesia flujos de gas de 100-500 ml/min con concentraciones del 0.5-2.0 %.

Los animales están inducidos en 45-90 s dentro de un bote de cristal y mantenidos pasando aire encima del metoxiflurano a un embudo de plástico cuyo borde se ha recortado para acoplarse a la cabeza del animal. Es mejor el oxígeno que el aire ambiental, si estuviera disponible. Puede utilizarse el número de respiraciones para controlar el nivel de anestesia en los sistemas abiertos. Si hubiera menos de 60 respiraciones/min la concentración debe disminuirse. Inicialmente, puede esperarse una mortalidad de hasta el 50% cuando se realiza cirugía en ratones utilizándose técnicas simples de anestesia. Esta puede reducirse considerablemente conforme se perfeccionen las técnicas de anestesia y cirugía.

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que el metoxiflurano es el agente más seguro, bien por los métodos sencillos de "open-drop" o con un aparato sofisticado. Se han citado varias ventajas; la anestesia quirúrgica se mantiene fácilmente y es difícil ocasionar la muerte del ratón, aun intencionadamente. El porcentaje de supervivencia posoperatoria es del 100% sin evidencia de lesión alguna en la autopsia. El largo tiempo de recuperación, de 10-20 min, puede ser una ventaja puesto que permite la cirugía en cabeza y cuello sin el estorbo de máscaras o tubos después de finalizarse la administración. Puede utilizarse además en aparatos económicos y compactos y pueden inducirse hasta 3 ratones a la vez. Fi-

nalmente, el metoxiflurano no es explosivo y es relativamente seguro para el hombre.

El halotano con O₂ requiere más cuidado por parte del anestésista, y no es segura la inducción de un grupo de ratones a la vez. No obstante, la inducción rápida y suave en 1-2 min, las excelentes condiciones quirúrgicas que se obtienen y la recuperación rápida (2-3 min), lo convierten en un agente muy valioso cuando se vaporiza en equipos de un diseño adecuado.

También se ha utilizado el halotano en los ratones pero con un éxito parcial, solamente, hay muy poco margen de seguridad para los métodos sencillos de administración y en el caso de no haber un ayudante, no será posible un control preciso ni siquiera con el equipamiento más sofisticado.

Respuesta de reflejo a la anestesia

Con la administración del éter, el ratón a menudo lamerá sus patas delanteras o parecerá lavarse la cara antes de entrar en el estado de inconsciencia.

El ratón tiene una capacidad pulmonar muy pequeña, lo cual significa que se logra la anestesia ligera muy rápidamente, y en consecuencia se requiere recargar la máscara del éter si hiciera falta anestesia adicional. El reflejo de pedal se utiliza para indicar los varios niveles de la anestesia.

La ausencia de retracción de la pata trasera en respuesta al punzamiento de la almohadilla dactilar del pie, la ausencia del reflejo corneal o el reflejo de pinzamiento de la cola son índices útiles de la anestesia quirúrgica. La pérdida de reflejo en el pie puede producirse antes de la pérdida del reflejo corneal. También pueden utilizarse las venas metatarsales.

RATA

Examen físico. Generalmente el investigador puede determinar el estado de salud de la rata por su aspecto físico, aunque no se realice un examen físico profundo. La media de temperatura, pulso y respiración de la rata deben ser de 37 °C, 300 pulsaciones/min y 85 respiraciones/min respectivamente. Su pelaje debe ser brillante y suave, la piel debe tener elasticidad, y el cuerpo debe estar firme al tacto. Las enfermedades infecciosas que a veces ocurren en la rata de laboratorio tienen una marcada influencia en los procedimientos en los que esta indicada la anestesia: fiebre paratifoidea, seudotuberculosis, otitis del oído medio, laberintitis y neumonía. La neumonía es probablemente la causa de morbilidad más corriente de la rata adulta.

Alimentación y suministro de agua. No es necesario retener la comida antes de la inducción. Si no existen instrucciones al contrario el agua puede suministrarse *ad libitum*.

Manipulación y sujeción preliminar. Es aconsejable el uso de guantes protectores para el principiante con el fin de minimizar la posibilidad de heridas. Se cogen mejor situando la palma de la mano encima de la espalda del animal, doblando las patas delanteras debajo de la mandíbula con los dedos pulgar e índice, evitando apretar el cuerpo.

Métodos Parenterales

Lugares de inyección :

a. Subcutáneamente. En la punta del hombro o sosteniendo la rata en una de las manos se introduce la aguja en sentido craneal debajo de la piel por lo menos 2.5 cm lateralmente a la línea media entre el ombligo y el tendón prepúbico.

b. Intraperitoneal. Similar al lugar anterior, pero más profundamente, y en cuyo caso debe tomarse la precaución de evitar la inserción de la aguja en el hígado o estómago.

c. Endovenosa. La vena tarsal recurrente del tercio lateral inferior de la tibia.

Para la administración parenteral de los fármacos se utiliza una jeringuilla hipodérmica de 1 ml o una de 2-3 ml acoplada a una aguja hipodérmica de 2.5 cm del calibre 22-20.

Vía intravenosa o intraperitoneal - Hidrato de Cloral, Clorobutanol, Paraldehido, Tribromoetanol y Uretano (anestesia)

Ninguno de estos agentes ofrece ventaja sobre el pentobarbital sódico. La inyección intraperitoneal del hidrato de cloral se asocia con la peritonitis y posterior ileo adinámico y no debe utilizarse sólo en concentraciones altas por esta vía para la anestesia general en ratas. Parece que las ratas sean particularmente susceptibles al desarrollo de esta condición.

El uretano causa menos depresión cardíaca y respiratoria que los barbitúricos y en dosis de 1000-1250 mg/kg está indicado para la cirugía abdominal. Este agente se reserva para procedimientos largos que no requieren la recuperación. La tráquea debe ser canalizada para facilitar la ventilación.

Vía intravenosa - Hexobarbital Sódico, Pentobarbital Sódico, Secobarbital Sódico, Tiamilal Sódico y Tiopental Sódico (anestesia)

Las venas metatarsal, tarsal recurrente, safena y caudal son rutas adecuadas para la administración del pentobarbital sódico y otros barbitúricos. Existen dispositivos adecuados para la sujeción del animal mientras se dilata la cola por inmersión en agua caliente, con la aplicación de xilacina, acetona, etc. Una dosis de pentobarbital (30-40 mg/kg) puede individualizarse y anestesiar el animal hasta el grado deseado. Al igual que en otros animales pequeños, el agente de anestesia debe diluirse al 1:10 con solución fisiológica o agua destilada. El pentobarbital diluido (6 mg/ml) puede administrarse con seguridad en dosis de 50 mg/kg. Factores tales como la edad, sexo, cepa, densidad de población, estado de nutrición, sustancias existentes en el nido y la presencia de amoníaco influirán en la dosis definitiva de la anestesia. Las ratas hembras metabolizan algunos fármacos como el pentobarbital más despacio que los machos. Normalmente, los animales jóvenes requieren pentobarbital adicional.

Existen ventiladores de pequeño tamaño para proporcionar la respiración artificial por medio de un tubo endotraqueal en casos de insuficiencia cardíaca o de-

presión. Ni el tiamilal (20 mg/kg iv) ni el tiopental (20 mg/kg iv) se administran con frecuencia a las ratas.

Vía intraperitoneal - Hexobarbital Sódico, Metohexital Sódico, Pentobarbital Sódico y Secobarbital Sódico (anestesia)

El pentobarbital, secobarbital, metohexital, hexobarbital y otros barbitúricos se administran fácilmente a las ratas por la ruta intraperitoneal. Se requiere una cantidad ligeramente mayor de pentobarbital (35-45 mg/kg) por vía intraperitoneal que por vía intravenosa, y la respuesta a la dosis fija es variable. La anestesia después de inyectar pentobarbital se produce en unos 5 a 15 min con una duración de unos 30-45 min. La cantidad adicional del barbitúrico que debe administrarse, si la dosis inicial no fuese suficiente o si empezara a recuperarse el animal, queda a juicio del trabajador, aunque se recomienda el 20-25% de la dosis original. La premedicación intramuscular con clorpromacina de mayor duración (1-2 mg/kg) disminuirá la dosis y prolongará el período de anestesia. Otros fármacos, tales como el cloramfenicol, también prolongan la acción anestésica del pentobarbital en las ratas. La dosis anestésica de hexobarbital es de 100 mg/kg si se administra por vía intraperitoneal, mientras la dosis recomendada de metohexital es de 95 mg/kg por la misma ruta.

Vía intramuscular o intraperitoneal - Tiamilal Sódico y Tiopental Sódico (anestesia)

No se aconseja la ruta intraperitoneal para la administración de tiamilal (20-25 mg/kg) o tiopental (20-25 mg/kg) en las ratas, puesto que se puede utilizar la vena de la cola con más efectividad. Para fines comparativos, la dosis letal media (DL₅₀) del tiopental por la ruta intraperitoneal en ratas de menos de 9 meses es de 125-130 mg/kg, mientras que para los de 12 meses y más es de 115-125 mg/kg. La dosis sugerida de tiopental por la ruta intramuscular es de 40 mg/kg.

Vía intramuscular y subcutánea - Droperidol-Fentanil (Innovarvet) (preanestesia, anestesia y analgesia)

El droperidol y el fentanil (0.01-0.05 ml/100 g) son de utilidad para la sujeción, anestesia o analgesia. Si el animal se moviera o se mostrara molesto, pueden suplirse con éter, halotano o metoxiflurano.

Vía intramuscular, subcutánea y intraperitoneal - Hidroclorato de Ketamina (preanestesia y anestesia)

La ketamina (20-40 mg/kg im) induce un estado parecido a la anestesia general durante 20-40 min en las ratas. Se requieren unos 10 min para lograr el efecto máximo, y las ratas se recuperan completamente en aproximadamente 1-1/2h. La administración previa de atropina (0.04 mg/kg sc) contribuye a minimizar la salivación. Los tranquilizantes (acepromacina) o los narcóticos (mepredina) pueden inyectarse simultáneamente de la misma jeringuilla para prolongar el período de la anestesia y/o disminuir el dolor. El grado de analgesia es variable, y normalmente la relajación muscular es pobre. Se recomienda la administración de ketamina (60 mg/kg im)

seguido de pentobarbital (21 mg/kg iv) para la anestesia de 1 h de duración. La ketamina debe combinarse con un analgésico para procedimientos que sean largos y dolorosos.

Vía intramuscular y subcutánea - Hidroclorato de Meperidina, Sulfato de Morfina o Hidroclorato de Xilacina (preanestesia, analgesia)

Se utilizan la morfina (5 mg/kg sc) y la meperidina (25-50 mg im sc) después de ciertos procedimientos que se asocian con el dolor. La xilacina (2.5 mg/kg) se utiliza junto con acetilpromacina (0.75 mg/kg) y ketamina (22-44 mg/kg).

Vía subcutánea, intramuscular o intraperitoneal - Sulfato de Atropina (preanestesia)

Se administra la atropina (0.04-0.10 mg/kg, sc) antes de la administración de la anestesia por éter. Puede administrarse con ketamina, halotano, droperidol y fentanil, o pentobarbital. La rata hidroliza la atropina de forma rápida.

Métodos por Inhalación

Cámara de anestesia - Bióxido de Carbono con o sin oxígeno (anestesia)

El bióxido de carbono, sólo o mezclado con oxígeno, es muy efectivo para períodos cortos de inmovilización para permitir el sangrado retro-orbital, el punzamineto cardíaco, y la inducción de anestesia antes del mantenimiento con halotano, etc.

Cámara, cono, máscara de anestesia y intubación endotraqueal - Eter (anestesia)

La administración de atropina (0.04-0.10 mg/kg) antes de la inducción en un recipiente de cristal y el mantenimiento por medio de una máscara o cono pequeño se utiliza con éxito en las ratas.

Deben protegerse los ojos con una pomada oftalmológica. Si el procedimiento puede realizarse delante de una capucha, el escape de éter a la habitación se reduce al mínimo. Una bureta de cristal de 25 ml con una llave de paso de Teflon puede utilizarse para suministrar 5-10 gotas de éter para el mantenimiento de la anestesia en un sistema abierto. Se utiliza la intubación endotraqueal o una traqueostomía con acoplamiento a un sistema cerrado o semi-cerrado. Las razones por las que resulta aceptable esta forma peligrosa de anestesia son los múltiples informes y precedentes para su uso en los procedimientos básicos, tales como la medición de la tensión arterial en las ratas.

Cámara, cono, máscara de anestesia, o intubación endotraqueal - Halotano y Metoxiflurano (anestesia)

Estos agentes se administran por medio de un cono o máscara. La administración de atropina disminuirá la salivación, mientras que los tranquilizantes o analgésicos disminuirán la dosis necesaria. El metoxiflurano induce una buena relajación y analgesia para períodos extendidos de tiempo sin efectos nocivos en las ratas salvajes. De los varios centenares de ratas anestesiadas con este agente, no hubo ninguna muerte. Puede practicarse la resuscitación situando la punta de un tubo de goma por encima de la nariz y la boca del animal, y respirando suavemente por la parte opuesta.

El éter se administra sin dosis concreta hasta la efectividad para procedimientos de corta o larga duración. Para evitar que se seque y se irrite la córnea con la utilización del método de goteo, se aplica una pomada oftalmológica en ambos ojos antes de la inducción.

Respuesta reflejo a la Anestesia

El reflejo de pedal es el método ideal para indicar los varios niveles de anestesia tanto para las anestias volátiles como los no-volátiles.

BIBLIOGRAFIA

Clifford, D. H. (1978). *Preanesthesia, Anesthesia, Analgesia y Euthanasia*. In: Fox, J. G.; Cohen, B.J. and Loew, F.M. (eds.). *Laboratory Animal Medicine*. New York, Academic Press, INC. pp. 536-548

Green, C.J. (ed.) (1982) *General and balanced anesthesia*. In: *Animal anesthesia*. London, Laboratory Animals, LTD. pp. 139-160

Harkness, J.E. and Wagner, J.E. (eds.) (1980). Capítulo 3 *Procedimientos clínicos*. En: *Biología y clínica de conejos y roedores*. Zaragoza, Editorial Acribia pp. 51-69.

Saiz, L.; García de Osma, J.L. y Compaire, C. (eds.) (1983). *Identificación, marca y transporte*. En: *Animales de laboratorio I (Producción, manejo y control sanitario)*. Madrid, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias pp. 147-161.

L. Gimeno Forner
L. O. Gimeno Forner
D. Cejalvo Lapeña
M.A. Calvo Bermúdez
B. Bolant Hernández
J.M. Lloris Carsí