

EFECTO DE DOS PROTOCOLOS ANESTÉSICOS, PROPOFOL VERSUS KETAMINA-XILACINA EN LA PRODUCCIÓN LAGRIMAL DE PERRAS SOMETIDAS A OVARIOHISTERECTOMÍA

Effect of two Anesthetic Protocols, Propofol Versus Ketamine-Xylazine in the Tear Production of Bitches Undergoing Ovariohysterectomy

Alvaro Luzio-Quiroga ^{1*}, Nancy Aranda-Mella ², Oscar Poblete-Lagos ² y Aura Jeldres-Bastías ¹

¹ Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Prat 855, Concepción, Chile. ² Actividad Privada, Concepción, Chile. *aluzio@santotomas.cl
Fono: 56-41-2108845. Fax: 56-41-2108916. Móvil: 093337648

RESUMEN

El uso de anestesia general para diferentes procedimientos es habitual en la clínica de animales de compañía. Durante su uso, la producción de lágrimas se reduce considerablemente siendo necesaria la atención de los ojos por parte del anestesista para prevenir los efectos adversos que conlleva la desecación de la superficie de la cornea. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción lagrimal de hembras caninas (*Canis lupus familiaris*), sometidas a dos protocolos de anestesia general, mediante la Prueba Lagrimal de Schirmer tipo I. Se aplicó a una población de 38 hembras que ingresaron a la Clínica Veterinaria Happy Puppy, Concepción (Chile), para el acto quirúrgico de ovariectomía. Las hembras se asignaron al azar en dos grupos de 19 individuos cada uno. Se les realizó un examen clínico y oftalmológico previo y se procedió a medir la producción lagrimal a tiempo cero (sin fármacos). Ambos grupos se premedicaron con acepromacina. Luego de la premedicación se tomaron muestras a los 5, 10 y 15 min. Un grupo se anestesió con la asociación Ketamina-Xilacina y el otro con Propofol y en el período anestésico se tomaron muestras a los 30; 35; 45 y 50 min, para finalmente medir a los 110 min. de comenzada la anestesia general. Se determinaron los efectos de la acepromacina y de cada uno de los protocolos anestésico sobre la producción lagrimal, en los tiempos ya indicados. Las diferencias en medias de la producción lagrimal en las pacientes para el período anestésico, entre ambos protocolos anestésicos correspondió a 12,72 mm \pm 3,33 mm, evidenciándose la mayor diferencia al min 50 del período anestésico. La premedicación y el período anestésico provocaron disminu-

ción de la producción lagrimal de una manera estadísticamente significativa ($P < 0,05$), al comparar estos valores con el tiempo cero. El período post anestésico también reveló una disminución estadísticamente significativa.

Palabras clave: Test de Schirmer, ketamina-xilacina, propofol.

ABSTRACT

The use of general anesthesia for various procedures is common in the small animals clinic. During use, tear production is greatly reduced, the eye care being required by the anesthetist, to prevent adverse effects associated desiccation of the surface of the cornea. The aim of this study was evaluate tear production of female dogs (*Canis lupus familiaris*) by Schirmer tear test type I. The test was performed in a population of 38 females who entered the Happy Puppy Veterinary Clinic, Concepción (Chile), for surgical ovariohysterectomy. Females were randomized into two groups of 19 subjects each one. Patients underwent clinical and ophthalmological examination prior proceeded to measure tear production in zero time (without drugs). Both groups were premedicated with acepromazine. After premedication was sampled at 5, 10 and 15 min. One group was anesthetized with ketamine-xylazine association and the other with propofol in the anesthetic period and samples were taken at 30, 35, 45 and 50 min, finally measured at 110 min into general anesthesia. Effects were determined and acepromazine each anesthetic protocols on tear production in the times indicated above. Differences in mean tear production in patients for anesthetic period, between the two anesthetic protocols, corresponded to 12.72 mm \pm 3.33 mm, showing the greatest difference in the 50th min of the anesthetic period. Premedication and anesthetic period, caused

decreased tear production in a statistically significant ($P < 0.05$), when comparing these values with zero time. The post anesthetic period also revealed a statistically significant diminution.

Key words: Schirmer tear test, ketamine-xilacine, propofol.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los procedimientos quirúrgicos más habituales en las clínicas veterinarias se encuentra la gonadectomía, que en hembras hace referencia a la ooforectomía y ovariectomía, siendo necesario para este tipo de procedimientos, anestesia general [10]. El uso de anestésicos generales, como la asociación anestésica ketamina-xilacina y el propofol, tiene diferentes efectos adversos, siendo uno de ellos la disminución de la producción lagrimal [2, 7, 8, 24, 25]. En general, los agentes anestésicos tienen mayores efectos secundarios cuando se emplean solos, por lo que se deben seguir protocolos anestésicos en donde se utilicen múltiples fármacos en bajas dosis, con la finalidad de obtener la anestesia general equilibrada [1].

Las lágrimas o mejor llamada Película Lagrimal Precorneal (PLP), además de lubricar el ojo, cubren las necesidades metabólicas de las capas superficiales de la córnea avascular, entregando glucosa, oxígeno y agua. Asimismo, remueve detritus celular y bacterias que de otra forma se acumularían sobre la superficie corneal [11]. Su composición es 99% agua, además de productos antibacterianos, sales inorgánicas, glucosa, urea y proteínas como lactoferrina e inmunoglobulina A. Esta PLP está conformada por tres estratos que difieren en composición, con un espesor de casi $7\mu\text{m}$ [18]. La primera capa de composición lipídica, de un grosor de aproximadamente $0,1\mu\text{m}$ es secretada por las glándulas tarsales, esta película proporciona una capa fina, oleosa, que cubre la capa acuosa de las lágrimas, lo que retarda su evaporación y genera una distribución uniforme de las lágrimas a lo largo de toda la córnea [13, 25]. La capa media (acuosa), tiene un mayor predominio de agua, secretada por la glándula lagrimal principal y la glándula seromucosa [17]. Y por último la capa interna, tiene un espesor de aproximadamente 1 a $2\mu\text{m}$ y está formada por glucoproteínas hidratadas derivadas de las células caliciformes conjuntivales [17], este componente precorneal de mucina cubre cualquier irregularidad que exista en la superficie corneal, por lo tanto, la superficie ocular es ópticamente lisa [4, 7, 13, 17, 20, 25]. Estas lágrimas son drenadas por el aparato nasolagrimal, a través de los puntos y canaliculos lagrimales, los cuales desembocan en el conducto nasolagrimal, llegando al orificio nasal, próximo a las narinas externas [13, 17, 20, 25].

Los factores que afectan la producción lagrimal pueden dividirse en problemas de producción y drenaje. Así, tanto el aumento de la producción lagrimal (lagrimeo) como la disminución de la misma (Queratoconjuntivitis Seca -QCS-) son frecuentes en las especies domésticas [6, 14, 15, 25].

El sistema productor de lágrimas es evaluado de manera cualitativa mediante un examen de humedad observando la superficie ocular y cuantitativamente mediante métodos de ensayo conocidos para la medición de la producción lagrimal, como la Prueba del Hilo Rojo de Fenol (PHRF) y la Prueba Lagrimal de Schirmer (PLS) [21, 23]. La PHRF consiste en un hilo de 75 mm de largo, impregnado con rojo fenol, que es un indicador de pH sensible, que se coloca en la bolsa conjuntival inferior durante 15 seg . La lágrima alcalina torna el hilo rojo a un amarillo pálido. Los valores de referencia para esta prueba son de 30 a 38 mm en 15 seg [18, 22]. La PLS valora cuantitativamente el componente acuoso de la película lagrimal precorneal, y por tanto, ayuda a diagnosticar la QCS. El procedimiento se realiza con tiras de papel absorbente estéril (en envases individuales) con una muesca ubicada a cinco mm del extremo [17, 20, 25]. Se debe procurar doblar la muesca sin tocarla con los dedos antes de sacarlas de su envoltorio, la tira se coloca en el saco conjuntival inferior, entre el canto lateral y medial, con el extremo doblado en el fornix y la muesca en el borde palpebral [25]. Este test evalúa la producción basal y refleja del paciente, por lo que se han desarrollado dos métodos, PLS tipo I (PLS I) y la PLS tipo II (PLS II), en donde esta última utiliza anestesia tópica y evalúa la producción de lágrimas basal y PLS I se encarga de la medición refleja. La medición de producción lagrimal refleja es la más utilizada y en condiciones clínicas habituales, los resultados de la PLS I se interpretan, en general, de la siguiente manera: $25\text{-}16\text{ mm/min}$, producción normal; $16\text{-}14\text{ mm/min}$, QCS en fase precoz o subclínica; $6\text{-}10\text{ mm/min}$, QCS moderada o en grado medio; 5 mm/min , QCS grave [3, 4, 13].

El objetivo de este estudio fue comparar los valores de producción lagrimal mediante el uso de la PLS I, en un grupo de hembras caninas (*Canis lupus familiaris*) sometidas a ovariectomía, premedicadas con acepromacina y bajo los efectos anestésicos de ketamina-xilacina versus propofol.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron 38 hembras caninas que fueron ingresadas a la Clínica Veterinaria "Happy Puppy" de la ciudad de Concepción, Chile, para ser sometidas a ovariectomía. Para el cálculo del tamaño de la muestra, se utilizó la fórmula para contraste de dos medias, para un test bilateral, con un nivel de confianza del 95% , un poder estadístico del 90% , precisión de 3 y una varianza de 16 ; dando un tamaño de la muestra de 37 individuos, con la intención de dejar dos grupos con igual número de individuos, se aproximó a 38 [8, 28].

Todas ellas clínicamente sanas, se sometieron a examen clínico general y oftalmológico. Las edades fluctuaron entre 1 a 6 años, de condición corporal entre 3 y $3,5$ (escala de 1 a 5) y sin riesgo quirúrgico. A los propietarios de las pacientes se les solicitó la aprobación, mediante un consen-

miento escrito, advirtiendo e informando a éstos el procedimiento al que se vería afecto la paciente.

Fueron distribuidas de manera aleatoria en dos grupos, de 19 individuos cada uno. Ambos grupos fueron premedicados con 0,1mg/kg de acepromacina por vía intramuscular. La inducción y mantención de anestesia se realizó por vía endovenosa, con 5 mg/kg de Ketamina más 1 mg/kg Xilacina, y 4 mg/kg de propofol para el Grupo 1 y 2, respectivamente; los cuales fueron administrados en bolos, de acuerdo a dosis respuesta [11, 19].

Se procedió a medir la producción lagrimal antes de la administración de los fármacos, este acto se denominó tiempo cero (t_0), y se realizó con la PLS I, que consistió en aplicar una tira del papel filtro Wathman N° 40, la que se coloca en el fórnix de la conjuntiva del párpado inferior de cada ojo, introduciendo los primeros 5 mm y manteniéndola en esta posición por un período de 1 min. Pasado este tiempo se retiró el papel filtro considerando como valor de la producción de lágrimas la porción humedecida de la tira, expresada en milímetros, descartando los primeros 5 mm introducidos en el fórnix conjuntival [5] y determinando el flujo lagrimal en milímetros por min [17], con el fin de dejar constancia de la producción refleja de lágrimas. Luego se administró la premedicación (acepromacina) por vía intramuscular y se procedió a la medición a los 5 (t_1); 10 (t_2) y 15 (t_3) min siguientes, siendo esto válido para ambos grupos. Luego de 15 min post-premedicación, se realizó una toma de muestra para el período anestésico, esto al min 30 (t_4) y se continuó la medición, durante la mantención anestésica, en los min 35 (t_5), 45 (t_6) y 50 (t_7). Finalizado el procedimiento quirúrgico, se registró la última muestra al min 110 (t_8). (FIG.1).

El estudio realizado fue de tipo descriptivo [28], obteniendo promedios de la producción lagrimal de ambos ojos, con la PLS I y expresado en milímetros por min.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se registraron y anotaron en una planilla Excel, para ser posteriormente tabulados en el programa estadístico Prisma 6 [28]. Se utilizó ANDEVA, que permite comparar diferentes rangos de datos, en este estudio están re-

presentados por los dos protocolos. Para que un resultado sea significativo P debe ser $<0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La FIG. 2 indica los valores promedios de ambos ojos, obtenidos en tiempo cero y luego de administrar acepromacina, para los dos grupos del estudio, realizadas a los 5; 10 y 15 min tras su administración. Las pacientes, bajo los efectos del tranquilizante se mostraron deprimidas y con protrusión del tercer párpado. Los valores obtenidos mediante la aplicación de la PLS I se situaron entre los 26 y 11 mm/min durante los min 0; 5; 10 y 15 de la toma de muestra, posterior a la aplicación del pre-anestésico. Al análisis estadístico ANDEVA, se observan diferencias significativas a los 10 y 15 min comparados con el tiempo cero ($P < 0,05$). De los resultados obtenidos en distintos tiempos durante el período pre-anestésico, muestra que la producción lagrimal disminuyó después de administrado el fármaco y mantuvo esta tendencia conforme pasaba el tiempo. De acuerdo a Dodam y col [9], esta situación quizás corresponda a la afección del metabolismo de la glándula lagrimal, producto del uso de tranquilizantes, quien evaluó distintas asociaciones de fármacos de administración intramuscular, entre ellos la acepromacina. Ocurre algo similar en el paciente felino, donde la producción lagrimal disminuye pero por un corto período de tiempo, como lo señala Ghaffari y col. [12], quienes estudiaron la acepromacina en la producción lagrimal en gatos (*Felis catus*), atribuyendo esta disminución a una posible afección nerviosa de la glándula lagrimal. Es importante señalar que no hay estudios publicados a la fecha acerca del comportamiento de la acepromacina, que por sí sola afecte la producción lagrimal en perros [12].

En la FIG. 3 se observa los valores promedios de ambos ojos, obtenidos por las diferentes mediciones de ketamina-xilacina y propofol tras su administración. Las pacientes de este estudio mostraron disminución de la producción lagrimal y esto fue reflejado en el resultado de la PLS I. Cabe destacar que gráficamente hay claras evidencias que muestran que el uso de propofol causa menor alteración en la producción lagrimal en comparación al uso de la asociación ketamina-xilacina.

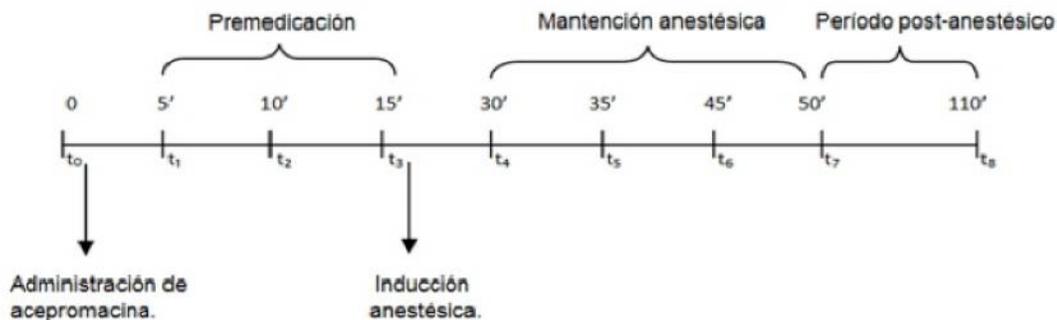


FIGURA 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LAS MEDICIONES DE LA PRODUCCIÓN LAGRIMAL CON LA PRUEBA DE SCHIRMER TIPO I.

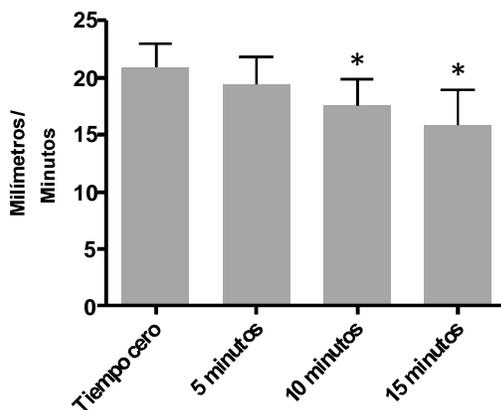


FIGURA 2. RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS PROMEDIOS DE AMBOS OJOS, EN LA MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN LAGRIMA, MEDIANTE LA PRUEBA LAGRIMAL DE SCHIRMER TIPO I (EXPRESADO EN MILÍMETROS/MINUTO), AL MINUTO 0, 5, 10 Y 15 POSTERIORES A LA APLICACIÓN DE ACEPROMACINA, EN AMBOS GRUPOS (N=38).

Análisis estadístico ANDEVA, * Revela diferencias estadísticamente significativas con respecto al tiempo cero. T Desviación estándar.

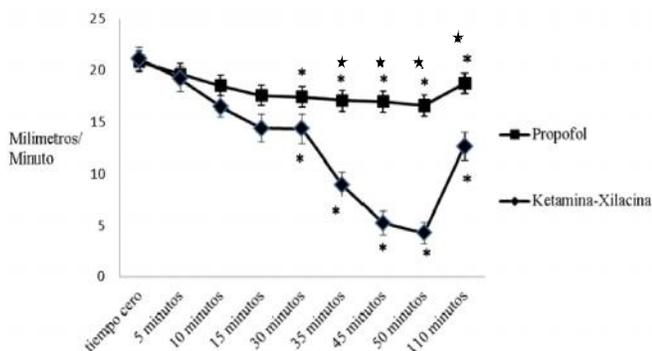


FIGURA 3. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LÁGRIMAS MEDIANTE LA PRUEBA LAGRIMAL DE SCHIRMER TIPO I, DURANTE LA PREMEDICACIÓN Y EL PERÍODO ANESTÉSICO (EXPRESADO EN MM/MIN), EN AMBOS GRUPOS (N=38).

Análisis estadístico ANDEVA, * Revela diferencias estadísticamente significativas, de cada protocolo anestésico con respecto a su tiempo cero.

★ Revela diferencias estadísticamente significativas entre protocolos anestésicos, para el mismo tiempo.

I Desviación estándar.

Esta diferencia puede ser asociada a la mantención de los párpados semicerrados y cerrados durante la cirugía bajo los efectos del propofol, registrando a catorce pacientes con los ojos semicerrados y a cinco de ellos con los párpados totalmente cerrados, situación que contribuyó a mantener la humedad de las córneas [15, 16, 26, 27].

Al análisis estadístico ANDEVA se demuestra que existe diferencia significativa en la producción lagrimal entre ambos protocolos a los 35; 45; 50 y 110 min; como también, de cada uno de ellos con respecto al tiempo cero, desde el min 30 en adelante, puesto que el valor P es menor a 0,05. Observando las medias, se puede afirmar que el anestésico propofol, en promedio causó un menor impacto en la medición de la producción lagrimal y su efecto, por lo tanto, fue menos nocivo para las córneas de las pacientes de este estudio. Esta situación se asemeja a los resultados del estudio realizado por De Sousa y col. [8], en donde la comparación de tiopental y propofol resultó en una disminución de la producción lagrimal al min diez posterior a la administración de dichos anestésicos, aunque sin una diferencia estadísticamente significativa, evento que quizá se debió a que los pacientes fueron evaluados en posición de decúbito lateral izquierdo, producto de una inclinación espontánea tras administrar el anestésico.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se pudo observar que la premedicación con acepromacina disminuye la producción lagrimal de las pacientes de una manera estadísticamente significativa.

De la misma manera se puede concluir que, ambos protocolos anestésicos presentan disminuciones estadísticamente significativas en la medición de la producción lagrimal, con respecto al tiempo cero, durante la realización de una ovariectomía y en el postoperatorio inmediato. Siendo la administración endovenosa de la asociación anestésica ketamina-xilacina la que presenta mayor impacto en la mediciones de producción lagrimal.

Por lo antes expuesto se recomienda una preocupación especial de los anestesiólogos sobre la salud ocular de los pacientes que están siendo anestesiados, como también, el uso de productos protectores de la córnea para disminuir posibles lesiones durante la anestesia general.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAMS, H.R. Anestésicos inyectables. **Farmacología y terapéutica veterinaria**. 2da. Ed. Acribia. Zaragoza. Pp 225-282. 2003.
- [2] ÁLVAREZ, C. Efectos de la asociación anestésica Ketamina, Xilacina y Atropina sobre la presión intraocular y la producción lagrimal en gatos (*Felis catus*). Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad San Sebastian, Concepción, Chile. Tesis de Grado. Pp 39. 2010.
- [3] BERGER, S.; KING, V. The Fluctuation of Tear Production in the dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 34: 79-83. 1998.
- [4] BROADWATER, J.; COLITZ, C.; CARASTRO, S.; SAVILLE, W. Tear production in normal juvenile dogs. **Vet. Ophthalmol.** 13(5): 321-325. 2010.

- [5] CARASTRO, S.M. Equine ocular anatomy and ophthalmic examination. **Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.** 20(2): 285-299. 2004.
- [6] COUSEN, P.; CACKETT, P.; BENNETT, H.; SWA, K.; DHILLON, B. Tear production and corneal sensitivity in diabetes. **J. Diabet. Complicat.** 21(6): 371-373. 2007.
- [7] CULLEN, C.L.; LIM, C.; SYKES, J. Tear film breakup times in young healthy cats before and after anesthesia. **Vet. Ophthalmol.** 8:159-165. 2005.
- [8] DE SOUSA, K.; BATISTA, A.; BARROS, R.; FERREIRA, P.; SCHIMITZ, T. A comparison of the effects of Propofol and Thiopental on tear production in dogs. **Rev. Ceres. Viçosa.** 57: 757-761. 2010.
- [9] DODAM, J.; BRANSON, K.; MARTIN, D. Effects of intramuscular sedative and opioid combinations on tear production in dogs. **Vet. Ophthalmol.** 1(1): 57-59. 1998.
- [10] FOSSUM, T.W. Cirugía de los sistemas reproductivo y genital. En: Fossum, T.W. (Ed) **Cirugía en pequeños animales.** Intermédica. Buenos Aires, Argentina. Pp 559-562. 1999.
- [11] GARCÍA, G.; ELISSER, Y.; CALDERON, J. Patologías oftálmicas asociadas a alteraciones de los componentes de la película precorneal. **Cien. Vet.** 6: 207-239. 1994.
- [12] GHAFARI, M.; MALMASI, A.; BOKAIE, S. Effect of acepromazine or Xilacine on tear production as measured by Schirmer tear test in normal cats. **Vet. Ophthalmol.** 13: 1-3. 2010.
- [13] GULIANO, E.; MOORE, C.; GRAHN, B.; SANDMEYER, L. Diseases and Surgery of the canine tear and nasolacrimal systems. In: Gelatt, K. (Ed). **Essentials of Veterinary Ophthalmology.** 2da. Ed. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA. Pp 79-96. 2008.
- [14] HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.; ADAMS, V. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. **Vet. Ophthalmol.** 9: 53-57. 2006.
- [15] HERRING, I.P.; PICKETT, J.P.; CHAMPAGNE, E.S.; MARINI, M. Evaluation of aqueous tear production in dogs following general anesthesia. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** 36: 427-430. 2000.
- [16] MENDES, C.; LAUS, J.; NUNES, N.; DOS SANTOS, P.; OLIVEIRA, J. Evaluation of intraocular and partial CO2 pressure in dogs anesthetized with propofol. **Vet. Ophthalmol.** 3: 17-19. 2000.
- [17] MILLER, P.E. Sistema Lagrimal. En: Slatter, K.N. (Ed). **Fundamentos de oftalmología veterinaria.** 4ta. Ed. Elsevier, Barcelona, España. Pp 161-178. 2009.
- [18] MORENO, J.S. Determinación de patrones referenciales de producción de lágrimas, empleando la prueba lacrimonal de Schirmer, en caninos aparentemente sanos de la clínica de animales menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Tesis de Grado. Pp 50. 2006.
- [19] PARWON, P.F. Anesthetic agents. In: Madisson, J.; Page, S.; Church, D. (Eds). **Small Animal Clinical Pharmacology.** 2da. Ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, USA. Pp 83-125. 2008.
- [20] PETERSEN-JONES, S.; STANLEY, R.; SMITH, R.; SMITH, J. Secreción ocular. En: Peiffer, R.; Petersen-Jones, S. (Ed) **Oftalmología de pequeños animales.** 3ra. Ed. Elsevier, Madrid, España. Pp 219-253. 2002.
- [21] PICCIONE, G.; GIANETTO, C.; FAZIO, F.; GUIDICE, E. Daily rhythm of tear production in normal horse. **Vet. Ophthalmol.** 1: 57-60. 2008.
- [22] PINTO, A.; CUNHA, F.; COSTA, B. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. **Cien. Rural.** 38: 568-575. 2008.
- [23] SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. **Vet. Ophthalmol.** 2: 173-178. 1999.
- [24] SHEPARD, M.; ACCOLA, P.; LÓPEZ, A.; SHAUGHNESSY, M.; HOFMEISTER, E. Effect of duration and type of anesthetic on tear production in dogs. **Am. J. Vet. Res.** 72: 608-612. 2011.
- [25] TURNER, S.; NIND, F. Sistema Nasolagrimal. En: Turner, S.; Nind, F. (Eds). **Oftalmología de pequeños animales.** Elsevier, Barcelona, España. Pp 91-120. 2010.
- [26] WHITE, E.; CROSSE, M. The aetiology and prevention of peri-operative corneal abrasions. Blackwell Science. **Anaesth.** 53: 157-161. 1998.
- [27] ZABALETA-GIBAJA, R. Acción neuroleptoanaléptica de la asociación ketamina-xilacina-atropina en tres dosis en caninos adultos criollos de la altura. En: **I Concurso descentralizado de investigación de fármacos de uso en medicina veterinaria.** Agrovot market. 2006. Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Puno, Marzo. Peru. Pp 7. 2007.
- [28] ZAR, J.H. Measures of Central Tendency. Two-Sample Hypotheses. Multisample Hypotheses: The Analysis of Variance. **Biostatistical Analysis.** 3ra Ed. Prentice Hall, New Jersey, USA. Pp 20-31; 122-160; 177-207. 1996.