



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
CAMPUS BÁRBULA



**ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS CONTRÁCTILES Y DILATADORAS
DEL MÚSCULO LISO BRONQUIAL AL MANITOL Y AL SULFATO DE
MAGNESIO**

AUTORES:

Camacho Luisa

Carmeza Edwin

Castro María

Colmenares Angélica

Bárbula, Noviembre 2011



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
CITOTECNOLOGÍA



**ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS CONTRÁCTILES Y DILATADORAS
DEL MÚSCULO LISO BRONQUIAL AL MANITOL Y AL SULFATO DE
MAGNESIO**

AUTORES:

Camacho Luisa

Carmeza Edwin

Castro María

Colmenares Angélica

TUTOR:

Dr. Antonio Eblen

Trabajo de Grado presentado para optar al Título de Técnico Superior
Universitario en Citotecnología

Bárbula, Noviembre 2011



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
DIRECCIÓN DE ESCUELA
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y PRODUCCIÓN INTELECTUAL



CONSTANCIA DE APROBACIÓN

Quienes suscribimos, Prof. Lisbeth Loaiza, Directora de Escuela; y Prof. Maira Carrizales, Coordinadora del Comité de Investigación y Producción Intelectual de la Escuela, hacemos constar que una vez obtenidas las evaluaciones del tutor, jurado evaluador del trabajo en presentación escrita y jurado de la presentación oral del trabajo final de grado titulado: **“ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS CONTRÁCTILES Y DILATADORAS DEL MÚSCULO LISO BRONQUIAL AL MANITOL Y AL SULFATO DE MAGNESIO”**, cuyos autores son los bachilleres **Camacho Luisa, Carneza Edwin, Castro María y Colmenares Angélica**, presentado como requisito para obtener el título de Técnico Superior Universitario en Citotecnología, el mismo se considera **APROBADO.**

En Valencia, a los veintiséis días del mes de Octubre del año 2011.

Prof. Lisbeth Loaiza Prof. Maira Carrizales
Directora Coordinadora



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS



CAMPUS BÁRBULA

**Estudio De Las Respuestas Contráctiles Y Dilatadoras Del Músculo Liso
Bronquial Al Manitol Y Al Sulfato De Magnesio**

Autores: Camacho Luisa, Carneza Edwin, Castro María, Colmenares Angélica

Tutor: Dr. Antonio Eblen

RESUMEN

En las vías respiratorias uno de los problemas más importantes, para permitir el paso del flujo de aire a los alvéolos y su expulsión, es mantenerlas dilatada. Un gran número de patologías respiratorias obstructivas se producen debido al estrechamiento de los bronquios y los bronquiolos, a menudo debido a la contracción del músculo liso. Se sabe que sustancias iónicas de uso clínico y de bajo costo, como es el magnesio, tienen efectos broncodilatadores. Por otro lado sustancias usadas en pacientes con cuidados críticos, como el manitol, han mostrado efectos broncoconstrictores. El objetivo de este estudio es evaluar las respuestas contráctiles del músculo liso traqueal ante el Manitol o el Magnesio así como los cambios citomorfológicos traqueales que estas sustancias inducen. Este es un estudio experimental con tres grupos de 18 ratas macho de aproximadamente 400g. El protocolo experimental consistió en superfundir los anillos de la tráquea con Solución Fisiológica durante 5 minutos, seguido de la solución de prueba con Manitol o Sulfato de Magnesio por 5 minutos. Los efectos sobre los parámetros citomorfológicos traqueales fueron evaluados en 6 ratas de iguales características mediante extendidos por raspados de tráqueas previamente sumergidas durante 5 minutos en Solución Fisiológica, Manitol o Sulfato de Magnesio. Ya comparados los valores promedio de las áreas de los anillos traqueales superfundidos con Manitol versus con Sulfato de Magnesio no se demostró diferencias significativas, pero se pone de manifiesto variaciones rítmicas que muestran la prevalencia de la dilatación causada por el Magnesio por encima de la constricción causada por Manitol.

Palabras Clave: Broncoconstricción, Broncodilatación, Manitol, Magnesio, Procesamiento de Imágenes



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS

CAMPUS BÁRBULA



**Study Of Contractile And Relaxing Responses Of The Bronchial Muscle To
Manitol And To Magnesium Sulphate**

Authors: Camacho Luisa, Carneza Edwin, Castro María, Colmenares Angélica

Tutor: Dr. Antonio Eblen

SUMARY

In the airways one of the most important inconvenient, to allow passage of air flow to the alveoli and expulsion, is to keep them dilated. A large number of obstructive respiratory diseases occur due to narrowing of the bronchi and bronchioles, often due to the contraction of smooth muscle. It is known that ionic substances in clinical use and inexpensive, such as magnesium, have bronchodilator effects. On the other hand substances used in critical care patients, such as mannitol, have shown bronchoconstrictors effects. The objective of this study is to evaluate the responses contractile tracheal smooth muscle with mannitol or magnesium as well as cytomorphologic changes tracheal that these substances induce. This is an experimental study with three groups of 18 male rats of 400g. The experimental protocol consisted of superfund to the tracheal rings with saline for 5 minutes, followed by the test solution with mannitol or magnesium sulfate for 5 minutes. The effects on cytomorphologic tracheal parameters were assessed in 6 rats of the same characteristics through outstretched by scraping tracheae previously submerged for 5 minutes in saline, mannitol, or magnesium sulfate. When compared the average values the areas of tracheal rings superfund with Mannitol vs with magnesium sulfate is not demonstrated significant difference but is manifest rhythmic variations that show the prevalence of caused dilation by magnesium above constriction for Mannitol.

**Keywords: Bronchoconstriction, Bronchodilation, Mannitol,
Magnesium, Image Processing.**

INTRODUCCIÓN

En las vías respiratorias uno de los factores de más importancia, para hacer posible el intercambio de aire entre los alvéolos y la atmósfera, es su diámetro. El sistema traqueo-bronquial posee paredes formadas por músculo liso cuyo tono controla el diámetro de la vía. Una gran cantidad de patologías obstructivas respiratorias se producen debido a la reducción de la luz bronquial frecuentemente debido a una excesiva contracción del músculo liso en sí (1).

El asma bronquial es una enfermedad inflamatoria de las vías aéreas a la que se asocia una intensa hiperreactividad bronquial frente a diversos estímulos. En este sentido varias sustancias que se forman en los propios pulmones (histamina), y, algunas administradas clínicamente, frecuentemente producen contracciones o dilataciones bronquiolar (1,4).

Entre 1989 y 1999 en Venezuela se observó un gran incremento de consultas por asma ocupando el segundo lugar como causa de consulta en toda la red ambulatoria nacional. Para el 2006 más de 1 millón de visitas al año caracterizan la morbilidad por asma aguda en los servicios ambulatorios públicos de Venezuela que atienden a un 80% o más de la población (5,6). A esta alta morbilidad se añade los elevados costos de los medicamentos que deben ser administrados a los pacientes, no solo para el tratamiento de las crisis, si no también el mantenimiento del tratamiento profiláctico, estos costos hacen difícil el cumplimiento de dichos tratamientos, lo cual incrementa la prevalencia de esta patología.

Existen diversas morfológicas técnicas aplicables en el estudio de enfermedades del tracto respiratorio. Uno de los de mayor eficacia es la citología respiratoria por cepillado bronquial mediante broncoscopia con fibra óptica, la cual ofrece una importante descamación celular del epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado con células caliciformes y células basales predominante en el árbol traqueobronquial (2,3). Sin embargo, en el estudio de la contracción del músculo liso traqueobronquial, dada la gran cantidad de factores fisiológicos y

fisiopatológicos relacionados, se requiere la utilización de técnicas citomorfológicas y funcionales para un adecuado estudio de la patología de la vía aérea pulmonar.

Recientemente se ha reportado que sustancias iónicas de uso clínico y de bajo costo, como es el caso del magnesio, un mineral de nombre común sal, conocido por ayudar a la absorción del calcio y ser un potente relajante muscular (**Mg SO₄·7H₂O**) han mostrado ciertos efectos broncodilatadores (7,8)

Por otro lado sustancias usadas en pacientes con cuidados críticos, como es el caso del manitol un diurético osmótico que, por su alta hipertonicidad acarrea el agua del medio intracelular, al compartimiento extracelular (**C₆H₁₄O₆**) han mostrado efectos broncoconstrictores (9)

En ambos casos estas sustancias no han sido estudiadas en profundidad con técnicas *in vitro* ni establecido la correlación fisiológica y citológica de estos efectos.

De igual manera, son muy frecuentes las complicaciones respiratorias relacionadas con broncoconstricción en pacientes críticos de cualquier etiología, entre ellos en pacientes que reciben diversa medicación parenteral como es el caso del manitol usado como agente osmótico antiedema cerebral. Existen reportes de un potencial efecto broncoconstrictor del manitol, el cual dado la relevancia y frecuencia de su uso debe ser verificado con precisión (10)

Por planteado anteriormente, surge la necesidad de profundizar la investigación experimental de las respuestas morfológicas y funcionales del músculo liso traqueal ante el manitol o el magnesio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cirugía y muestreo

Se trata de un estudio experimental en el que se usaron 24 ratas Sprague-Dowley, machos (400g), anestesiadas con Tiopental sódico (60 mg.kg^{-1} , i.p.) en tres grupos de 6 animales (control, magnesio y manitol). Se practicó la disección del cuello, liberándose y extrayéndose la tráquea, la cual, se lavó con Solución Fisiológica aireada a 37°C . Sumergida en esta solución y con un bisturí, se realizaron secciones transversales para obtener aleatoriamente 4 anillos traqueales, los cuales se colocaron en una cámara de perfusión tipo canal vertical de 60 mm de largo y 1mm de espesor, construida con láminas de vidrio portaobjeto de microscopia. La cámara de superfusión fue adaptada a un flujo constante de 1mL.min^{-1} mediante una bomba de infusión. Las paredes de vidrio de la cámara de perfusión permiten visualizar claramente los anillos traqueales los cuales fueron fotografiados, en un fondo negro, con una cámara digital (Olimpus, Stylus 1010) cada 30 segundos con 5Mp de resolución. El protocolo experimental consistió en superfusión con solución fisiológica (grupo SF) durante 5 minutos, seguida de la solución de prueba con manitol (Laboratorios Vargas®) al 18% (grupo Manitol) o sulfato de magnesio al 6% diluido en solución fisiológica al 0.9% (grupo Magnesio) por 5 minutos. Los efectos sobre los parámetros citomorfológicos traqueales fueron evaluados en 6 ratas de iguales características a las anteriores, mediante extendidos por raspado de tráquea previamente sumergidas durante 5 minutos en solución fisiológica, manitol 18% o sulfato de magnesio 6% (2 ratas por cada solución). Los extendidos se fijaron con alcohol isopropílico y se tiñeron con la técnica convencional de hematoxilina-eosina (HE). Los extendidos fueron fotografiados con amplificación 40x con la cámara digital ya descrita a 5Mp de resolución.

Procesamiento de imágenes

Las imágenes obtenidas durante las superfusiones de los anillos traqueales y de los extendidos citológicos fueron procesadas con el programa ImageTool (UTSCHSA, NIH, USA, 2005), mediante el cual se determinaron digitalmente las áreas de sección transversal (μm^2) de cada uno de los anillos traqueales en cada fotografía (secuencias cada 30 segundos). De igual manera, desde el punto de vista citomorfológico, se determinaron las áreas citoplasmáticas de al menos 80 células en los extendidos obtenidos de las tráqueas sumergidas en cada solución (fisiológica, magnesio o manitol).

Estadística

Los valores numéricos obtenidos fueron procesados estadísticamente mediante el programa PAST v2.04, calculándose la mediana como medida de tendencia central y los percentiles 25 y 75 como medida de dispersión. Las comparaciones entre los valores de cada grupo se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney asignándose como significativas diferencias con $P < 0,05$.

RESULTADOS

La Fig. 1 presenta una fotografía de cuatro anillos traqueales en la cámara de superfusión, siendo procesada con el programa imageTools. Al comparar los valores promedio de áreas de anillos traqueales superfundidos con solución fisiológica (5 minutos) contra los de Manitol (5 minutos) no se observaron diferencias significativas ($n=240$; $U=227$; $P=0,21$; ver Tabla 1).

Al comparar los valores promedio de áreas de anillos traqueales superfundidos con solución fisiológica (5 minutos) con los de Sulfato de Magnesio (5 minutos) no se observaron diferencias significativas ($n=240$; $U=271$; $P=0,73$; ver Tabla 1).

Los valores promedio de áreas de anillos traqueales superfundidos con Manitol (5 minutos) versus con Sulfato de Magnesio (5 minutos) no se diferenciaron significativamente ($N=240$; $U=244$; $P=0,37$; ver Tabla 1).

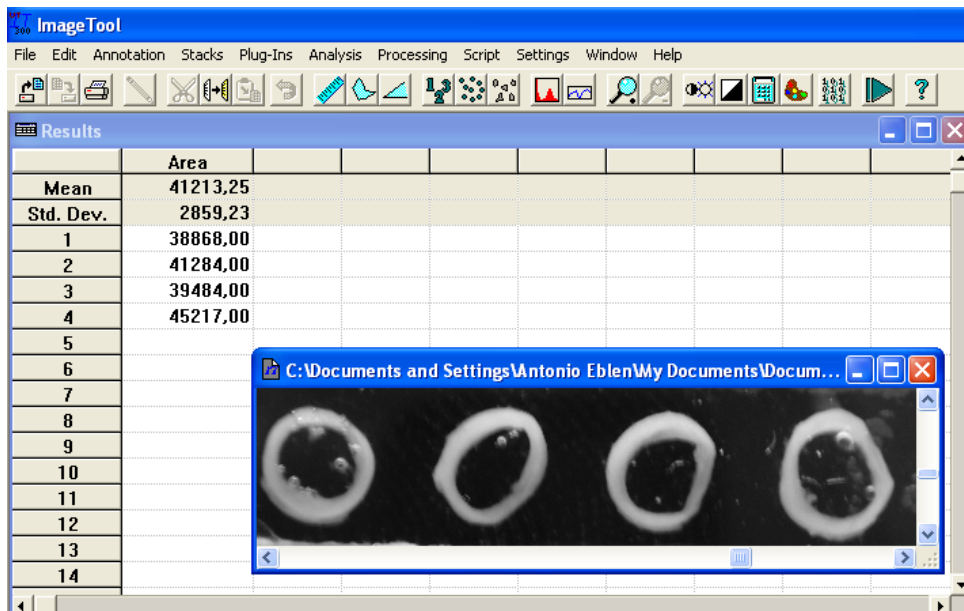


Fig.1

Procesamiento digital de las imágenes de dos anillos traqueales durante la superfusión con solución fisiológica. Se mide el área interna de cada anillo.

Tabla 1

Valores promedio del área (mm^2) del anillo traqueal superfundido con solución fisiológica (SF), manitol al 4% o Sulfato de Magnesio al 6%. Valores expresados en mm^2 ; SF= Solución fisiológica; SF2= Solución fisiológica superfundida 5 minutos luego de SF inicial; NS= no significativo al comparar con los valores obtenidos con solución fisiológica, $P>0,05$.

MEDIDA	SUPERFUSIÓN			
	SF	Manitol	SF2	Mg
n	40	40	40	40
Mediana	24,41	28,98	26,59	25,55
Percentil 25	22,17	23,92	23,92	22,87
Percentil 75	30,33	31,32	29,00	28,62
P		NS		NS

En vista de la ausencia de significación en las comparaciones de los valores de área traqueal para los tiempos previos y posteriores a la superfusión, se evaluó el curso temporal de los efectos de las superfusiones de los anillos traqueales con manitol o con magnesio (Fig. 2), en este análisis se aprecia claramente el efecto broncoconstrictor del primero y broncodilatador del segundo.

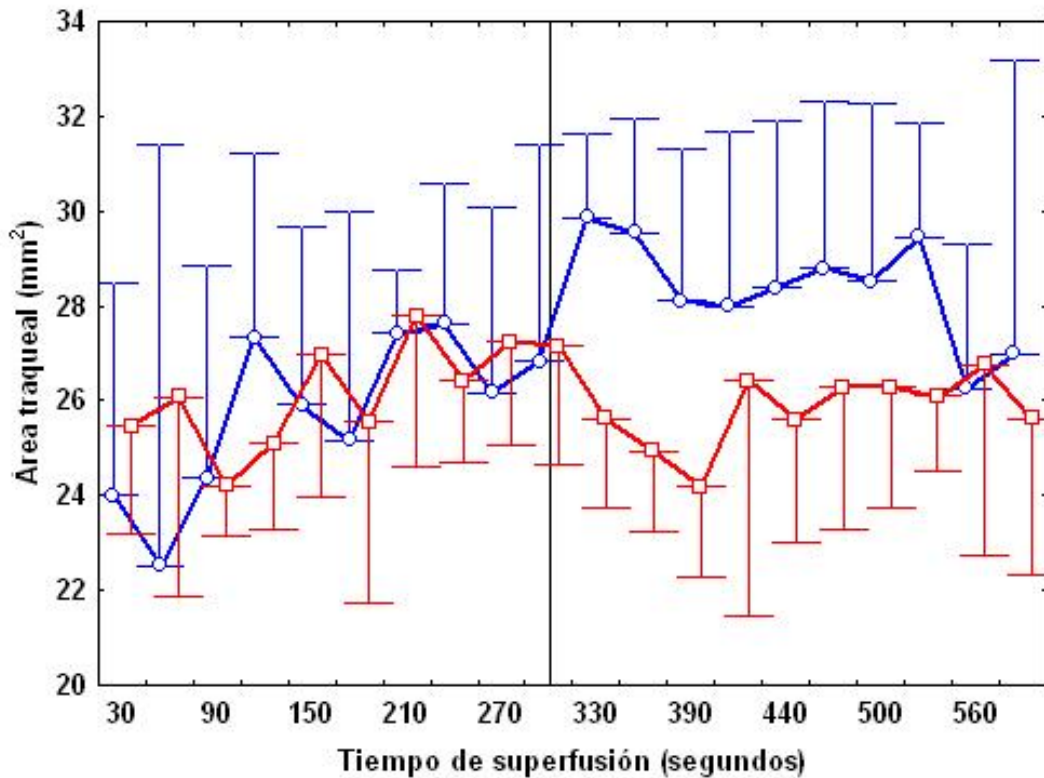


Fig. 2.

Efecto de la superfusión de Manitol (rojo) o Magnesio (azul) sobre el área se sección transversal de anillos traqueales de rata. Los valores corresponden a la mediana y los percentiles 25-75. La línea negra vertical central corresponde al inicio de la superfusión de prueba, tiempos previos corresponden a la superfusión con solución fisiológica.

Evaluación citomorfológica de extendidos traqueales

La Fig. 3 presenta una fotomicrografía de un extendido de células teñidas con HE, obtenidas de un raspado traqueal luego de la superfusión con solución fisiológica. En la Tabla 2 y Fig. 3 se presentan los valores de las áreas citoplasmáticas medidas en al menos 80 células para cada uno de los extendidos traqueales teñidos con HE y procesados por citomorfometría digital.

Tabla 2

Mediana y percentiles 25-75 del área citoplasmática (μm^2) de extendidos traqueales sumergidos (5 minutos) en solución fisiológica (SF), manitol al 4% o sulfato de magnesio al 6%. Tinción HE. La significación estadística se expresa como (U de Mann-Whitney) seguida del nivel p; n=80 células para cada grupo.

Perfusión	Mediana	p25-75	vs SF	vs Manitol
SF	158,2	127,5-188,8		
Manitol	126,7	99,9-152,9	(2046) 0,001	
Magnesio	169,9	127,5-213,7	(2487) 0,01	(1494) 0,00001

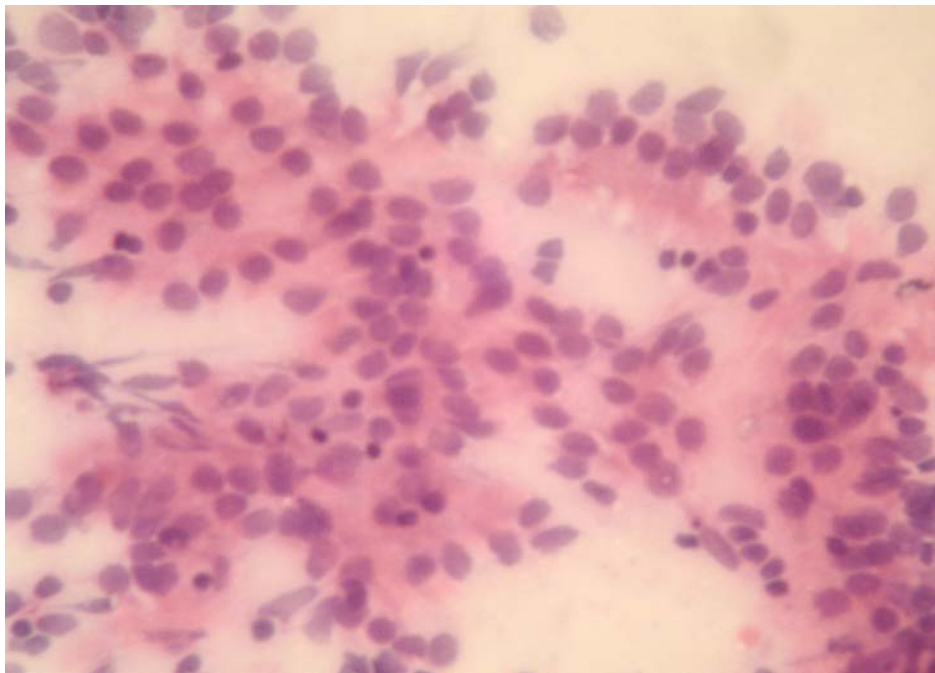


Fig. 3.

Fotomicrografía de un extendido de células teñidas con Hematoxilina y Eosina, obtenidas de un raspado traqueal luego de la superfusión de la tráquea con solución fisiológica, amplificación 40x.

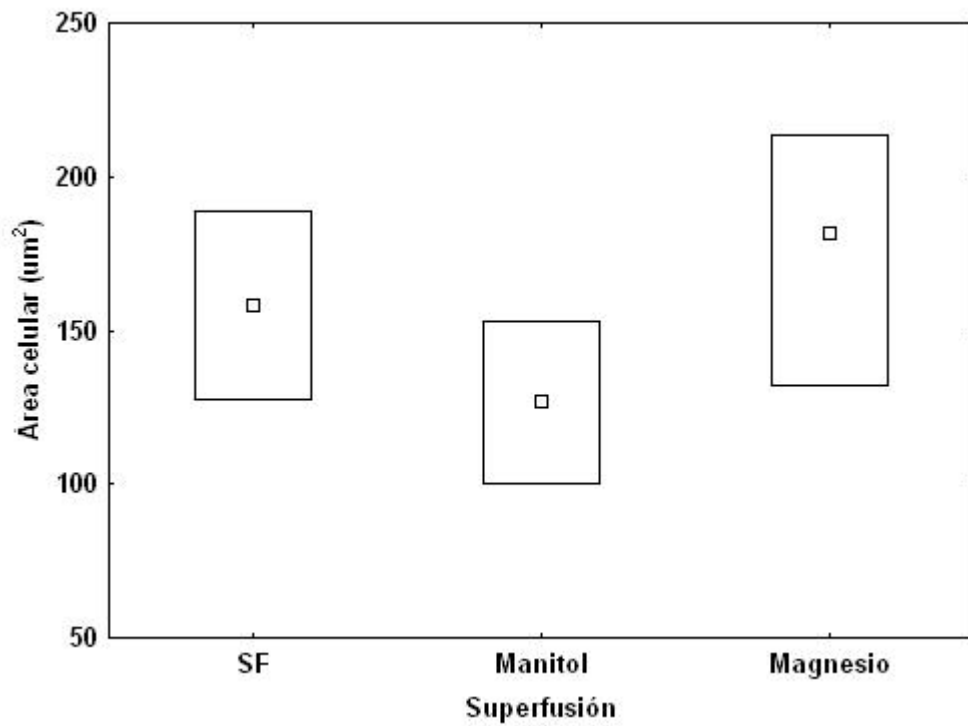


Fig. 4.

Área citoplasmática (μm^2 ; mediana y p25-75) de células obtenidas de raspado luminal de tráqueas sumergidas (5 minutos) en SF, manitol o magnesio.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto del manitol y el magnesio sobre la contractilidad del músculo liso traqueal usando técnicas funcionales y de citomorfometría digital tanto en las células obtenidas mediante raspado luminal y del área de sección transversal traqueal.

Se evidenció el efecto broncoconstrictor del manitol y broncodilatador del sulfato de magnesio. La conocida variabilidad fisiológica en el grado de contracción del músculo liso bronquial hace que al promediar sus valores durante un largo tiempo (5 minutos), no sea posible determinar diferencias estadísticamente significativas. Esto concuerda con el conocido ritmo de contractilidad de la vía respiratoria. Sin embargo, al evaluar el grado de contracción a lo largo del tiempo, (cada 30 segundos como en el presente estudio) los efectos de las superfusiones con las sustancias probadas si evidenció claramente sus efectos tanto en el área de sección transversal de los anillos traqueales (Fig. 2) como en las áreas citoplasmáticas de las células obtenidas por raspado luminal traqueal (Fig. 3).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan evidencias que soportan el efecto broncoconstrictor del manitol y el broncodilatador del magnesio, por lo que el uso del primero en pacientes críticos que lo requieran deberá ser acompañado de una cuidadosa monitorización del funcionalismo de la vía aérea.

El efecto broncodilatador del sulfato de magnesio, unido a su bajo costo y al reducido número de efectos colaterales reportados, lo hace un poderoso candidato a considerar en pruebas clínicas en el tratamiento de las crisis y/o profiláctico de la hiperreactividad bronquial y el asma.

La investigación de las causas fisiológicas y farmacológicas de los efectos aquí reportados del manitol y el magnesio sobre la fibra muscular lisa traqueal debe ser el siguiente paso en la profundización de este conocimiento.

Las herramientas de procesamiento digital de imágenes utilizadas en el presente estudio mostraron su gran utilidad, facilidad de uso y precisión, sustituyendo a las técnicas fisiológicas de evaluación de la contracción del músculo liso traqueal, como la cadena de anillos traqueales y el uso de un transductor de fuerza, lo cual reduce el costo experimental y eleva la calidad de los registros.

AGRADECIMIENTO

Los Autores expresan su agradecimiento al Bioterio Central y a la Dirección de Investigación y Producción Intelectual de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo por el aporte de los animales de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guyton A, Hall J. Ventilación pulmonar. González J, Jaquotot M, editores. Tratado de Fisiología Médica. 10ma ed. Pennsylvania: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V, 2001; 5525-538
2. Eurocytology. Citología Respiratoria. Toma de Muestras y Métodos de Preparación. Lavado Bronquial. “Disponible en: <http://www.eurocytology.eu>”
3. Welsch U, Sobotta J. Histología. 2da ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2009
4. Rozman C. Neumología. Agud J, Álvarez I, Madero S, editores. Compendio de Medicina Interna. 3ra ed. Madrid: Elsevier, 2005; 200-252
5. De Barboza G, Sierra X, Avendaño J, Campero N, Rodríguez E, Lozada O. Asma: epidemiología y definición. AVPP 2001; 64: 29-35
6. Capriles E, Do Campo A, Verde O, Pluchino S, Capriles A. Children’s asthma and the third world: an approach. J Investig Allergol Clin Immunol 2006; 16: 11-18
7. Bonnemay R, Guevara E, Hernández F, Silva J. Influencia del sulfato de magnesio inhalado en la resolución de la crisis asmática. Arch. Hosp. Vargas 1998; 40: 61-63
8. Rowe B, Bretzlaff J, Bourdon C, Bota G, Camargo C. Sulfato de magnesio para el tratamiento de las exacerbaciones de asma aguda en las salas de emergencias. (Biblioteca Cochrane Plus) 2008. “Disponible en: <http://www.update-software.com>”
9. Fraga D, Baez J, Reyes J, Sussini M. Uso de soluciones salinas hipertónicas inhaladas para restaurar la hidratación superficial de la vía aérea en pacientes con fibrosis quística. (Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina) 2006. “Disponible en: <http://kinesio.med.unne.edu.ar>”
10. Asensio O, Cerdón A, Elorz J, Moreno A, Villa J, Grupo de Técnicas de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica. Estudio de la función pulmonar en el paciente colaborador. Parte II. An Pediatr (Barc) 2007; 66: 518-530