Efectos de la combinación de melatonina con clorhidrato de ketamina sobre regímenes estándar de anestesia en ratas

Natalia Bello-Caraballo, Joaquín Cogo-Pagella, Omar Iodice y Claudio O. Cervino*

Instituto de Fisiología y Neurociencias (IFNe-SeCyT), Universidad de Morón, Argentina

Resumen

Objetivo: Evaluar la administración de melatonina como un agente con efecto anestésico y comprobar si este fármaco puede disminuir la dosis efectiva y/o mejorar los efectos del clorhidrato de ketamina (CK). **Materiales y métodos:** En 54 ratas se ensayaron dosis de melatonina (15 y 100 mg/kg) y CK (35, 50 y 70 mg/kg), solas o combinadas. Se registró la duración y profundidad de la anestesia evaluadas a través de reflejos de enderezamiento y de retirada. Se definieron cuatro intervalos de la anestesia (inducción, general, quirúrgica y recuperación total). **Resultados:** De los nueve tratamientos ensayados: a) control de vehículo y las dosis de 15 mg/kg de melatonina y 35 mg/kg de CK no produjeron efectos anestésicos; b) las dosis de 50 y 70 mg/kg de CK y la combinación de 15 mg/kg de melatonina más 50 mg/kg de CK produjeron solamente anestesia general, y c) la dosis de 100 mg/kg de melatonina y las combinaciones de 100 mg/kg de melatonina más 50 o 70 mg/kg de CK produjeron anestesia general y quirúrgica. **Discusión:** Se comprueban los efectos anestésicos de la melatonina, que aumentan cuando se asocia con CK. Se comparan nuestros resultados con estudios previos realizados con combinaciones de CK más otros anestésicos. Se discute el posible efecto de la combinación CK-melatonina sobre el sistema GABAérgico y los receptores N-methyl-D-aspartato (NMDA) para glutamato. **Conclusión:** La combinación melatonina-CK produjo una inducción rápida de la anestesia y una efectiva anestesia quirúrgica en ratas. De tal forma, este estudio sugiere que la melatonina modula mecanismos implicados en la producción de anestesia por CK.

Palabras claves: Anestesia. Melatonina. Clorhidrato de ketamina. Intervalos. Anestesia. Rata.

Effects of the combination of melatonin with ketamine hydrochloride on standard anesthesia regimens in rats

Abstract

Aim: Assess melatonin administration as an anaesthetic agent and establish whether combining this drug can decrease the required dosage of ketamine and/or enhance its effects. **Materials and methods:** Single and combined doses of melatonin (15 to 100 mg/kg) and ketamine (35, 50 and 70 mg/kg) are tested in 54 rats. Duration and depth of anaesthesia are assessed through recording righting and withdrawal reflexes. Four intervals of anaesthesia are defined (induction, general, surgical and full recovery). **Results:** Nine treatments are tested: (a) control and doses of 15 mg/kg melatonin and 35 mg/kg ketamine do not produce anaesthetic effects; (b) doses of 50 and 70 mg/kg ketamine and combination melatonin-ketamine 15 + 50 mg/kg

Correspondencia:

Claudio O. Cervino

E-mail: ccervino@unimoron.edu.ar

Fecha de recepción: 28-08-2018

Fecha de aceptación: 21-11-2018

DOI: 10.24875/RAA.18000022

Disponible en internet: 05-02-2019

Rev Argent Anesthesiol. 2018;76(2):75-84

www.revistaargentinaanestesiologia.com

0370-7792 © 2018 Federación Argentina de Asociaciones, Anestesia, Analgesia y Reanimación. Publicado por Permanyer México SA de CV. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

only produce general anaesthesia; c) melatonin 100 mg/kg and melatonin 100 mg/kg combinations with ketamine 50 or 70 mg/kg produce general and surgical anaesthesia. **Discussion:** Anaesthetic effects of melatonin are verified. These effects are enhanced when combined with ketamine. Our results are compared with those obtained with combinations of ketamine and other anaesthetic drugs. The possible effect of the ketamine-melatonin combination on the GABAergic system and the NMDA receptors for glutamate is discussed. **Conclusion:** The melatonin-ketamine combination causes a rapid onset of anaesthesia and prolongs the effect of ketamine alone in rats. So, this study suggests that melatonin modulates mechanisms involved in the induction of anaesthesia by ketamine.

Key words: Anaesthesia. Melatonin. Ketamine. Anaesthesia intervals. Rat.

Introducción

En un pequeño número de investigaciones se ha examinado el uso de la melatonina (ML) en asociación con fármacos anestésicos en humanos¹⁻⁶. Aunque los resultados preliminares son prometedores, son necesarios más estudios antes de llegar a una conclusión firme sobre el uso de la ML como premedicación o en regímenes estándar de anestesia.

La ML (N-acetyl-5-methoxytryptamina) ha sido conocida clásicamente como la hormona de la glándula pineal, aunque hoy se sabe de la existencia de fuentes extrapineales de producción de ML⁷. En el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos se han detectado receptores de ML en el núcleo supraquiasmático, hipotálamo, corteza cerebral, cerebelo e hipocampo⁸. La ML tiene un efecto inhibitorio sobre el SNC. Se ha demostrado la presencia de una interacción significativa entre los sistemas GABAérgico y melatoninérgicos⁹, y algunas de las acciones neurofarmacológicas de la ML (incluyendo actividad hipnótica) parecen estar mediadas por el receptor del ácido gamma aminobutírico A (GABA_A) y pueden bloquearse con antagonistas GABAérgicos³.

La ML cumple múltiples papeles en el organismo de los animales. Entre sus funciones fisiológicas, esta molécula posee propiedades sedantes, hipnóticas, analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes y cronobióticas^{10,11} que la distinguen como una atractiva alternativa para la premedicación en anestesia, tanto en animales como en humanos^{1,10}. La administración de ML exógena durante el día, cuando los niveles endógenos de la hormona son muy bajos, mejora la inducción¹², disminuye la latencia¹³ y mejora la calidad¹⁴ del sueño.

Estudios sobre la ML y su uso clínico en humanos se relacionan con el envejecimiento, la depresión y otros trastornos psiquiátricos, como un medicamento para trastornos del sueño, para el *jet-lag*, como terapia antioxidante, tratamiento para el cáncer y como un protector de la piel para la luz ultravioleta, entre

muchos otros¹⁵. A su vez, hay evidencias que apoyan que la ML puede usarse como un agente ansiolítico, analgésico e inductor prequirúrgico y anestésico-quirúrgico^{3,16}. La premedicación oral en humanos con ML reduce significativamente las dosis de propofol y de tiopental requeridas para la pérdida de respuesta a requerimientos verbales y del reflejo corneal². Naguib, et al.² demostraron que la potencia relativa de los anestésicos después de la premedicación con ML fue de 1.7 a 1.8 veces mayor para el propofol y de 1.3 a 1.4 veces mayor para el tiopental, comparado con el ensayo de cada anestésico contra placebo.

En ratas, la ML por vía oral ha demostrado potenciar los efectos anestésicos del tiopental y el clorhidrato de ketamina (CK)¹⁷. Además, la inyección intraperitoneal (IP) de 100 mg/kg de ML reduce la Concentración Alveolar Mínima (CAM) (24%) para isoflurano en roedores en comparación con el control¹⁸. Altas dosis de ML administrada por vía intravenosa a ratas han demostrado tener propiedades anestésicas y antinociceptivas^{19,20}, y dosis anestésicas de ML produjeron efectos sobre el registro del electroencefalograma (EEG) similares a las generadas por el tiopental y el propofol²¹.

En medicina humana, el uso de CK se ha difundido notablemente por presentar la ventaja de tratarse de un anestésico disociativo, de acción rápida, con un estado de profunda analgesia hasta anestesia y que presenta un amplio margen de seguridad, y son poco comunes los accidentes cardiorrespiratorios²². En medicina veterinaria y en animales de laboratorio el CK es ampliamente utilizado, ya que puede usarse como anestésico o para la inducción de la anestesia producida por otros fármacos. La fenciclidina como único fármaco no provee suficiente analgesia y relajación muscular, y es efectiva su combinación con agentes sedativos (agonistas alfa 2 y benzodiacepinas)²³. Durante la anestesia con CK, los ojos pueden permanecer abiertos y el reflejo palpebral estar presente. El principal mecanismo de acción del CK es su antagonismo no competitivo sobre el receptor NMDA-glutamato, e interactúa con receptores del sistema opioide, el

Tabla 1. Grupos de tratamientos ensayados durante el estudio preliminar

Grupo	Tratamiento	N	Fármaco	Dosis
1	Control	6	Vehículo (etanol + solución fisiológica)	2.5 ml, IP
2	ML15	6	Melatonina	15 mg/kg, IP
3	ML100	6	Melatonina	100 mg/kg, IP
4	CK35	6	Clorhidrato de ketamina	35 mg/kg, IP
5	CK50	6	Clorhidrato de ketamina	50 mg/kg, IP
6	CK70	6	Clorhidrato de ketamina	70 mg/kg, IP

IP: vía intraperitoneal; N: número de animales ensayados.

sistema colinérgico y con el receptor de adenosina como agonista²⁴. El CK es bien absorbido si se administra por las vías IP e intramuscular en ratas, aunque la inyección intramuscular es dolorosa e irritante²⁵, por lo cual la vía IP es la preferida. En ratas se ha propuesto el uso de dosis únicas, pero es mucho más común la utilización del CK en combinación con otros fármacos, como en el caso de CK (dosis 40-100 mg/kg) más xilacina (dosis 5-13 mg/kg)²⁶.

De esta forma surge el interrogante de si la administración de ML puede actuar como un agente inductor anestésico y, a su vez, si combinada con CK puede disminuir la dosis anestésica para el efecto quirúrgico de esta última, o, a igual dosis, mejorar los efectos anestésicos del CK.

El objetivo del presente estudio es evaluar dosis de ML únicas o en combinación con CK, como agente con efecto anestésico en ratas. A través de las manifestaciones comportamentales y del registro de la duración y profundidad de la anestesia se trata de demostrar que la combinación de ML con CK puede disminuir la dosis anestésica necesaria con efecto quirúrgico y/o mejorar sus efectos anestésicos en ratas, evaluado a través de reflejos de enderezamiento y de retirada.

Material y método

Animales de experimentación

El estudio fue realizado con 54 ratas Sprague-Dawley, hembras adultas sanas, con un peso de 205 ± 18 g (media $\pm$ DE). Los animales fueron mantenidos en jaulas convencionales, en grupos de seis animales, con cama sanitaria de viruta de madera irradiada, a una temperatura ambiente regulada ($22 \pm 2^\circ$ C) con un fotoperiodo L: O 12:12 (con luz encendido 8:00 h) y recibieron alimento en pellet comercial y agua *ad libitum*.

Los animales fueron aclimatados por un período de al menos 4 semanas antes del comienzo del estudio y fueron manipulados regularmente para habituarlos a los futuros procedimientos. Las ratas no fueron ayunadas antes de la administración de los fármacos para reducir el riesgo de hipoglucemia y deshidratación²³.

El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Morón. Los animales de experimentación fueron tratados siguiendo el código ético propuesto por el Canadian Council on Animal Care, como así también de acuerdo a las leyes argentinas.

Estudio preliminar

El objetivo del estudio preliminar fue establecer la dosis apropiada de agentes anestésicos. Las dosis de los fármacos utilizados fueron establecidas de acuerdo a nuestra experiencia previa y desde la bibliografía²⁷⁻²⁹.

Cada grupo estuvo conformado por seis ratas. Los animales fueron aleatoriamente asignados a uno de los seis grupos de tratamiento y recibieron ML (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) o CK (50 mg/ml, Ketonal 50®, Lab. Richmond, Argentina). La ML fue primero disuelta en etanol absoluto y luego diluida con solución salina al 0.9%; la concentración final de etanol fue menor a 1%. Todos los fármacos fueron administrados por la vía IP. El detalle del protocolo anestésico se muestra en la [tabla 1](#).

Estudio principal

Cada grupo experimental estuvo conformado por seis ratas. Los animales fueron aleatoriamente asignados a uno de los tres grupos de tratamiento y recibieron combinaciones de ML (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y CK (50 mg/m, Ketonal 50®, Lab. Richmond, Argentina). La ML fue preparada como en el

Tabla 2. Grupos de tratamientos ensayados durante el estudio principal

Grupo	Tratamiento	N	Combinación de fármacos	Dosis
7	ML15 + CK50	6	Melatonina + clorhidrato de ketamina	15 mg/kg + 50 mg/kg, IP
8	ML100 + CK35	6	Melatonina + clorhidrato de ketamina	100 mg/kg + 35 mg/kg, IP
9	ML100 + CK70	6	Melatonina + clorhidrato de ketamina	100 mg/kg + 70 mg/kg, IP

IP: vía intraperitoneal; N: número de animales ensayados.

Tabla 3. Protocolo y tiempos de la anestesia en ratas

Tiempo	Definición	Intervalo			
T0	Administración de fármacos	Tiempo de inducción anestésica (T0-T1)			
T1	Pérdida del RE		Tiempo de la anestesia general (T1-T4)		Tiempo de recuperación total (T1-T5)
T2	Pérdida del RR			Tiempo de la anestesia quirúrgica (T2-T3)	
T3	Retorno del RR				
T4	Recuperación del RE				
T5	Habilidad de caminar				

RE: reflejo de enderezamiento; RR: reflejo de retirada.

estudio piloto. Todas las combinaciones anestésicas fueron administradas por IP. El detalle del protocolo anestésico se muestra en la [tabla 2](#).

Procedimientos experimentales

Para evitar la penetración en vísceras, la inyección se realizó en el cuadrante abdominal izquierdo inferior de cada rata, utilizando una aguja 25 G x 5/8, con un volumen de dosificación ≤ 2.5 ml/rata. En el caso de la ML, también se ensayó con el vehículo, respetando los volúmenes de inyección.

El peso de las ratas fue determinada en gramos, individualmente, antes de la administración de los fármacos de ensayo. En los tratamientos combinados se inyectaron ambos fármacos juntos en la misma jeringa, para evitar una doble inyección. Todos los ensayos comenzaron a la misma hora por la mañana para minimizar los efectos de los ritmos circadianos sobre el metabolismo de los fármacos.

Evaluación de los efectos

Las acciones y profundidad de la anestesia fue supervisada registrando la respuesta al reflejo de

enderezamiento (RE) y al reflejo de retirada (RR)^{23,28}. Todas las pruebas fueron llevadas a cabo y evaluadas por el mismo operador.

La pérdida del RE fue utilizado como un índice de inducción de la anestesia. Después de la inyección IP de los fármacos, solos o sus combinaciones, los animales fueron dispuestos sobre una cama de viruta en una jaula, y a intervalos de 1 min fueron puestos suavemente en decúbito dorsal. Si las ratas no podían volver a su postura normal en 10 segundos, se consideró que los animales habían perdido su RE.

El RR fue evaluado por «pellizcamiento» de la región plantar metatarsal de los miembros posteriores (con una pinza de plástico atraumática). Este reflejo se probó cada 3 min, alternando entre las extremidades izquierdas y derechas, después que el RE se perdiera y hasta que este reflejo fuera recuperado. Las respuestas se calificaron en una escala del 0 al 2, con completa ausencia del reflejo, puntuación 0, y una respuesta fuerte de retiro, puntuación 2.

A partir de los tiempos de pérdida y recuperación de los reflejos registrados, se definieron cinco tiempos y cuatro intervalos ([Tabla 3](#)).

Tabla 4. Intervalos de la anestesia en ratas bajo distintos regímenes de anestesia (inyección intraperitoneal, tiempos en minutos, n = 6, media $\pm$ ESM)

Grupo	Tratamiento	Intervalos de la anestesia			
		TIA	TAG	TAQ	TRT
1	Control	0.0 $\pm$ 0.00 ^a	--	--	--
2	ML15	0.0 $\pm$ 0.00 ^a	--	--	--
3	ML100	5.2 $\pm$ 0.32 ^c	11.5 $\pm$ 0.55 ^a	2.3 $\pm$ 0.53 ^a	18.8 $\pm$ 0.54 ^a
4	CK35	0.0 $\pm$ 0.00 ^a	--	--	--
5	CK50	4.7 $\pm$ 0.17 ^c	13.7 $\pm$ 0.90 ^a	0.0 $\pm$ 0.00 ^a	26.3 $\pm$ 0.65 ^a
6	CK70	3.7 $\pm$ 0.25 ^b	32.5 $\pm$ 2.42 ^a	0.0 $\pm$ 0.00 ^a	36.8 $\pm$ 2.46 ^a

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

ESM: error estándar de la media; TAG: tiempo de la anestesia general; TAQ: tiempo de la anestesia quirúrgica; TIA: tiempo de inducción anestésica; TRT: tiempo de recuperación total.

Durante el tiempo de anestesia general (TAG), a partir de la pérdida del RE, se realizó el seguimiento de la frecuencia y las características de los movimientos ventilatorios (torácico o abdominal), parpadeo y movimientos de las vibrizas como evaluación global de la profundidad o para detectar cualquier complicación de la anestesia. Las ratas respiraron aire ambiental durante todo el experimento.

La temperatura rectal fue monitoreada mediante un termómetro digital introducido al menos 1 cm en el recto, a intervalos de 10 min después de la inyección. La temperatura corporal se mantuvo entre 37-38° C durante la anestesia utilizando una lámpara de calor. Cuando los ojos de las ratas permanecieron abiertos o parcialmente abiertos durante la anestesia (especialmente con CK o sus combinaciones), se aplicó solución salina estéril sobre los ojos para evitar la deshidratación corneal.

Análisis estadístico

Para el estudio preliminar, el análisis estadístico de los datos no paramétricos (intervalos de la anestesia) se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis de un factor. Para el estudio principal, el análisis estadístico de los datos (intervalos de la anestesia), al cumplir los supuestos del análisis de la varianza, se realizó mediante la prueba de ANOVA de un factor. En ambos estudios, el análisis estadístico fue seguido por contrastes múltiples (prueba de Tukey).

Todos los resultados se expresan como media $\pm$ ESM y las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SigmaStat versión 3.5 para Windows (Systat Software, 2006).

Resultados

Estudio preliminar

En la tabla 4 se muestran los valores (media $\pm$ ESM) para cada tratamiento (n = 6) e intervalos de la anestesia (n = 4), de acuerdo a lo mostrado en la [tabla 3](#). No se observaron signos de dolor o malestar abdominal después de la inyección IP.

De los tratamientos ensayados, el control de vehículo para la ML y las dosis menores de ML (15 mg/kg) y de CK (35 mg/kg) no produjeron efectos anestésicos. El resto de los fármacos y dosis produjeron inmovilidad completa con pérdida del RE dentro de los 5 min después de la inyección. En el tiempo de inducción anestésica (TIA) el análisis estadístico muestra que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.001$). De los grupos que entraron en anestesia, la inducción fue más rápida con CK70, y más lenta con CK50 y con ML100 (promedio 5.0 min) ($p < 0.05$) ([Tabla 4](#)).

En los tres intervalos restantes de la anestesia se comprobaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.001$). La ML100, el CK50 y el CK70 mostraron un efecto con respecto al TAG y al tiempo de recuperación total (TRT), aunque sin diferencias significativas ($p > 0.05$). Si bien la ML100 mostró en tres de las seis ratas ensayadas efectos que llevaron al animal al plano quirúrgico (tiempo de la anestesia quirúrgica [TAQ]), no se detectan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) comparado con los dos tratamientos con CK.

Las ratas de los grupos ML100 y CK50 estuvieron relativamente conscientes y parecían despertar fácilmente. Animales que recibieron CK70, si bien no

Tabla 5. Intervalos de la anestesia en ratas bajo distintos regímenes de anestesia (inyección IP, tiempos en minutos, n = 6, media $\pm$ ESM)

Grupo	Tratamiento	Tiempos de la anestesia			
		TIA	TAG	TAQ	TRT
1	ML15 + CK50	3.2 $\pm$ 0.44 ^a	18.8 $\pm$ 2.79 ^a	0.0 $\pm$ 0.00 ^a	28.3 $\pm$ 4.19 ^a
2	ML100 + CK35	2.5 $\pm$ 0.38 ^a	118.0 $\pm$ 2.41 ^b	24.7 $\pm$ 2.28 ^a	121.7 $\pm$ 2.46 ^b
3	ML100 + CK70	3.3 $\pm$ 0.71 ^a	163.3 $\pm$ 6.48 ^c	89.7 $\pm$ 3.51 ^b	182.7 $\pm$ 3.69 ^c

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

ESM: error estándar de la media; TAG: tiempo de la anestesia general; TAQ: tiempo de la anestesia quirúrgica; TIA: tiempo de inducción anestésica; TRT: tiempo de recuperación total.

entraron en plano anestésico quirúrgico, tuvieron un tiempo de recuperación anestésico más largo, aunque no significativamente mayor que los otros dos tratamientos.

Los animales con el tratamiento CK35, si bien nunca perdieron el RE, sí mostraron un comportamiento con desorientación, actividad hiperkinética y mayor reactividad durante un tiempo de 29.5 $\pm$ 0.08 min. En el tratamiento con CK70 se observa en las ratas un rápido inicio de acción del fármaco, que produce una marcada excitación conductual. Esto induce a un estado de hiperlocomoción que provoca movimientos espontáneos marcados, alternado con comportamiento de tipo cataleptoide, con una recuperación violenta. Por el contrario, con el tratamiento con ML100 se produjo una salida de la anestesia con un efecto sedante con adinamia, despertar de la anestesia tranquilo y una recuperación de la locomoción sin sobresaltos.

Estudio principal

En la [tabla 5](#) se muestran los valores (media $\pm$ ESM) para cada tratamiento (n = 3) e intervalos de la anestesia (n = 4), de acuerdo a lo mostrado en la [tabla 3](#).

Estos tres tratamientos con combinación de fármacos producen inmovilidad completa con pérdida del RE dentro de los 3 min después de la inyección IP. En el TIA, el análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

La ausencia del RE fue considerada como el inicio de la anestesia general (sedación e hipnosis). El TAG mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.001$), con una duración mayor de las combinaciones ML100 + CK35 y ML100 + CK70, mostrando diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p < 0.05$) ([Tabla 5](#)).

La ausencia del RR podal fue considerada como el inicio de la anestesia quirúrgica. El plano de anestesia

quirúrgico fue alcanzado por todas las ratas, menos una, del grupo ML100 + CK35, y por todas las ratas del grupo ML100 + CK70 ([Tabla 5](#)). El establecimiento de la anestesia quirúrgica tuvo una duración, desde la inyección IP (T0) hasta la pérdida del RR (T2), de 4.4 $\pm$ 0.37 min y 5.8 $\pm$ 0.47 min, respectivamente. La combinación ML15 + CK50 no logró llevar a los animales al plano quirúrgico y ninguna de las ratas en este grupo perdió el RR podal. El análisis estadístico del TAQ muestra que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.001$). La duración de la anestesia quirúrgica fue mayor con ML100 + CK70 comparado con ML100 + CK35 ($p < 0.05$) ([Tabla 5](#)).

El TRT mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.001$). La recuperación total de la anestesia, con deambulacion normal en los animales, muestra que fue más corto para la combinación ML15 + CK50, y más largo para la combinación ML100 + CK70, con diferencias significativas entre los tres tratamientos ($p < 0.05$) ([Tabla 5](#)).

Las ratas del grupo ML15 + CK50 estuvieron relativamente conscientes y parecían despertar fácilmente. En cambio, la recuperación completa en animales con las dos combinaciones de ML100 con CK35 y CK70 se prolongó en el tiempo. Aunque las ratas recuperaron el RE en un periodo relativamente corto, comportamentalmente parecían sedadas y no reaccionaban a estímulos sonoros durante un tiempo prolongado. Por otro lado, mientras que la combinación ML100 + CK70 tuvo una duración de la anestesia quirúrgica aproximadamente 3.6 veces mayor en comparación con la combinación ML100 + CK35 (89.7 vs. 24.7 min), mostró solamente un intervalo de recuperación 1.5 veces mayor (182.7 vs. 121.7 min) ($p < 0.05$). En los tres tratamientos combinados de ML con CK se produce una salida de la anestesia con un efecto sedante con adinamia, despertar de la anestesia tranquilo y una recuperación de la locomoción sin sobresaltos.

Los movimientos ventilatorios evaluados durante la anestesia mostraron un patrón predominantemente toracoabdominal y no se observaron apneas.

Discusión

Las dosis balanceadas deben ajustarse según las características de los fármacos anestésicos, el procedimiento quirúrgico y la duración de la anestesia requerida. Los protocolos anestésicos más utilizados en anestesia para ratas se basan en la combinación de dos fármacos.

El CK es un fármaco anestésico de uso humano y estándar en animales de laboratorio, y ha sido ampliamente utilizado en combinación con fármacos sedantes en roedores. Las benzodiacepinas y los tranquilizantes agonistas alfa 2 y la fenotiazina se han empleado en combinación con CK para proporcionar un estado más eficaz de anestesia general. La combinación CK/xilacina ha sido ampliamente utilizada para inducir anestesia en ratas^{23,30}. Esta combinación produce un inicio rápido de la anestesia general con buena analgesia y relajación muscular. Dosis de CK en el rango de 50-100 mg/kg y de xilacina 3-10 mg/kg proporcionan una anestesia quirúrgica de corta a moderada duración³¹. En Hajighahramani, et al.²⁸, la combinación xilacina-CK produce depresión respiratoria mayor que el midazolam-CK o acepromazina-CK.

Altas dosis de ML (312 mg/kg) administrada por vía intravenosa a ratas mostraron tener propiedad anestésica y produjeron efectos verificables sobre el registro EEG semejantes al producido bajo el efecto anestésico del tiopental y el propofol²¹.

Nuestro estudio evaluó los efectos anestésicos de la administración de ML, empleando dosis tres veces menores que las usadas por Naguib, et al.²¹. Los tiempos fueron mayores al asociarse con CK. La pérdida del RE fue considerada para evaluar el inicio de la anestesia, y la pérdida del RR como un índice de ingreso al plano anestésico quirúrgico. Si bien la ML con una dosis de 100 mg/kg (IP) en ratas produjo un efecto muy breve de anestesia quirúrgica, la combinación con CK en dosis de 35 y 70 mg/kg sí condujo a efectos comprobables de anestesia quirúrgica. De esta forma, la ML (100 mg/kg, IP) potencia los efectos anestésicos del CK (dosis de 35 y 70 mg/kg, IP), ya que ninguna de las dos dosis ensayadas de CK por sí solas indujo a los animales a un plano anestésico quirúrgico.

En un trabajo previo, Budhiraja, et al.¹⁷, con una dosis de 20 mg/kg de ML oral lograron potenciar el efecto anestésico de una dosis de CK de 50 mg/kg (IP) en

ratas. En nuestro caso, una combinación de ML15 + CK50 indujo anestesia, pero sin llegar al plano quirúrgico.

Una comparación entre los resultados obtenidos en el presente trabajo con las combinaciones de ML y CK que lograron anestesia quirúrgica y los datos presentados en Hajighahramani, et al.²⁸ con diversas combinaciones de CK con otros fármacos anestésicos se muestra en la [figura 1](#). Del gráfico se desprende que el TIA es semejante en duración. Si bien no pueden hacerse evaluaciones estadísticas, el TAG es de 2 a 3 veces mayor en la combinación anestésica de CK con ML en comparación con CK en combinación con otros fármacos. A su vez, el TAQ es también 3 veces mayor con la combinación ML100 + CK70 comparado con las otras combinaciones con CK75. El TRT también es mayor en nuestros ensayos, pero este efecto puede estar en relación con el mayor TAG.

El mecanismo por el cual los fármacos y sus combinaciones producen anestesia no ha sido aún totalmente comprendido. Se han demostrado diferentes efectos de los anestésicos generales sobre las sinapsis, más específicamente sobre los receptores, pero aún falta demostrar la relación de los efectos a escala celular con aquellos que forman parte de los componentes de la anestesia³².

Las evidencias de la participación de los sistemas de neurotransmisores en el mecanismo de acción de los sedantes y anestésicos son cada día más contundentes: estos ejercen sus efectos facilitando la transmisión inhibitoria o bloqueando la transmisión excitatoria. A nivel molecular, los anestésicos generales refuerzan la función del GABA en los receptores tipo A (GABA_A) en las sinapsis inhibitorias y bloquean la acción del glutamato en los receptores NMDA en sinapsis excitatorias³². Por lo tanto, parece que los anestésicos con diferentes perfiles farmacológicos actúan sobre canales iónicos dependientes del ligando diferentes y específicos para producir un comportamiento anestésico particular.

Los datos de modelos de rata *in vivo* han demostrado que tanto la ML como sus análogos más potentes, 2-bromomelatonina y fenilmelatonina, poseen propiedades anestésicas^{19,20,21}. Si el efecto anestésico de la ML se debe a un efecto directo sobre los receptores de la ML es aún desconocido. Los receptores de ML, en sí mismos, no se consideran habitualmente blancos moleculares para la acción anestésica general.

Por lo tanto, al explicar los efectos sinérgicos de la ML y del CK para producir sus efectos, se debe considerar: a) el efecto del CK sobre los receptores NMDA;

Figura 1. Gráfico comparativo entre los efectos de distintas combinaciones de anestésicos en ratas: Clorhidrato de ketamina (CK) con melatonina (ML), propofol (PP), xilacina (XC), midazolam (MZ) y acepromacina (AP) (los valores numéricos representan la concentración en mg/kg). Intervalos de la anestesia: TIA, inducción de la anestesia; TAG, duración de la anestesia general; TAQ, duración anestesia quirúrgica, y TRT, tiempo de recuperación total. Los tratamientos señalados con la letra *a* pertenecen a este trabajo ($n=6$ para cada uno, IP) y con la letra *b* desde Hajighahramani y Vesal²⁸ ($n=5$ para cada uno, IP). Media $\pm$ ESM.

b) el efecto de la ML sobre el sistema GABAérgico, y c) la posible interacción entre la ML y los receptores NMDA.

Es ampliamente conocida y muy bien descrita la acción del CK sobre los receptores glutamatérgicos NMDA³², donde el CK tiene un efecto antagonista no competitivo sobre la actividad de dichos receptores. Además, el CK muestra tener interacciones con la transmisión opioide²⁴. El CK tiene poco o ningún efecto demostrado sobre el receptor GABA_A en un intervalo de concentraciones clínicamente relevantes³³, aunque se ha reportado la potenciación de corrientes iónicas inhibitorias en la corteza olfatoria³⁴ y, en concentraciones más altas, en preparaciones hipocámpales³⁵.

La acumulación de evidencias indica que existe interacción entre los sistemas GABAérgico y melatonérgicos. Hay evidencias que sugieren que los efectos centrales de la ML implican, al menos en parte, la facilitación de la transmisión GABAérgica modulando al receptor GABA_A³⁶, como pueden ser bloqueados o revertidos por antagonistas de los receptores GABA_A. Varios estudios informaron que en la acción hipnótica de la ML está implicado el mecanismo GABAérgico³, y esta molécula aumenta la concentración de GABA en varias regiones del cerebro³⁷. Las benzodiazepinas y los barbitúricos se unen a sitios ligandos alostéricos del receptor GABA_A donde facilitan la transmisión GABAérgica inhibitoria y moduladora, y de esta forma

generan los efectos propios de estos agentes en la anestesia. La ML tiene afinidad por el receptor central de benzodiazepinas presente en el complejo receptor GABA_A³. Los experimentos electrofisiológicos en animales anestesiados también demuestran que la ML exhibe efectos semejantes al GABA³⁸.

Para referencias adicionales sobre la interacción entre la ML y el sistema GABAérgico, consulte las revisiones de Cardinali, et al.³⁹ y de Naguib, et al.³ sobre el tema.

Cada vez hay más evidencias de la acción inhibitoria de la ML sobre los canales glutamatérgicos. En un estudio se demostró que el tratamiento con ML contrarrestó la ansiedad inducida por la privación del sueño parcialmente a través de mantener un equilibrio entre la transmisión GABAérgica y glutamatérgica en la amígdala⁴⁰. Por lo tanto, el efecto ansiolítico de la ML fue, al menos parcialmente, a través de la regulación de la transmisión GABAérgica y glutamatérgica en la amígdala de la rata. La ML bloquea los receptores glutamatérgicos de kainato y NMDA⁴¹, y esta indolamina inhibe al glutamato o a la excitación inducida por NMDA en el estriado de la rata⁴². Además, la ML atenúa la expresión morfina-inducida del subtipo NR1 del receptor NMDA y disminuye la concentración de calcio a través de la modulación de la actividad de la PKC γ (proteín kinasa C γ) en la médula espinal⁴³. Experimentos electrofisiológicos han puesto de

manifiesto que la ML deprime la actividad inducida por NMDA en varias áreas del cerebro, por ejemplo, el estriado⁴⁴.

Hay evidencias que apoyan la idea que la disminución en el movimiento del Ca^{2+} está implicada en el efecto inhibitorio de la ML sobre la actividad del receptor NMDA. La activación de estos receptores depende de la liberación del bloqueo dependiente del voltaje por parte del Mg^{2+} desde el sitio interno de bloqueo del poro-canal del receptor NMDA, que a su vez puede afectar la corriente y el ingreso de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} tipo L y canales activados del receptor NMDA⁴⁵. La ML aumenta el efecto inhibitorio de Mg^{2+} sobre la actividad del receptor NMDA, y aumenta la afinidad del MK-801, un antagonista no competitivo, del canal de Ca^{2+} del receptor NMDA. Así, como resultado de la acción de la ML, el poro-canal del receptor NMDA permanece cerrado, evitando la apertura de canales de Ca^{2+} de tipo L y el ingreso del ion⁴⁶.

Anton-Tay, et al.¹² fueron los primeros en demostrar que la ML administrada exógenamente en humanos tiene propiedades hipnóticas y que la pérdida de conciencia está acompañada por un patrón de actividad electroencefalográfica similar a la observada durante la pérdida de conciencia inducida por anestesia intravenosa y volátil²¹. Desde hace más de una década se ha demostrado que la ML es efectiva como premedicación en pacientes quirúrgicos adultos y pediátricos^{1,2,47-49}. Desde la literatura se comprueba el uso periquirúrgico de la ML como fármaco ansiolítico o analgésico en pacientes humanos adultos, y se ha demostrado que produce una reducción estadísticamente significativa de la ansiedad prequirúrgica al utilizarse la ML como premedicación en comparación con un placebo¹⁰. También, la premedicación disminuye los requerimientos intraquirúrgicos de anestésicos intravenosos⁵⁰.

Nuestro trabajo va encaminado a documentar que el efecto de la ML combinada con anestésicos, en este caso CK, puede ser una opción para potenciar la inducción anestésica y disminuir las dosis requeridas.

Conclusiones

Los mecanismos exactos por los cuales anestésicos con diferente composición química y estructura producen anestesia general son aún desconocidos, pero una modulación sobre la función de los receptores GABA_A y NMDA ha sido reconocida como una importante y común vía subyacente a los efectos depresores de muchos de estos agentes.

En nuestro estudio se demuestra la existencia de un efecto combinatorio de una dosis de ML sobre el efecto anestésico generado por CK. La ML muestra efectos que aumentan los tiempos de la anestesia del CK, lo que puede indicar que la combinación de ambos fármacos puede ser útil para reducir las dosis individuales de una anestesia balanceada. Nuestro trabajo también muestra que la combinación ML con CK en ratas causó un inicio rápido de la anestesia, prolongó la duración de acción del CK y permitió alcanzar el plano quirúrgico. De tal forma, este estudio sugiere que la ML modula mecanismos implicados en la inducción de la anestesia por CK.

Estudios *in vitro* sugieren que la ML altera la transmisión GABAérgica modulando la función del receptor GABA_A , y se ha demostrado que la administración de ML produce aumentos significativos, dependientes de la dosis, en las concentraciones de GABA en el SNC. Por otro lado, es factible explicar la sinergia de la ML actuando sobre receptores NMDA para potenciar los efectos anestésicos del CK, un inhibidor de canales glutamatérgicos.

En conclusión, los resultados aquí presentados plantean importantes cuestiones sobre la participación de ciertos sistemas de neurotransmisores, tales como GABA y la transmisión excitatoria mediada por el receptor NMDA, en la producción de efectos anestésicos por parte de la ML, y en este caso, combinada con CK.

Aún son necesarios más trabajos para lograr una mayor comprensión acerca de las propiedades anestésicas generales de la ML a nivel molecular, celular y sistémico.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.

Financiación

Esta investigación fue financiada con fondos de la Fundación Universidad de Morón a través del subsidio Código15-001/16.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Bibliografía

- Naguib M, Samarkandi AH. The comparative dose-response effects of melatonin and midazolam for premedication of adult patients: a double-blinded, placebo-controlled study. *Anesth Analg*. 2000;91:473-9.
- Naguib M, Samarkandi AH, Moniem MA, Mansour Eel-D, Alshaer AA, Al-Ayyaf HA, et al. The effects of melatonin premedication on propofol and thiopental induction dose-response curves: a prospective, randomized, double-blind study. *Anesth Analg*. 2006;103(6):1448-52.
- Naguib M, Gottumukkala V, Goldstein PA. Melatonin and anesthesia: a clinical perspective. *J Pineal Res*. 2007;42(1):12-21.
- Kurdi MS, Patel T. The role of melatonin in anaesthesia and critical care. *Indian J Anaesth*. 2013;57(2):137-44.
- Marseglia L, D'Angelo G, Manti S, Aversa S, Arrigo T, Reiter RJ, et al. Analgesic, anxiolytic and anaesthetic effects of melatonin: new potential uses in pediatrics. *Int J Mol Sci*. 2015;16(1):1209-20.
- Impellizzeri P, Vinci E, Gugliandolo MC, Cuzzocrea F, Larcan R, Russo T, et al. Premedication with melatonin vs midazolam: efficacy on anxiety and compliance in paediatric surgical patients. *Eur J Pediatr*. 2017;176(7):947-53.
- Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacological Reports*. 2009;61:383-410.
- Dubocovich ML, Riviera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci*. 2003;8:1093-8.
- Golombek DA, Pevet P, Cardinali DP. Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996;20:403-12.
- Yousaf F, Seet E, Venkatraghavan L, Abrishami A, Chung F. Efficacy and safety of melatonin as an anxiolytic and analgesic in the perioperative period. A qualitative systematic review of randomized trials. *Anesthesiology*. 2010;113:968-76.
- Cervino CO, Hernando M. La melatonina como agente antioxidante: análisis de estrés oxidativo en un modelo animal con exposición a hieiro. *Rev. de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UM)*. 2015;13:89-103.
- Anton-Tay F, Diaz JL, Fernandez-Guardiola A. On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implications. *Life Sci*. 1971;10: 841-50.
- Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, et al. Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Ther*. 1995;57: 552-8.
- Cramer H, Rudolph J, Consbruch U, et al. On the effects of melatonin on sleep and behavior in man. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1974;11: 187-91.
- Kostoglou-Athanassiou I. Therapeutic applications of melatonin. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* 2013; 4(1): 13-24.
- Mowafi HA, Ismail SA. The uses of melatonin in anesthesia and surgery. *Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences*. 2014;2(3):134-41.
- Budhiraja S, Singh J. Adjuvant effect of melatonin on anesthesia induced by thiopental sodium, ketamine, and ether in rats. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*. 2005;27:697-9.
- Miyoshi H, Ono T, Sumikawa K. Melatonin reduces minimum alveolar concentration for isoflurane in rats. *Anesthesiology*. 2001;95:A-113.
- Naguib M, Hammond DL, Schmid PG 3rd, Baker MT, Cutkomp J, Queral L, et al. Pharmacological effects of intravenous melatonin: comparative studies with thiopental and propofol. *Br J Anaesth*. 2003a;90:504-7.
- Naguib M, Baker MT, Flood P, Trieu V, Tao C. Melatonin and its analogs do not induce general anesthesia by potentiating the responsiveness of postsynaptic GABA receptors. *Am Soc Anesthesiol*. 2004;101:A817.
- Naguib M, Schmid PG III, Baker MT. 2003b. The electroencephalographic effects of IV anesthetic doses of melatonin: comparative studies with thiopental and propofol. *Anesth Analg*. 2003b;97 238-43.
- Rivera Tocancipá D, Susunaga Meneses P, Pérez G M. Ketamina: Estado del arte. *RFS Revista Facultad de Salud*. 2013;5(1): 83-93.
- Flecknell P. Laboratory Animal Anesthesia. 3.^a ed. Burlington: Academic Press; 2009.
- Sleigh J, Harvey M, Voss L, Denny B. Ketamine – More mechanisms of action than just NMDA blockade. *Trends in Anaesthesia and Critical Care*. 2014;4(2):76-81.
- Smiler KL, Stein S, Hrapkiewicz KL, Hiben JR. Tissue response to intramuscular and intraperitoneal injection of ketamine and xylazine in rats. *Lab Anim. Sci* 1990;40:60-4.
- Office of Animal Resources Institutional Animal Care and Use Committee. IACUC Guidelines: Anesthesia. University of Iowa; 2017 (consultado 5 de junio 2018). Disponible en: <https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>.
- Mantovani M, Kaster MP, Pertile R, Calixto JB, Rodrigues AL, Santos AR. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. *J Pineal Res*. 2006;41(4):382-9.
- Hajighahramani S, Vesal N. Evaluation of several drug combinations for intraperitoneal anaesthesia in adult male rats. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2007;8(2):106-15.
- Pechlivanova D, Dzambazova E, Kolev G, Petkova Z, Tchekalarova J. Effects of melatonin on stress-induced and diurnal variations of nociception in wistar and spontaneously hypertensive rats. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*. 2016;69(9):1223-30.
- Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Jr, Lang CM, Marshall WK. A comparison of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anesthesia in adult male rats. *Lab Anim Sci*. 1987;37:726-30.
- Fish RE. Pharmacology of injectable anesthetics. En: Kohn DF, Wixson SK, White WJ, Benson, GJ, editores. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. 1.^a ed. San Diego: Academic Press; 1997. p. 1-28.
- Cervino CO, Paladino MA. Acciones moleculares de los anestésicos. En: Aldrete Velasco J, editor. *Texto de anestesiología teórico-práctica*. México: Editorial El Manual Moderno; 2004. p. 69-83.
- Flood P, Krasowski MD. Intravenous anesthetics differentially modulate ligand-gated ion channels. *Anesthesiology*. 2000; 92:1418-25.
- Schofield CN. Potentiation of inhibition by general anesthetics in neurones of the olfactory cortex in vitro. *Pflügers Arch*. 1980; 383(3):249-55.
- Gage PW, Robertson B. Prolongation of inhibitory postsynaptic currents by pentobarbitone, halothane and ketamine in CA1 pyramidal cells in rat hippocampus. *Br J Pharmacol*. 1985;85:675-81.
- Wang F, Li J, Wu C, Yang J, Xu F, Zhao Q. The GABA_A receptor mediates the hypnotic activity of melatonin in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003; 74: 573-8.
- Xu F, Li JC, Ma KC, Wang M. Effects of melatonin on hypothalamic gamma-aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid, beta-endorphin and serotonin levels in male mice. *Biol Signals*. 1995;4:225-31.
- Stankov B, Biella G, Panara C, Lucini V, Capsoni S, Fauteck J, et al. Melatonin signal transduction and mechanism of action in the central nervous system: using the rabbit cortex as a model. *Endocrinol*. 1992;130:2152-9.
- Cardinali DP, Golombek DA. The rhythmic GABAergic system. *Neurochem Res*. 1998;23: 607-14.
- Zhang L, Guo HL, Zhang HQ, Xu TQ, He B, Wang ZH, et al. Melatonin prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: role of oxidative stress and balance between GABAergic and glutamatergic transmission. *Am J Transl Res*. 2017;9(5):2231-42.
- Kim Y, Kim H, Sung Y, Lee S, Kim C. The effect of melatonin on glutamate- and its subtype agonists- induced ion currents in rat hippocampal CA1 neurons. *The FASEB Journal*. 2007;21(6): A1277-A1277.
- Escames G, León J, López LC, Acuña-Castroviejo D. Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. *J Neuroendocrinol*. 2004;16(11): 929-35.
- Song L, Wu C, Zuo Y. Melatonin prevents morphine-induced hyperalgesia and tolerance in rats: role of protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptors. *BMC Anesthesiol*. 2015;15:12.
- El-sherif Y, Hogan MV, Tesoriero J, Wieraszko A. Factors regulating the influence of melatonin on hippocampal evoked potentials: comparative studies on different strains of mice. *Brain Res*. 2002;945:191-201.
- Rajadhyaksha A, Barczak A, Macias W, Leveque JC, Lewis SE, Konradi C. L-type Ca²⁺ channels are essential for glutamate-mediated CREB phosphorylation and c-fos gene expression in striatal neurons. *J Neurosci*. 1999;19:6348-59.
- Escames G, Acuña-Castroviejo D, León J, Vives F. Melatonin interaction with magnesium and zinc in the response of the striatum to sensorimotor cortical stimulation in the rat. *J Pineal Res*. 1998;24:123-9.
- Naguib M, Samarkandi AH. Premedication with melatonin: a double-blind, placebo-controlled comparison with midazolam. *Br J Anaesth*. 1999;82:875-80.
- Andersen LP, Werner MU, Rosenberg J, Gögenur I. A systematic review of peri-operative melatonin. *Anaesthesia*. 2014;69(10):1163-71.
- Hansen MV, Halladin NL, Rosenberg J, Gögenur I, Möller AM. Melatonin for pre- and postoperative anxiety in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(4):CD009861.
- Wilder-Smith OH, Ravussin PA, Decosterd LA, Despland PA, Bissonnette B, et al. Midazolam premedication and thiopental induction of anaesthesia: interactions at multiple end-points. *Br J Anaesth*. 1999;83:590-5.