



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA**  
**PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS SECRECIONES DEL**  
**TRACTO RESPIRATORIO CON LA ADMINISTRACIÓN DE DIFERENTES**  
**AGENTES MUCOLÍTICOS EN AVES DE PRODUCCIÓN**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**LIZBETH YESENIA CARRILLO GONZÁLEZ**

**TUTOR:**

**LILIA GUTIÉRREZ OLVERA**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**COMITÉ TUTOR:**

**HÉCTOR SUMANO LÓPEZ**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**LUIS MEDINA TORRES**

FACULTAD DE QUÍMICA

México D.F.

Junio

2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme estar en la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM por brindarme una buena formación académica.

A la Facultad de Química, Conjunto E y Materiales UNAM por prestarme sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Al Departamento de Fisiología y Farmacología Veterinaria por brindarme la formación académica con la que ahora cuento.

A la Jefa del departamento de Fisiología y Farmacología, Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón por todo su apoyo en la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Lilia Gutiérrez Olvera por ser mi tutora, por apoyarme y confiar plenamente en mí, además de poderme permitir trabajar nuevamente con ella.

Al Dr. Héctor Sumano López por apoyarme siempre y confiar en mí.

Al Dr. Luis Medina Torres ya que sin su ayuda y conocimiento en el área no hubiese podido realizar este trabajo.

A la Dra. Graciela Tapia por todo el apoyo que me brindó siempre.

A la Dra. Heidi Zozaya Doering por todo tu apoyo, ayuda y dedicación.

A mis jurados por dedicarme su tiempo en la revisión de este proyecto. Dr. Ariel Ortiz Muñiz, Dra. Cecilia Rosario Cortes, y Dr. Jesús Gracia.

A la Sra. Feliza por todo su apoyo, y tiempo dedicado a este proyecto.

A mis compañeras y amigas del departamento que me apoyaron incondicionalmente y me alentaron siempre a Gloria Morales Luna, Alma Carrascosa Orozco y Linaloe Manzano Pech.

A todos los pollitos que se utilizaron ya que gracias a ustedes comprendí y amé una vez más mi profesión.

Además deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que directa o indirectamente han contribuido con la realización de este proyecto.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por permitirme vivir una más de mis metas académicas.

A mi hija Isis, porque gracias a ella tuve la fuerza y voluntad para poder realizar este maravilloso sueño.

A mí e esposo Jorge Machuca Mora por ayudarme siempre en todo para que yo pudiera realizar este trabajo.

Al Departamento de Fisiología y Farmacología Veterinaria y a todo su personal docente y administrativo ya que sin su ayuda no hubiese podido lograr esta meta.

A mi tutora y comité tutor conformado por Dra. Lilia Gutiérrez Olvera, Dr. Héctor Sumano López y Dr. Luis Medina Torres ya que siempre estuvieron apoyándome y alentándome a la realización de este proyecto, pero lo más importante porque gracias a ustedes confirmo que la excelencia sí existe y está en ustedes.

A la Dra. Heidi Zozaya Doering por ser ejemplo de superación y por ayudarme siempre.

A la Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón por confiar en mí.

A mis amigas Gloria Morales Luna y Alma Carrascosa Orozco por que sin su ayuda no hubiese terminado este proyecto.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	VII
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	VIII
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1 Sistema respiratorio de las aves.....	4
1.2 Sistema de defensa del tracto respiratorio.....	8
1.3 Enfermedades bacterianas y virales que afectan principalmente el aparato respiratorio.....	10
1.4 Generalidades en el tratamiento para infecciones respiratorias en aves.....	10
1.5 Fármacos mucolíticos.....	11
1.5.1 Ambroxol.....	12
1.5.2 Bromhexina.....	13
1.5.3 Carbocisteína.....	14
1.5.4 Etilendiamina-dihidroyoduro.....	15
1.6 Fundamentos de reología.....	16
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	24
<b>5. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	24
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	25
6.1 Ubicación.....	25
6.2 Animales e instalaciones.....	25

6.3 Pruebas de cizalla simple.....	27
6.3.1 Prueba de cizalla oscilatoria de baja amplitud de deformación.....	27
6.3.2 Determinación de esfuerzo de cedencia empleando el modelo Bautista Manero-Puig (BMP).....	28
6.4 Análisis estadístico.....	29
<b>7. RESULTADOS</b> .....	30
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	38
<b>9. CONCLUSIÓN</b> .....	40
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	41

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Parámetros del modelo de Cross con muestras de moco para los distintos tratamientos.....	31
<b>Cuadro 2.</b> En el cuadro se muestran los valores numéricos del esfuerzo de cedencia calculado mediante el modelo BMP para muestras de moco con distintos mucolíticos.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Anatomía del sistema respiratorio en pollos.....	4
<b>Figura 2.</b> Flujo de aire en el sistema respiratorio de las aves durante la inspiración.....	7
<b>Figura 3.</b> Flujo de aire en el sistema respiratorio de las aves durante la espiración.....	8
<b>Figura 4.</b> Escalador mucociliar.....	9
<b>Figura 5.</b> Estructura química de clorhidrato de ambroxol.....	13
<b>Figura 6.</b> Estructura química de clorhidrato de bromhexina.....	14
<b>Figura 7.</b> Estructura química de carbocisteína.....	15
<b>Figura 8.</b> Estructura química de dihidroyoduro de etilendiamina.....	16
<b>Figura 9</b> Esquema de la clasificación de fluidos.....	17
<b>Figura 10</b> Lavado traqueo bronquial.....	26
<b>Figura 11</b> Reómetro de esfuerzos controlados.....	26
<b>Figura 12</b> Comportamiento al flujo de cizalla simple de los diferentes grupos.....	30
<b>Figura 13</b> Comportamiento de viscosidad de los diferentes grupos.....	32
<b>Figura 14</b> Curvas de visco elasticidad de $G'$ y $G''$ vs frecuencia.....	33
<b>Figura 15</b> Esfuerzo de cedencia de los diferentes grupos administrados con los mucolíticos ajustados al modelo BMP.....	34



<b>Figura 16</b> Esfuerzo de cedencia de los diferentes grupos administrados con los mucolíticos ajustados al modelo de Casson.....	35
<b>Figura 17</b> Esfuerzo de cedencia (fuerza necesaria para poder fluir) de los diferentes grupos administrados con los mucolíticos.....	37

## RESUMEN

CARRILLO GONZALEZ LIZBETH YESENIA. Estudio de las propiedades reológicas de las secreciones del tracto respiratorio con la administración de diferentes agentes mucolíticos en aves de producción

Las grandes poblaciones en las granjas avícolas se vuelven más susceptibles a procesos infectocontagiosos, siendo las enfermedades respiratorias uno de los principales problemas que generan enormes pérdidas tanto económicas como de morbilidad o mortalidad. A pesar de que los mucolíticos son de los fármacos más usados para resolver problemas respiratorios, su utilidad es en muchas ocasiones cuestionable, ya que no se ha estudiado, a la fecha, su actividad sobre el moco de aves de producción. Por esta razón se consideró importante el realizar evaluaciones reológicas de moco de aves de producción sanas bajo tratamiento con los mucolíticos de mayor uso en el área veterinaria. Se utilizaron 300 pollos Rhode Island Red de tres semanas de edad, divididos en cinco grupos cada uno con tres repeticiones: control (GC), ambroxol (GAmb), etilen diamina dihidro-yoduro (GEddi), carbocisteína (GCarb), bromhexina (GBr). Se tomaron muestras de secreciones traqueobronquiales por medio de lavado y se realizaron evaluaciones reológicas-dinámicas utilizando una geometría de cilindros concéntricos, para determinar su viscosidad, elasticidad y esfuerzo de cedencia. Los resultados obtenidos se compararon estadísticamente, y se determinó que existía una diferencia significativa en tre cada mucolítico aplicado para la variable de viscosidad y esfuerzo de cedencia. Se determinó que el moco presenta un comportamiento no newtoniano del tipo adelgazante al flujo ( $n < 1$ ) para todos los grupos. Además todos los tratamientos presentan esfuerzo de cedencia y la elasticidad presentó un comportamiento de tipo pseudosólido, por lo que el módulo viscoso predomina sobre su módulo elástico.

**Palabras Clave:** viscosidad, elasticidad, esfuerzo de cedencia, ambroxol, bromhexina, carbocisteína, etilendiamina-dihiyoduro

## **ABSTRACT**

Large populations in poultry farms are very susceptible to infecto-contagious diseases. In particular, illnesses affecting the respiratory system produce high morbidity or mortality with huge economic losses. Although mucolytics are drugs frequently used in these cases, its usefulness is questionable. To date their pharmacological effect on poultry mucus has not been studied. Hence it was considered important to perform rheological evaluations of the mucus of healthy birds treated with four mucolytics. Three hundred Rhode Island Red three week-old chickens were divided into five groups, each with three replicates: a control group (GC) and four treatment groups as follows: ambroxol (GAMB), ethylenediamine dihydroiodide (GEddi), carbocysteine (GCarb) and bromhexine (GBr). Samples of tracheobronchial secretions were taken and dynamic-rheological evaluations were made to determine viscosity, yield stress and elasticity. It was determined that there was a significant difference ( $p < 0.05$ ) between each treatment group for viscosity and yield stress. It was also determined that the mucus presented a non-Newtonian behavior of the flow rate thinning ( $n < 1$ ) for all groups. Furthermore all treatments present a yield stress and pseudosolid type elasticity behavior, so that the viscous modulus predominates over its elastic modulus.

**Keywords:** viscosity, elasticity, yield stress, ambroxol, bromhexine, carbocysteine, ethylenediamine dihydroiodide.

## 1. INTRODUCCIÓN

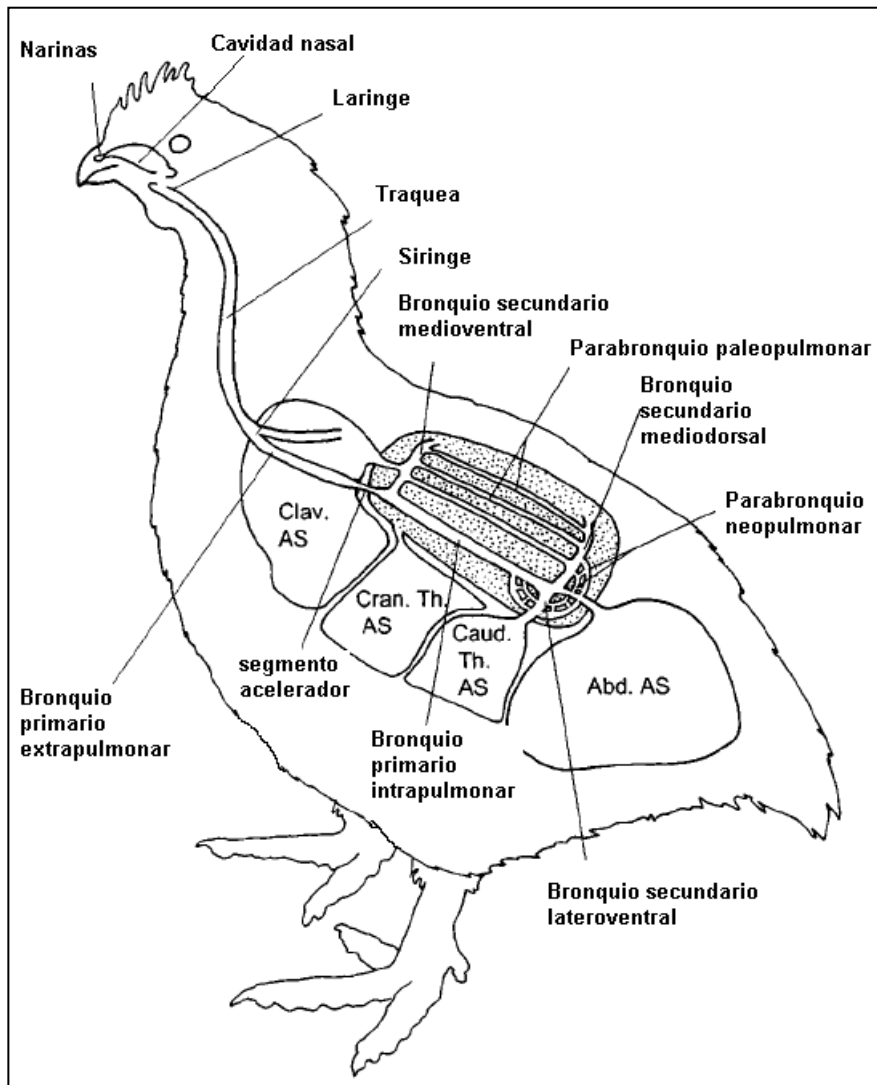
Las aves se encuentran desprovistas de mecanismos de respuesta inmune celular inmediata a nivel pulmonar, lo que puede favorecer el establecimiento de procesos infecciosos agudos y crónicos [Davidson, et al 2008], lo cual es más grave si se considera el ambiente que afecta las vías respiratorias de las aves en las casetas (polvo, amoníaco, exceso de humedad, microorganismos oportunista, etc.) [Homidan et al., 2003; Bottje et al., 1998] y que ocasiona la formación de los taponamientos traqueales, e incrementan la mortalidad por asfixia, sin causar una infección profunda [Sumano et al., 2013]. El tratamiento, incluso la prevención se llevan a cabo a través de la administración de fármacos antibacterianos y en la mayoría de las ocasiones conjuntamente con mucolíticos o expectorantes.

Existe una gran variedad de fármacos que tienen el propósito de modificar las secreciones respiratorias, como son enzimas dornasa, tripsina y quimiotripsina; productos azufrados, N-acetilcisteína, S-carbo-ximetilcisteína; bromhexina, y sumetrolol o los estimulantes de la hidratación de la secreción, sueros hipertónicos y yoduros [Florez., 2008].

Los mucolíticos se encuentran entre los fármacos más utilizados en la producción avícola, sin embargo, se conoce poco de sus mecanismos de acción y comportamientos mecánicos al flujo de las secreciones pulmonares. Se denominan mucolíticos a aquellas sustancias que tienen la capacidad de destruir las distintas estructuras fisicoquímicas de la secreción bronquial anormal, al disminuir la viscosidad y lograr una eliminación más fácil y pronta. Esta acción se da principalmente por: disminución de la tensión superficial, alteración de las fuerzas de asociación intermolecular o bien por la ruptura de las fuerzas de cohesión intramolecular [Sumano, et al., 1995; Foster W.M., 2002].

## 1.1 Sistema respiratorio de las aves

El sistema respiratorio de las aves tiene como principal función el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre la atmósfera y la sangre además está involucrado en la regulación de la temperatura y la fonación. Tiene estas características en común con el sistema respiratorio de los mamíferos pero difiere significativamente en la composición de sus partes anatómicas. Véase **Figura 1**



**Figura 1.** Anatomía del sistema respiratorio en pollos. Clav. AS= saco aéreo clavicular; Cran. Th. AS= saco aéreo torácico craneal; Caud. Th. AS= saco aéreo torácico caudal; Abd. AS= saco aéreo abdominal. [Adaptado de Fedde, 1998]

El sistema respiratorio comienza en las fosas nasales ubicadas en la cabeza por donde entra el aire y pasa directamente a la laringe, estructura compleja formada por cartílago, hueso y músculos [McLelland, 1989] que protege la entrada de la tráquea contra agentes extraños, sobre todo durante la deglución. Posteriormente, sigue la tráquea, que tiene como objetivo proveer aire fresco para el intercambio de gases entre los pulmones y los sacos aéreos caudales durante la inspiración [Brackenbury, 1987] hasta llegar a la siringe, la cual está compuesta por anillos cartilaginosos, algunos incompletos y osificados, con membranas en sus paredes. Esta estructura es la responsable de la producción de los sonidos en el pollo, que incluyen la activación de los músculos, la presión positiva del saco aéreo clavicular que desplaza las membranas hacia el lumen y la contracción de los músculos abdominales que comprimen el aire de los sacos aéreos y que éste tienda a circular a través de la siringe hacia el pico, por lo que las aves solo vocalizan en la espiración. Una característica significativa de la siringe de los pollos es su espacio reducido en la sección cruzada, comparada con la tráquea y con los bronquios primarios, esto puede limitar la ventilación total durante los periodos de movimiento prolongado y estrés, además está localizada en la unión de los bronquios que se elevan al final de la tráquea y se encuentra rodeada por el saco aéreo clavicular [Nickel, 1977, Sturkie, 2000]. En este punto la tráquea se ramifica en dos bronquios primarios, cada uno de los cuales va a un pulmón y sus sacos de aire correspondientes.

El pulmón es una estructura relativamente rígida que no se expande ni retrae con la respiración; su función es proporcionar una gran superficie de contacto para el intercambio gaseoso en la sangre. La entrada del aire al pulmón es a través del bronquio primario extrapulmonar, el cual penetra en el tejido pulmonar, posteriormente recibe el nombre de bronquio intrapulmonar primario, a partir de lo cual se conecta a los sacos aéreos abdominales [King y Rubin, 1975].

Por su parte, el neopulmón cubre la parte lateral del pulmón del pollo, en este punto casi ninguna parte de los bronquios medio-dorsales secundarios son visibles sobre la parte costal del pulmón. Esta red neopulmonar conecta a los sacos aéreos torácicos y abdominales

además de que algunos para-bronquios están conectados a la red torácica craneal y a los sacos aéreos claviculares [King y Rubin, 1975].

Algunas características importantes de estos para-bronquios, son la falta de cilios en las células del epitelio, la red extensa de sub-epitelio de músculo liso, la relación entre los capilares aéreos y los capilares sanguíneos, el adelgazamiento de la sangre para tomar el aire, que es un 60% más delgado comparado con los mamíferos, por lo que es muy eficiente el intercambio de gases, pero también puede predisponer a los pulmones a lesiones por irritantes ambientales o patógenos [Davidson et al., 2008].

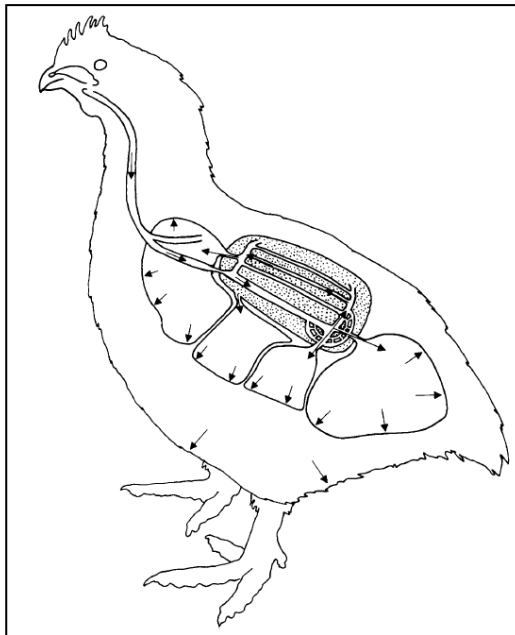
A nivel pulmonar las aves se encuentran desprovistas de mecanismos de respuesta inmune celular inmediata, lo que favorece el establecimiento de procesos infecciosos agudos y de manera crónica posterior a una infección respiratoria. [Davidson et al., 2008] Además de esto, el tejido pulmonar de las aves presenta una pobre capacidad de cicatrización [Nighot et al, 2008].

Los sacos aéreos son membranas delgadas, que ocupan casi todo el espacio disponible en la cavidad, además de extenderse dentro del lumen de muchos de los huesos [Brackenbury, 1987]. Funcionan como fuelles cuyo cambio de volumen causan una diferencia de presión a través de los pulmones, lo que da como resultado el movimiento del aire durante la inspiración y la espiración.

Los sacos aéreos tienen una pared muy delgada y no contribuyen al intercambio de gases con la sangre, además, ocupan cada espacio disponible en la cavidad celómica que no esté ocupada por otras vísceras. La mayoría de las aves, incluyendo el pollo, tienen nueve sacos aéreos; un clavicular, dos cervicales, dos craneo-torácicos, dos torácico-caudales y dos abdominales.

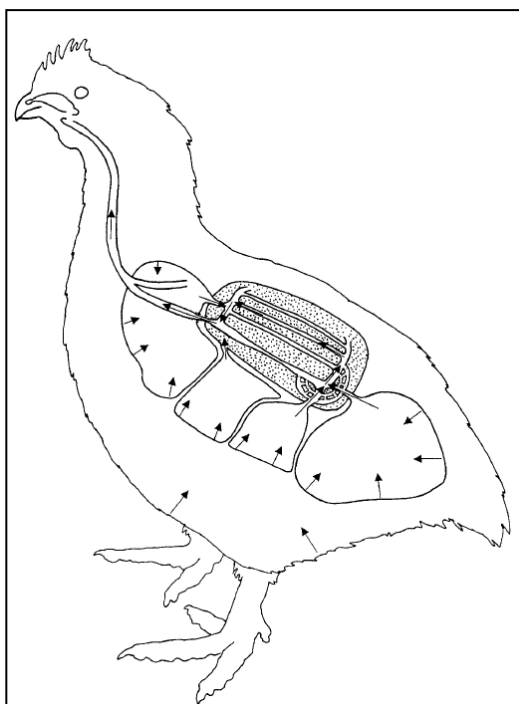
## Flujo de aire en el sistema respiratorio

La respiración de las aves se activa por la contracción de los músculos de la pared corporal, en conjunto con la retracción elástica y una posición intermedia de descanso (relajación) durante los picos de inspiración y espiración, que es responsable de los cambios en el volumen del sistema de los sacos aéreos de las aves [Fedde, 1987]. El incremento del volumen de los sacos aéreos durante la inspiración a través de los parabronquios paleopulmonares provoca que la presión en éstos disminuya, en relación a la presión atmosférica, en el sistema respiratorio y a través de los pulmones, el aire entra en los sacos aéreos. **Figura 2.** Por el contrario cuando el volumen de los sacos aéreos disminuye durante la espiración, la presión aumenta para que el aire circule a través de éstos y sea expulsado por medio de los pulmones. **Figura 3.** Debido a que la red parabronquial neopulmonar contiene sólo de 15 a 20% de la superficie de intercambio de gases en el pulmón en los pollos, la relación ventilación / perfusión es muy alta en esta red [Duncker, 1971; Scheid et al, 1989].



**Figura 2.** El flujo de aire en el sistema respiratorio de las aves durante la inspiración la cual provoca una ampliación de la cavidad, al mismo tiempo el movimiento muscular disminuye la presión en los sacos aéreos con relación a la atmósfera lo cual induce que el aire fluya al sistema [Adaptado Fedde, 1998].





**Figura 3.** Durante la espiración disminuye el volumen de la cavidad respiratoria por acción muscular, aumenta la presión de los sacos aéreos con relación de la atmósfera y el aire fluye fuera del sistema a través del bronquio intrapulmonar y provoca que el aire de los sacos aéreos caudales pase por los parabrónquios neopulmonares, secundarios medio dorsal y finalmente llegue a tráquea [Adaptado Fedde, 1998].

## 1.2 Sistema de defensa del tracto respiratorio

Cada parte del sistema respiratorio de las aves cuenta con mecanismos de defensa, para prevenir la invasión de microorganismos, que pueden provocar daño en el tracto respiratorio [Sumano et al., 2008]. Entre ellos:

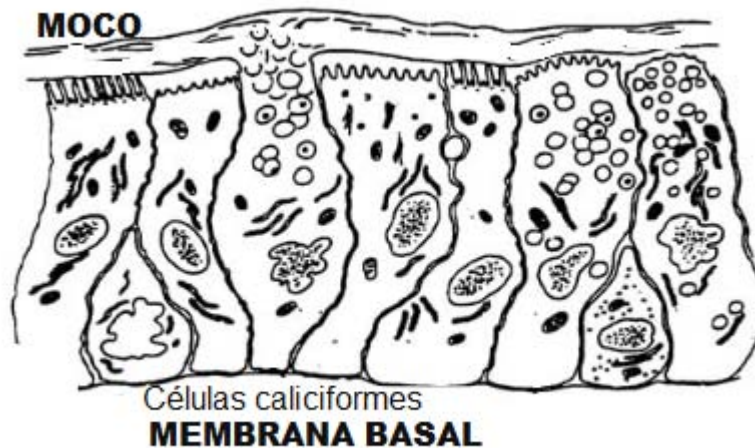
### Filtración del aire

El sistema respiratorio superior en la cavidad nasal está diseñado para calentar, humedecer y filtrar el aire inspirado. La primera línea de defensa contra partículas mayores a cuatro micras es un epitelio cubierto a base de moco, el cual es la barrera más importante en los pasajes nasales, ya que cubre las paredes y remueve las partículas extrañas hacia la línea

ciliar de la faringe (10mm/min), para ser tragadas y eliminadas en las heces [Bang, 1961, 1971; Mensah y Brain, 1982].

### **Escalador mucociliar**

La tráquea, bronquios primarios y la base de los bronquios secundarios se encuentran cubiertos de epitelio columnar ciliado que sirve para mover la capa mucosa en dirección hacia el pico, además sirve para eliminar material atrapado y poderlo expulsar (este proceso se denomina escalador mucociliar) Véase **Figura 4**. Mientras que los parabronquios están revestidos por epitelio cubico no ciliado por lo que al inhalar partículas extrañas no pueden ser removidas por el escalador mucociliar lo que favorece la penetración y colonización de bacterias patógenas oportunistas [McLelland, 1989].



**Figura 4.** Escalador mucociliar [McLelland, 1989]

### **Fagocitosis**

Aún no se sabe cómo es removido el material extraño presente en los parabronquios, dado que hay muy pocos macrófagos en el sistema respiratorio de las aves sanas [Toth y Siegel, 1986; Klika et al., 1996]. Algunos estudios [Stearns et al., 1987] concluyen que en el infundíbulo pulmonar existe una gran superficie de acción fagocitaria y que ésta mantiene al pulmón limpio y protegido.

### **1.3 Enfermedades bacterianas y virales que afectan principalmente el aparato respiratorio**

Entre las principales enfermedades bacterianas que aquejan el tracto respiratorio de las aves en producción está la Enfermedad Respiratoria Crónica Complicada (ERCC), Coryza Infecciosa así como Cólera Aviario. Mientas que las patologías de etiología viral son: Influenza aviario, Enfermedad de Newcastle, Bronquitis infecciosa y Laringotraqueitis Infecciosa.

Todas ellas tienen en común la hipersecreción de moco por lo que su tratamiento consiste en la administración de antibióticos y adicionalmente un mucolítico.

### **1.4 Generalidades en el tratamiento para infecciones respiratorias en aves**

Las enfermedades respiratorias en pollos son uno de los grandes problemas a los que se enfrentan los médicos veterinarios especialistas en aves y la enrofloxacin es uno de los antibacterianos de mayor uso, aun que lo que se busca en el tratamiento es que aumente las concentraciones de dicho medicamento en el sitio problema para prolongar la vida activa del medicamento [Sumano y Gutiérrez, 2008].

Los antibacterianos que se administran a las aves poseen una vida media muy corta dentro de su organismo, ya que estas tienen la característica innata de llevar a cabo un rápido metabolismo y una secreción tubular activa a través de los riñones o por medio de la bilis [Gómez et al, 2002]. La administración de los antibacterianos se hace frecuentemente a través del agua de bebida o en el alimento y con esto se inicia la medicación a la parvada entera ante la presencia de un problema infeccioso.

Se ha encontrado concentraciones de enrofloxacin pulmonares superiores hasta en un 146% en animales que han recibido enrofloxacin más bromhexina, sobre los que únicamente recibieron enrofloxacin [Sumano y Gutiérrez, 2008].

## 1.5 Fármacos mucolíticos

Los mucolíticos facilitan la eliminación del moco modificando sus propiedades reológicas, lo cual finalmente va a permitir una mejora de la función de los cilios en las vías respiratorias y en la función mucociliar [King y Rubin., 2002]. La secreción de las vías respiratorias es la barrera de mayor importancia en los pasajes nasales, ya que recubre las paredes y remueve las partículas extrañas hacia la línea ciliar de la faringe, para posteriormente ser tragadas. El moco es producto de la secreción de células mucosas; es una mezcla de 95% agua, 2% glicoproteínas mucosas, 1% proteínas, 1% lípidos y 1% de sales inorgánicas [James y Pi-Wan Cheng, 1994].

En los seres humanos, hay dos capas diferentes de moco en el árbol respiratorio. La capa más fluida de moco tiene menor concentración de glicoproteínas y es producida por células en el nivel submucoso [Cottel y Surkin, 1995]. Se ha descrito un aumento en la producción de moco por las células caliciformes causada por una infección bacteriana, viral o por un agente irritante, en cuyo caso se incrementa la viscosidad del fluido. Las propiedades físicas del moco en aves y específicamente en aquellas de postura han sido poco estudiadas, a pesar de que son de suma importancia para la defensa de las vías respiratorias [James y Pi-Wan Cheng, 1994], con este fin, los estudios reológicos son de gran ayuda para poder definir los parámetros de elasticidad y viscosidad [Medina-Torres et al., 2000], factores de suma importancia para definir y establecer una mecánica del moco. Se sabe que un incremento en la secreción de células caliciformes aumenta la viscosidad del moco, y en consecuencia un incremento en la actividad de las glándulas de la submucosa por lo que disminuirá la viscosidad [King y Rubin, 2002; Sumano et al., 1995]. Sin embargo, las propiedades de los mucolíticos sobre las secreciones mucosas de las aves no han sido estudiadas, más aún, no están establecidas dosis específicas para esta especie y la mayoría de las dosificaciones están basadas en extrapolaciones de los fármacos en línea humana. Por esta razón, se consideró importante realizar una evaluación de las modificaciones reológicas de los principales mucolíticos utilizados en la clínica de aves de postura sobre las secreciones del árbol respiratorio, los cuales son ambroxol, carbocisteína, dihidro-yoduro de etilendiamina.

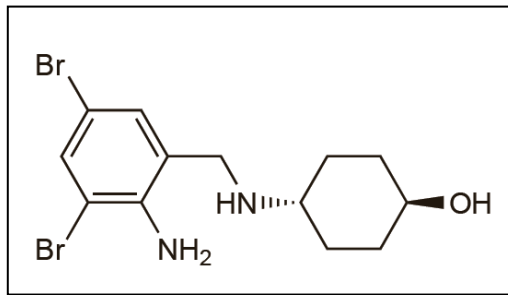
Cabe mencionar que la información obtenida puede ser útil a nivel de medicina humana, ya que tampoco existe información al respecto [Bottje et al., 1998].

Los expectorantes y mucolíticos comprenden un grupo diverso de compuestos con muchos beneficios propuestos, pero pocos estudios clínicos que han documentado la eficacia. Estos fármacos se han utilizado para aumentar la producción de secreciones bronquiales, mejorar la eliminación de exudado bronquial, y promover una tos más productiva. Algunos de estos medicamentos tienen un uso tradicional en la medicina veterinaria y su eficacia no ha sido establecida. [Riviere y Papich, 2009]. Algunos de estos medicamentos son promovidos para estimular la acción refleja en la mucosa gástrica. Aunque hay estudios que mencionan un efecto expectorante de estos productos, los compuestos de amonio en particular no están bien diseñados, ya que éstos, estimulan al estómago y esto parece desencadenar una acción refleja que provoca el aumento en las secreciones bronquiales [Riviere y Papich, 2009].

### **1.5.1 Ambroxol**

El ambroxol es resultado del metabolismo de la bromhexina y se utiliza de manera similar como mucolítico y expectorante. Su fórmula química es: Clorhidrato de trans-4-[(2-Amino-3,5-dibromobenzil) amino) cyclohexanol. Véase **Figura 5**

Es una pequeña molécula con efectos antioxidantes y antiinflamatorios. Estimula la secreción de agente tensioactivo que disminuye la adherencia de la mucosa bronquial y produce efectos expectorantes. Las propiedades antioxidantes del ambroxol son bien demostradas, ya que en el proceso de peroxidación de lípidos iniciado por hidropéroxido de t-butilo o doxorubicina se suprime en presencia del ambroxol, y también se han observado que produce impurezas en los radicales hidroxilos y aniones radicales superóxidos celulares. El ambroxol produce efectos antiinflamatorios mediante el bloqueo de la expresión de mensajeros antiinflamatorios, inhibiendo la liberación de histamina de los mastocitos y la generación de citoquinas e interleuquinas. además el clorhidrato de ambroxol es un inhibidor de proteína de canal de sodio [Malerba, 2008].



**Figura 5.** Estructura química de clorhidrato de ambroxol

El ambroxol ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de enfermedades pulmonares debido a sus propiedades mucolíticas, además estimula la liberación de sustancias surfactantes, normalizando la producción de moco y facilitan la expectoración. Se tienen referencias de que la adición de bromhexina o ambroxol al tratamiento antibacteriano permite una mayor difusión de algunos antimicrobianos al espacio pulmonar y a las secreciones traqueobronquiales. Al respecto se han realizado estudios de efecto del ambroxol sobre el aumento en la absorción de amoxicilina, en los cuales se obtuvieron niveles séricos y pulmonares más altos del antimicrobiano [Sumano y Gutiérrez, 2008].

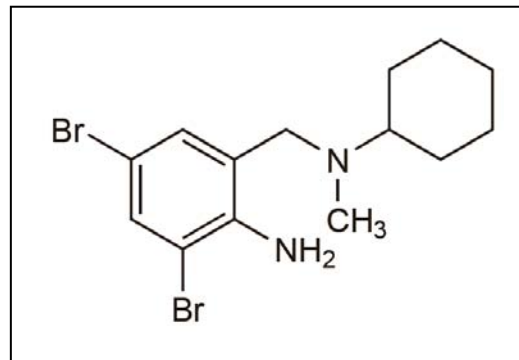
### 1.5.2 Bromhexina

Como se muestra en la **Figura 6** el clorhidrato de bromhexina cuya fórmula química es: [2-Amino-3,5-dibromobenzyl(cyclohexyl)methylamine] se comporta como un mucolítico y expectorante por activación de las glándulas seromucosas. En la secreción procedente de las células glandulares serosas se comprueba abundantes lisosomas, cuyas enzimas fragmentan las fibras de mucopolisacáridos ácidos, lo que determina una disminución de la viscosidad de la secreción bronquial y la activación de la expectoración. Recientes estudios han demostrado que la bromhexina aumenta el volumen de la secreción lagrimal y su contenido en lisozima [Prause et al, 1984].

La bromhexina es un mucolítico utilizado en el tratamiento de enfermedades respiratorias y trastornos asociados con tos productiva. Se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, además, las concentraciones plasmáticas máximas se producen después de

aproximadamente 1 hora y se distribuye ampliamente a los tejidos corporales. Tiene una vida media de eliminación terminal de entre 13 y 40 horas. La bromhexina atraviesa la barrera hematoencefálica y pequeñas cantidades atraviesan la placenta [Martindale, 2009].

Posteriormente sufre un extenso metabolismo de primer paso en el hígado: y su biodisponibilidad oral se dice que es sólo aproximadamente del 20%. Cerca del 85 al 90% de una dosis se excreta en la orina, principalmente en forma de metabolitos.



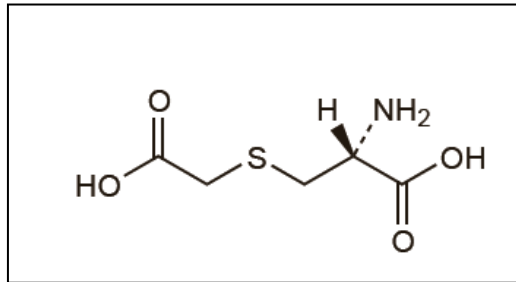
**Figura 6.** Estructura química de clorhidrato de bromhexina

### 1.5.3 Carbocisteína

La carbocisteína tiene acción específica sobre células mucossecretoras. Activa la sialiltransferasa favoreciendo la síntesis de sialomucina; restablece la funcionalidad del epitelio bronquial además del perfil secretor normal y es coadyuvante de enfermedades respiratorias que cursan con secreción mucosa excesiva o espesa. Es eficaz en procesos catarrales y gripales, sinusitis, rinofaringitis subaguda y crónica, además de otitis media, así como en enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis aguda, subaguda y crónica, bronquitis asmática, bronquitis del fumador, enfisema, atelectasias, bronquiectasias, regeneración posneumónica, neumoconiosis y fibrosis quística. [Karlheinz et al., 2007]

La carbocisteína se absorbe rápidamente desde el tracto gastrointestinal con concentraciones plasmáticas máximas las cuales se producen alrededor de 2 horas después de ser administrado vía oral. Parece penetrar en el tejido pulmonar y el moco respiratorio.

Se excreta en la orina como fármaco inalterado además la acetilación, descarboxilación, y sulfoxidación se han identificado como su principal ruta metabólica la sulfoxidación puede regirse por polimorfismo genético [Martindale, 2009]. Véase **Figura 7**



**Figura 7.** Estructura química de carbocisteína

#### 1.5.4 Etilendiamina-dihidroyoduro

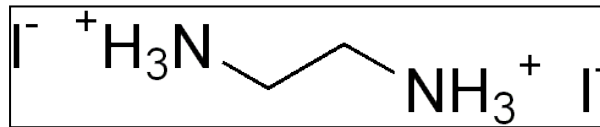
El dihidroyoduro de etilendiamina, cuya fórmula química es : 1,2-Ethanediamine, 9 -10 dehydro, Cys iodide. (EDDI). Véase **Figura 8**.

Las preparaciones formadas de yodo funcionan como un expectorante hecho a base de solución salina la cual es capaz de aumentar las secreciones hasta 150% por lo que puede ser útil para el tratamiento de la tos leve causada por irritación de la faringe ya que su mecanismo de acción (efecto broncodilatador) es promover la producción de moco líquido por estimulación directa de células secretoras, así mismo ejerce un efecto de licuefacción del moco espeso a nivel pulmonar y en el tracto respiratorio superior. Se sabe que el mecanismo de acción mucolítico es debido a que cortan las proteínas de mucina a nivel de las uniones disulfuro por acción de compuestos relativamente sencillos como la carbamida y específicamente el de acetilcisteína [Adamas, 2001].

Algunos ejemplos de estos expectorantes son: cloruro de amonio, carbonato de amonio, yoduro de potasio, yoduro de calcio y dihidroyoduro de etilendiamina. (EDDI) este último es el más conocido por los veterinarios, ya que también se ha utilizado como una fuente nutricional de yodo en el ganado vacuno, pero también con la finalidad de disminuir las infecciones de pododermatitis, mandíbula abultada (*Actinomyces bovis*) lengua de madera (*Actinobacillus lignieresii*) y bronquitis. Existen algunos estimulantes directos como aceites



volátiles tales como aceite de eucalipto (sales de menthol- lyptus) y aceite de limón que se cree que aumentan directamente las secreciones de las vías respiratorias. Su eficacia clínica en medicina veterinaria es desconocida [Riviere y Papich, 2009].



**Figura 8.** Estructura química de dihidroyoduro de etilendiamina

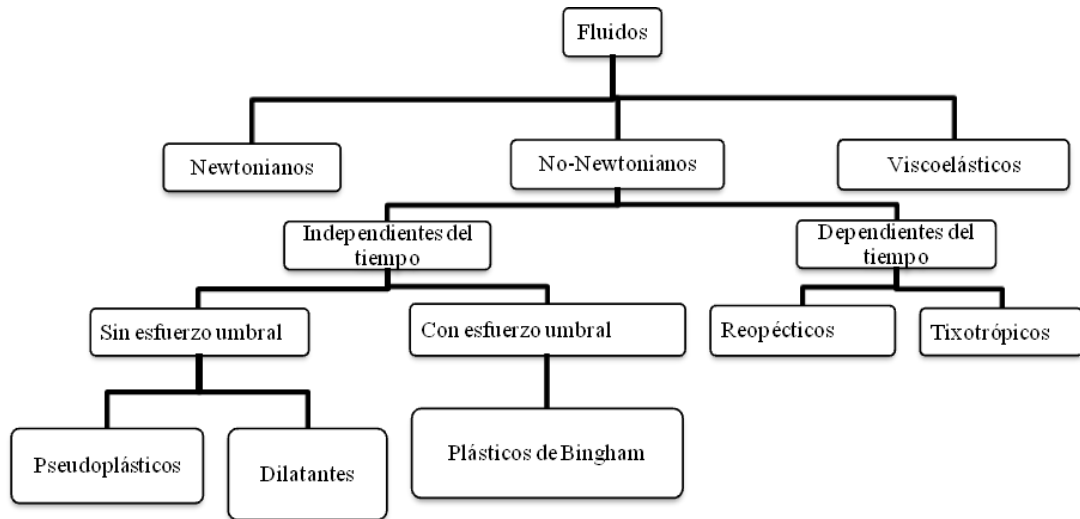
## 1.6 Fundamentos de reología en el estudio del moco

La reología concepto propuesto por el profesor Bingham Lafayette en 1929 se refiere a la ciencia que estudia la deformación y el comportamiento del flujo de la materia [Macosko, 1994]. La utilidad de las mediciones reológicas es que provee información acerca de la estructura e interacciones de los componentes que integran un sólido o un líquido. Además existen modelos reológicos que se utilizan para relacionar entre sí las propiedades mecánicas más importantes como: viscosidad aparente (relación entre esfuerzo y velocidad de corte), viscosidad compleja (respuesta ante esfuerzos de corte oscilatorio), módulo de almacenamiento, y módulo de pérdidas (comportamiento viscoelástico lineal). Para poder caracterizar el comportamiento reológico de un material es necesario definir algunos términos:

**Tipos de fluidos. Las propiedades reológicas se definen a partir de la relación existente entre fuerza o sistema de fuerzas externas y su respuesta, ya sea como deformación o flujo. Todo fluido se va a deformar en mayor o menor medida al someterse a un sistema de fuerzas externas.** Dicho sistema de fuerzas se representa matemáticamente mediante el esfuerzo cortante “ $\sigma_{yx}$ ”, mientras que la respuesta dinámica del fluido se cuantifica mediante la velocidad de deformación “ $\dot{\gamma}$ ”. Sin embargo, este tipo de fluido es un ideal de la materia, por lo cual es prácticamente imposible encontrarlo; aunque a algunos materiales de bajo peso molecular, sólo por mencionar unos cuantos ejemplos; aire, hidrógeno, agua, entre otros, pueden llegar a comportarse de esta manera para un cierto rango de velocidad de deformación, este comportamiento es la contraparte

del sólido elástico de Hooke. La mayoría de los materiales tienden a presentar ambos comportamientos y el grado de relación entre ambas características es estudiado por la reología de fluidos viscoelásticos. [Barnes, 2000].

En la **Figura 9** se muestra un esquema con los tipos de fluidos que existen en la naturaleza.



**Figura 9.** Esquema de la clasificación de fluidos [Muller, 1977]

Para los fluidos no newtonianos, la viscosidad según Muller, 1977, depende de: la naturaleza de las fases continua y dispersa, las interacciones partícula-partícula y partícula-solvente, la concentración de partículas, su forma, tamaño y composición química. Estos fluidos pueden subdividirse en dos grupos principales, dependientes e independientes del tiempo. En el primer grupo se incluyen los fluidos tixotrópicos y reopécticos; mientras que los fluidos independientes del tiempo son pseudoplásticos, dilatantes y plásticos.

**Fluidos newtonianos.** Se definen como aquellos para los que la representación del esfuerzo cortante en función de la velocidad de deformación es una línea recta. La mayoría de los gases y fluidos simples (como el agua) presentan este comportamiento.

**Fluidos no newtonianos.** Son aquellos que exhiben flujo uniforme, pero la relación entre el esfuerzo cortante y velocidad de deformación no es lineal. Son generalmente complejos y constan de más de una fase, aunque las disoluciones de polímeros pueden considerarse

como fases únicas. Una de las fases es continua y la otra dispersa. La reología de un sistema disperso depende de las propiedades de la fase continua, las de la fase dispersa y la interacción entre ambas. En la fase continua son de interés la viscosidad, la composición química, el pH y la concentración de electrolitos. En la fase dispersa, que puede ser líquida o sólida, la concentración en volumen, la viscosidad, el tamaño de partícula, la forma, la distribución por tamaños y la composición química.

**Fluidos no newtonianos que presentan adelgazamiento al flujo (shear-thinning).** En los fluidos del tipo de adelgazamiento al flujo (pseudoplásticos) la viscosidad aparente depende de la velocidad de deformación por cizalla, pero no del tiempo durante el que están sometidos a la tensión cizallante; es decir, el aumento de la velocidad de deformación disminuye la fricción entre las capas del fluido. El esfuerzo causa un desorden, las moléculas de cadena larga se orientan y llegan a alinearse al flujo, lo que da la reducción de la viscosidad. Este comportamiento es el tipo más común de los fluidos no newtonianos. Las soluciones poliméricas tienen un comportamiento pseudoplástico que depende fuertemente de la concentración de la solución. Para sistemas diluidos, el comportamiento pseudoplástico puede deberse a la orientación del flujo de las partículas o el cambio en la conformación de las moléculas poliméricas. Así, cuando la velocidad de deformación es mayor que la velocidad de la reorientación térmica de las partículas, estas serán alineadas en dirección al flujo. Para sistemas concentrados, el comportamiento pseudoplástico aparece cuando la velocidad de deformación es mayor que la velocidad para alcanzar el equilibrio de las partículas.

**Fluidos viscoelásticos.** Son aquellos que exhiben simultáneamente las propiedades viscosas propias de un líquido y las elásticas características de un sólido; en general, los fluidos biológicos se caracterizan por tener estas características.

**Velocidad de deformación y flujo.** Cuando un fluido es estudiado por la aplicación de un esfuerzo, un movimiento se genera hasta que el esfuerzo es removido. Consideremos dos superficies separadas por una pequeña abertura en la cual se mantiene un líquido. Un esfuerzo cortante debe mantenerse en la superficie superior para que ella se mueva a una

$$\gamma = \frac{x}{z}$$

velocidad constante,  $u$ . Este esfuerzo de cizallamiento producirá un cambio continuo en la velocidad a través de la abertura hasta llegar a ser cero para superficie más baja [Goodwin y Hudhes, 2008]. A hora, en cada segundo los desplazamientos producidos están en  $x$  y la deformación está dada por:

y como  $u = \frac{dx}{dt}$  podemos escribir la velocidad de deformación como :

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{u}{z}$$

Los términos velocidad de deformación, gradiente de velocidad y velocidad cortante, son utilizados como sinónimos y el punto de Newton normalmente se emplea para indicar el operador diferencial con respecto al tiempo. Para grandes aberturas la velocidad de deformación variara a través de la abertura y podemos escribirla como:

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dz}$$

**Viscosidad.** La viscosidad se puede definir como una medida de la resistencia a la deformación del fluido. La Ley de Newton relaciona el esfuerzo cortante (tensión de cizalla) con la velocidad de deformación (gradiente de velocidad ó intensidad de cizalla), y puede expresarse en una dimensión como:

$$\sigma = -\mu \cdot \dot{\gamma}$$

Donde:

$\sigma =$  *esfuerzo cortante (Pa)*

$\mu =$  *viscosidad dinámica o absoluta (Pa · s)*

$\dot{\gamma} =$  *velocidad de deformación (s<sup>-1</sup>)*

El esfuerzo cortante se representa también por  $\tau$ , el cual es proporcional al gradiente de velocidad o velocidad de deformación. La constante de proporcionalidad:  $\mu$  es llamada viscosidad aparente para fluidos no newtonianos ya que varía en función de la velocidad de deformación. La viscosidad de los materiales reales puede ser significativamente afectada por variables como la rapidez de deformación, la temperatura, presión y el tiempo. Para un fluido newtoniano el parámetro  $\mu$  es una constante en la ecuación. Generalmente el

comportamiento de los materiales es de tipo no-newtoniano, por cual se utiliza el concepto de viscosidad aparente (también conocida en el argot reológico como *viscosidad cortante*) para describir este tipo de materiales, en donde la viscosidad aparente  $\eta$  (eta) está dada por la siguiente relación:

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}}$$

Donde:

$$\sigma = \text{esfuerzo cortante (Pa)}$$

$$\eta = \text{viscosidad aparente (Pa} \cdot \text{s)}$$

$$\dot{\gamma} = \text{velocidad de deformación (s}^{-1}\text{)}$$

**Flujo.** Un fluido se define como una sustancia que se deforma continuamente bajo la aplicación de esfuerzos cortantes, es decir la deformación de los líquidos se llama “flujo”. En los experimentos de viscosidad, la rapidez de deformación se determina la magnitud de la deformación dividida por el tiempo que ésta tarda en producirse y se expresa en términos de  $s^{-1}$ . La ecuación reológica de estado de los fluidos establece la relación entre la tensión y la rapidez de deformación. Así, para una velocidad dada, la fuerza resultante se incrementa cuando la viscosidad aumenta; mientras que para una fuerza dada, la velocidad es reducida cuando la viscosidad se eleva [Silberberg, 1977].

Los fluidos poliméricos están formados por macromoléculas que adoptan una conformación determinada dependiendo de su estructura molecular, del tipo de flujo y de las interacciones con las otras moléculas. Los dos tipos principales de flujos son el flujo cortante y el flujo elongacional o extensional. El flujo cortante posee una familia uniparamétrica de superficies materiales (superficies de corte) que se mueven isométricamente, esto es que la distancia entre dos partículas en la superficie es constante y el volumen de cada elemento del fluido es constante [De Larrad, 1999].

Existen diferentes modelos reológicos para describir el comportamiento de fluidos. Durante el comportamiento pseudoplástico los materiales exhiben tres regiones distintas, la región inferior Newtoniana donde la viscosidad aparente es constante con el cambio de velocidad

de deformación llamada límite de viscosidad a velocidad de deformación, una región media donde la viscosidad aparente disminuye con la velocidad de corte y la región superior donde la pendiente de la curva llamada límite de viscosidad a velocidad de corte infinita, es constante con la variación de la velocidad de deformación. Los factores que influyen en la selección del modelo reológico usado para describir el comportamiento del flujo de un fluido en particular son numerosos.

Modelos como el de la Ley de Potencia o los modelos de plástico de Bingham y de Herschel-Bulkley han sido usados para representar el comportamiento de fluidos no Newtonianos, además del modelo de Cross, Reiner Philippoff, Van Wazer, Powell-Eyring son utilizados en la modelación del comportamiento pseudoplástico en rangos de velocidad de deformación bajo, medio y alto.

**Modelo Ley de la potencia** (Ostwald de Waele). La ecuación que relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación se conoce como la Ley de Potencia o de Ostwald de Waele, es una ecuación empírica que describe sistemas dilatantes y pseudoplásticos, similar a la ecuación de Newton para la viscosidad, tiene la forma siguiente:

$$\tau = k \left( \frac{dv}{dy} \right)^n$$

Donde  $\tau$  (N m<sup>-2</sup>) es el esfuerzo cortante,  $k$  (N s<sup>n</sup> m<sup>-2</sup>) es el índice de consistencia,  $\frac{dv}{dy} = \dot{\gamma}$  es la velocidad de deformación y  $n$  es el índice de flujo; este último constituye una medida del grado de desviación del comportamiento newtoniano y  $k$  es igual al coeficiente de viscosidad. Para fluidos newtonianos,  $n=1$ ; para fluidos pseudoplásticos,  $n < 1$ ; mientras que para fluidos dilatantes,  $n > 1$  [Macosko, 1994].

**Modelo de Cross.** La ecuación que describe una curva de flujo completa, es llamada Modelo de Cross, su autor Malcolm Cross, fue un relojero que trabajó en dispersiones de colorantes y pigmentos, y quien encontró que la viscosidad de las suspensiones de muchos podría ser descrito con la ecuación:

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{1 + (\lambda \dot{\gamma})^m}$$

Donde,  $\eta$  es la viscosidad aparente,  $\eta_0$  y  $\eta_{\infty}$  son las viscosidades límite a baja y alta velocidad de deformación, respectivamente,  $\eta_0$  se denomina también viscosidad newtoniana  $\lambda$  tiene las dimensiones de tiempo, y  $m$  es adimensional, ambos son parámetros empíricos. Cuando este modelo se utiliza para describir los líquidos no newtonianos, la pseudoplasticidad viene dada por el valor de  $m$ ; si  $m$  tiende a cero el fluido tiene más características de líquidos newtonianos, mientras que los fluidos más adelgazantes tienen un valor de  $m$  que tiende a la unidad. Generalmente  $\eta_0 \gg \eta_{\infty}$ , por tanto  $\dot{\gamma}$  es muy pequeña, y  $\eta$  se aproxima a  $\eta_0$ . A intermedias  $\dot{\gamma}$  el modelo de Cross tiene una región Ley de la Potencia. A muy altas velocidades de corte, el lado derecho de la ecuación llega a ser muy pequeño y  $\eta$  se aproxima a  $\eta_{\infty}$  [Morris et al, 1981].

**Estimación de esfuerzo de cedencia empleando el modelo Bautista- Manero-Puig (BMP).** El modelo BMP ha sido utilizado en flujo cortante, extensional, y reproduce las curvas de fluidos adelgazantes al corte simple. Por otra parte, cuando la fluidez es cercana a cero (viscosidad infinita) el sistema genera el esfuerzo de cedencia en función de las propiedades cinéticas, estructurales y de flujo a altos cortes. Como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\underline{\underline{\underline{\sigma}}} + \frac{1}{G_0 \varphi} \underline{\underline{\underline{\sigma}}}^{\nabla} = \frac{2}{\varphi} \underline{\underline{\underline{D}}} \qquad \frac{d\varphi}{dt} = \frac{1}{\lambda} (\varphi_0 - \varphi) + k_0 (\varphi_{\infty} - \varphi) \underline{\underline{\underline{\sigma}}} : \underline{\underline{\underline{D}}}$$

Donde,  $\underline{\underline{\sigma}}$  es el tensor de esfuerzos,  $\underline{\underline{D}}$  es la parte simétrica del tensor rapidez de deformación,  $\varphi_0$  y  $\varphi_\infty$  (inverso de la viscosidad), son la fluidez a baja y alta rapidez de deformación respectivamente,  $G_0$  es el módulo elástico,  $\lambda$  es un tiempo característico estructural y  $k$  es una constante relacionada a la modificación de la estructura. La derivada co-deformacional del tensor de esfuerzos está definida de la siguiente manera:

$$\underline{\underline{\dot{\sigma}}} = \frac{d\underline{\underline{\sigma}}}{dt} - (\underline{\underline{L}} \cdot \underline{\underline{\sigma}} + \underline{\underline{\sigma}} \cdot \underline{\underline{L}}^T)$$

Dónde,  $\underline{\underline{L}}$  es el tensor gradiente de velocidad. En el presente trabajo, las predicciones de la ecuación constitutiva B-MP son comparadas con aquellas de los modelos mencionados anteriormente.



## **2. JUSTIFICACIÓN**

Dada la importancia de los mucolíticos en la producción avícola por las complicaciones respiratorias a las que viven expuestas las aves en producción, y a que no existe información sobre su eficacia comparativa en la literatura científica, se considera importante evaluar comparativamente a algunos de los productos utilizados como mucolíticos en la clínica de aves desde el punto de vista reológico.

## **3. HIPÓTESIS**

La propiedad mecánica al flujo evaluada por la reología en la secreción del tracto respiratorio de las aves de producción sanas se verá modificada por la administración de distintos productos mucolíticos, tales como: ambroxol, bromhexina, carbocisteína, y etilendiamina-dihidroyoduro.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta reológica de las secreciones traqueo-bronquiales de aves de producción sanas mediante la reometría y establecer la respuesta mecánica al flujo de éstas en la presencia de fármacos mucolíticos.

## **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Evaluar las propiedades reológicas (viscosidad, elasticidad y esfuerzo de cedencia) del moco en aves sanas para establecer una curva de flujo de la muestra control.
- ✓ Evaluar las propiedades reológicas (viscosidad, elasticidad y esfuerzo de cedencia) del moco en aves sanas tratadas con ambroxol, para establecer modificaciones que sufre en comparación a la curva de flujo control.
- ✓ Evaluar las propiedades reológicas (viscosidad, elasticidad y esfuerzo de cedencia) del moco en aves sanas tratadas con carbocisteína, para establecer las modificaciones que sufre en comparación a la curva de flujo control.

- ✓ Evaluar las propiedades reológicas (viscosidad, elasticidad y esfuerzo de cedencia) del moco en aves sanas tratadas con bromhexina, para establecer las modificaciones que sufre en comparación a la curva de flujo control.
- ✓ Evaluar las propiedades reológicas (viscosidad, elasticidad y esfuerzo de cedencia) del moco en aves sanas tratadas con yoduro de etilendiamina (EDDI), para establecer las modificaciones que sufre en comparación a la curva de flujo control.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Ubicación**

El presente estudio se llevó a cabo en una unidad experimental de la FMVZ, UNAM, con autorización del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la FMVZ de la UNAM, la evaluación reológica se llevó a cabo en la Facultad de Química Conjunto E y materiales de la UNAM.

### **6.2 Animales e instalaciones**

Se utilizaron 300 pollos Rhode Island Red de tres semanas de edad clínicamente sanos, los cuales fueron alojados en jaulas de tipo piramidal con una densidad de población de 20.3cm<sup>2</sup> por ave, como se indica en el manual de manejo de animales en experimentación de la FMVZ UNAM. Se utilizaron comederos de canchales y bebederos automáticos de niple, y se mantuvieron con alimentación a base de concentrado comercial y agua de bebida *ad libitum*.

Posteriormente se dividieron a las aves en cinco grupos de 20 aves cada uno con tres repeticiones por grupo, dosificadas individualmente PO: grupo control (GC) sin mucolítico, grupo ambroxol (GAmb) a dosis de 0.5mg/kg, grupo Etilendiaminadihidro-yoduro (Eddi) a dosis 33mg/kg, grupo carbocisteína (GCarb) a dosis de 40mg/kg y grupo bromhexina (GBr) a dosis 0.5mg/kg.

Una hora después de la administración, las aves se anestesiaron con ketamina a razón de 40 mg/kg, vía intramuscular, posteriormente se les realizó un lavado traqueo bronquial, que es una técnica simple, económica y segura [ Mansmann, 1998] , adaptada de equinos, que consiste en introducir una sonda de alimentación pediátrica, de plástico transparente estéril, desechable y con un orificio en el extremo proximal con un calibre de 8FR y longitud de 38.5cm, por el orificio de la tráquea y administrar 5 mL de agua estéril utilizando jeringas de 10 mL, **Figura 10**; posteriormente se recolectaron muestras de aproximadamente 1 mL de moco por cada ave, consecutivamente se almacenaron en tubos de ensayo de vidrio previamente identificados con capacidad de 10 mL los cuales se colocaron en un termo con refrigerantes y se mantuvieron a una temperatura de 2 a 4 °C para su posterior análisis; el cual se realizó máximo una hora posterior a la toma de muestra para evitar degradación de las enzimas propias del fluido. Todas las mediciones reológicas se realizaron en la Facultad de Química conjunto E U NAM, para lo cual se utilizó un reómetro de esfuerzos controlados ( AR-G2, TA Instruments) como se muestra en la **Figura 11**, usando una geometría de cilindros concéntricos, con un gap de 500  $\mu$ m, en una ventana de observación de 0.1 a 200 S<sup>-1</sup> la temperatura de análisis permaneció constante a 39±0.1 °C la cual fue mantenida durante todas las mediciones usando un baño de agua en recirculación ( Cole Parmer Polystat, U.S. y un Peltier ARG2).



**Figura 10.** Lavado traqueo bronquial



**Figura 11.** Reómetro de esfuerzos controlados

### 6.3 Pruebas de cizalla simple

Las mediciones a cizalla simple fueron determinadas a una temperatura de 39°C sobre un rango de velocidad de corte de 0.1 a 1000 s<sup>-1</sup>. Para ello, se empleó una geometría de cilindros concéntricos de aluminio (doble Gap, diámetros del cilindro interno, 20.38 mm; diámetro del cilindro externo, 21.96 mm y altura de 59.50 mm) para las muestras de moco. La viscosidad fue estimada en función de la velocidad de corte,  $\eta(\dot{\gamma})$ . Los datos experimentales fueron correlacionados con el modelo reológico de Maxwell-Cross [Macosko, 1994].

#### 6.3.1 Prueba de cizalla oscilatoria de baja amplitud de deformación

La región viscoelástica lineal fue determinada para las muestras a través de un barrido de deformación a una frecuencia fija de 31.42 rad/s. Las propiedades viscoelásticas (módulo de almacenamiento  $G'$  y módulo de pérdida  $G''$ ) de todas las muestras fueron determinadas dentro de la región viscoelástica lineal; a fin de evitar colapsar la estructura del material, ya que este tipo de pruebas de pequeña amplitud de deformación son pruebas no destructivas. Las pruebas de barrido de frecuencia fueron llevadas a una temperatura de 39 °C en un rango de frecuencia angular de 1 a 100 rad/s para todas las muestras.

La amplitud de la deformación para las mediciones de barrido de frecuencia fue estimada previamente mediante pruebas de barrido de deformación y fijada como constante para todos los casos. Todas las pruebas tanto de cizalla simple como viscoelásticas se realizaron por duplicado. Antes de iniciar el estudio reométrico se verificó que las deformaciones fueran hechas en la zona de viscoelasticidad lineal, para que las funciones materiales obtenidas estuvieran en función únicamente de la estructura del material y del tiempo, y no de la magnitud del esfuerzo o deformación impuesta al material.

En las pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud de deformación se siguen la evolución de los módulos  $G'$  (de almacenamiento o elástico) y  $G''$  (de pérdida o viscoso) a fin de investigar el comportamiento en la estructura del material. Por otro lado, las gráficas de módulo complejo ( $G^*$ ) ante frecuencia ( $\omega$ ) y las de ángulo de fase ( $\delta$ ) ante frecuencia ( $\omega$ ), son otra forma comúnmente empleada para representar el comportamiento reológico de

estos materiales. Algunos autores en la literatura emplean estos diagramas para tratar de explicar la morfología de los algunos materiales, ya que el módulo complejo ( $G^*$ ) es una medida de la resistencia del material a la deformación que se obtiene de la sumatoria de los módulos. Del mismo modo el ángulo de fase ( $\delta$ ) es una medida del comportamiento viscoelástico del material, obtenida de la división del módulo viscoso entre el elástico. Ambas variables se consideran como una medida del cambio en la estructura de este tipo de materiales. [Barnes, 2000].

### 6.3.2 Determinación de esfuerzo de cedencia empleando el modelo Bautista- Manero- Puig (BMP)

Se obtuvieron curvas de flujo en estado estacionario con velocidades de deformación de 0.001 a  $10 \text{ s}^{-1}$  a una temperatura de  $39 \text{ }^\circ\text{C}$ . La programación del algoritmo y simulación dinámica se realizó con base en el modelo BMP y al modelo de Casson.

Modelo de Casson:

$$\tau^{\frac{1}{2}} = \tau_y^{\frac{1}{2}} + \left( \eta \dot{\gamma} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Donde  $\tau_y$  es el esfuerzo de cedencia,  $\eta$  es la viscosidad del fluido y  $\dot{\gamma}$  la rapidez cortante aplicada al fluido.

Por otro lado, el modelo BMP habiendo sido desarrollado se llega a la siguiente expresión, la cual describe la evolución de la fluencia en función de la rapidez de corte:

$$\varphi(\dot{\gamma}) = \frac{\left[ -\left(k\lambda\dot{\gamma}^2 - \varphi_0\right) + \left(\left(k\lambda\dot{\gamma}^2 - \varphi_0\right) + 4k\lambda\dot{\gamma}^2\varphi_\infty\right)^{\frac{1}{2}} \right]}{2}$$

Donde, los parámetros tiene el mismo significado que para la expresión. [Fredrickson, 1970] demostró que  $\varphi_0 \rightarrow 0$ , el material se comporta como un plástico de Bingham (se presenta el esfuerzo de cedencia). Tomando en cuenta dicha consideración, la ecuación anterior puede ser reescrita de la siguiente manera:

$$\tau_y = \left(k\lambda\varphi_\infty\right)^{\frac{1}{2}}$$

Ésta predice el esfuerzo de cedencia de un fluido en función a sus variables cinéticas y estructurales; además considera parámetros que pueden determinarse experimentalmente ( $\varphi_{\infty}$ ).

#### **6.4 Análisis Estadístico**

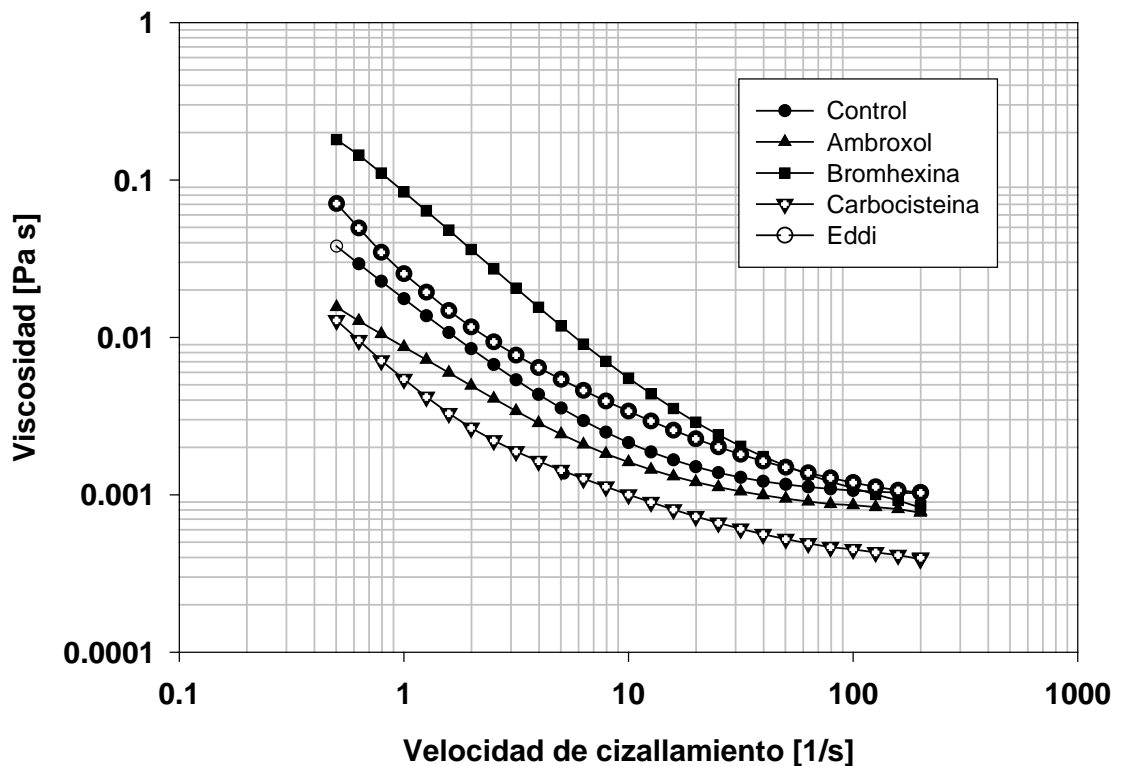
El análisis se realizó para las variables viscosidad y esfuerzo de cedencia en el tiempo final, es decir al final de cada prueba. Después de hacer pruebas de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk para cada variable.

Se realizó un análisis de Kruskal Wallis de muestras independientes para las variables de viscosidad y elasticidad en el tiempo final. Considerando un nivel de significancia de 0.05

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Resultados de flujo a cizalla simple

El comportamiento al flujo de cizalla simple que exhibieron las muestras de moco es no newtoniano del tipo pseudoplástico adelgazante a la cizalla ( $n < 1$ ), lo que indica que su viscosidad disminuye al incrementar la velocidad de deformación para todos los grupos **Figura 12**. La disminución de la viscosidad con la velocidad de corte se atribuyó a la ruptura de la estructura interna del fluido, debido por interacciones físicas entre las macromoléculas, así a medida que aumenta la velocidad de corte, las fuerzas se debilitan y las moléculas se orientan a lo largo de las líneas de flujo. Los datos experimentales del moco de las aves sanas se ajustaron perfectamente al modelo de Cross. **Cuadro 1**.



**Figura 12.** Comportamiento al flujo de cizalla simple de los diferentes grupos administrados con los mucolíticos.

**Cuadro 1.** Parámetros del modelo de Cross con muestras de moco para los distintos tratamientos.

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/Kg peso corporal)	Volumen administrado (mL)	$\eta_0 \infty^*$ (Pa * s)	m** (-)	$\lambda$ *** (s)
Control	Agua estéril	0	5	0.0009842 <sup>a</sup>	1.158	1116
T1	Ambroxol	0.5	5	0.0007526 <sup>b</sup>	0.9757	21.78
T2	EDDI	33	5	0.001032 <sup>c</sup>	1.071	1.071
T3	Carbocisteina	40	5	0.0004055 <sup>d</sup>	1.000	6.005
T4	Bromhexina	0.5	5	0.0007640 <sup>e</sup>	1.215	920.5

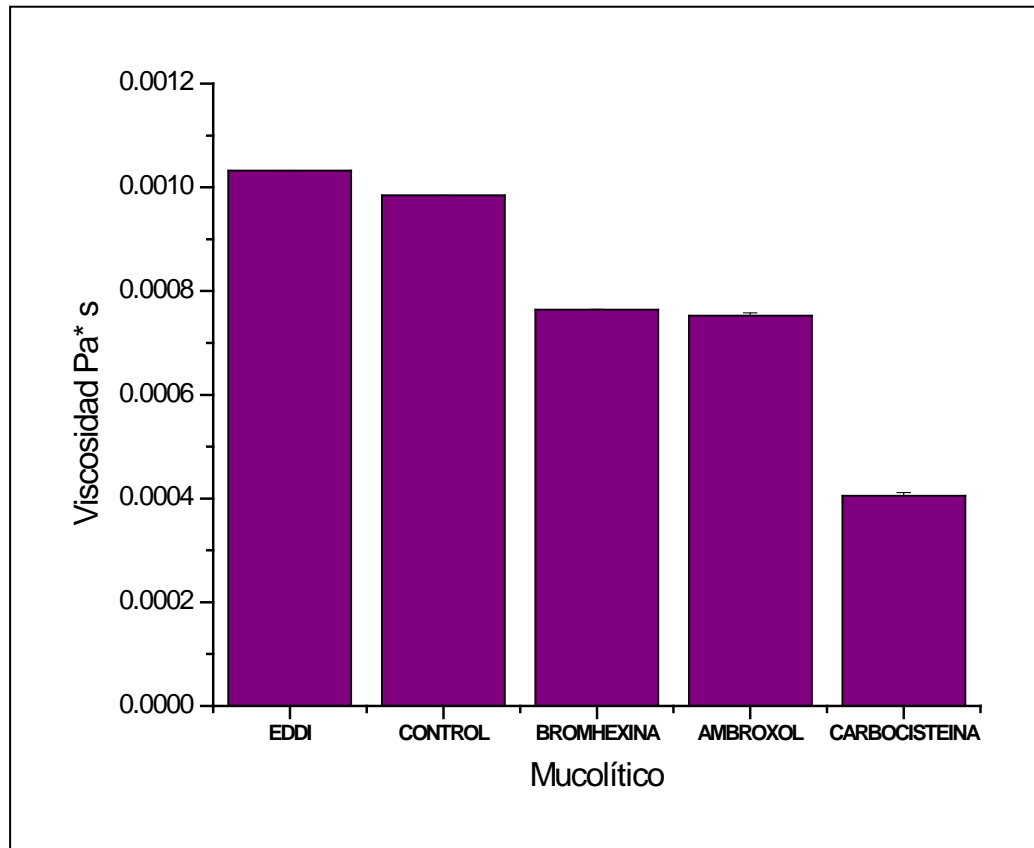
<sup>a-c</sup> Los valores en la misma columna con diferentes superíndices tienen diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) \*  $\eta_0$ = viscosidad infinita; \*\*m= índice de adelgazamiento; \*\*\*  $\lambda$  = tiempo en alinearse al flujo.

Los valores de  $\eta_0$  mayores se refieren a una mayor viscosidad a baja velocidad de cizalla,  $\eta_0$  disminuyó al aumentar la velocidad de corte. El parámetro  $\lambda$  indica el tiempo característico del material, es decir, el tiempo en el cual las cadenas poliméricas en la secreción del tracto respiratorio de los pollos sufren un cambio conformacional por el incremento de la velocidad de deformación. Los mayores valores de  $\lambda$  significan que la zona newtoniana permanece más tiempo antes de pasar a la zona pseudoplástica. La magnitud de m está relacionada con el índice de flujo, el incremento de m sugiere un comportamiento adelgazante más pronunciado; m tiende a cero para fluidos más newtonianos, mientras para fluidos más pseudoplásticos tiende a la unidad [Barnes, 2000].

Las curvas de viscosidad como se observan en la **Figura 12** van en función del comportamiento de las secreciones de moco y de las modificaciones que los fármacos mucolíticos producen en las aves sanas. La conducta de adelgazamiento por corte no newtoniano en todos los grupos, se atribuye en función de los fármacos mucolíticos administrados (n <1).

El comportamiento observado es del tipo adelgazante al flujo (n<1) el cual se atribuye a las interacciones físico-químicas presentes y a la presencia de componentes de alto peso molecular que se alinean en dirección del flujo resultante cuando la rapidez de flujo se incrementa, lo que causa menores interacciones entre las cadenas adyacentes, y en consecuencia la viscosidad se reduce. Véase **Figura 13**





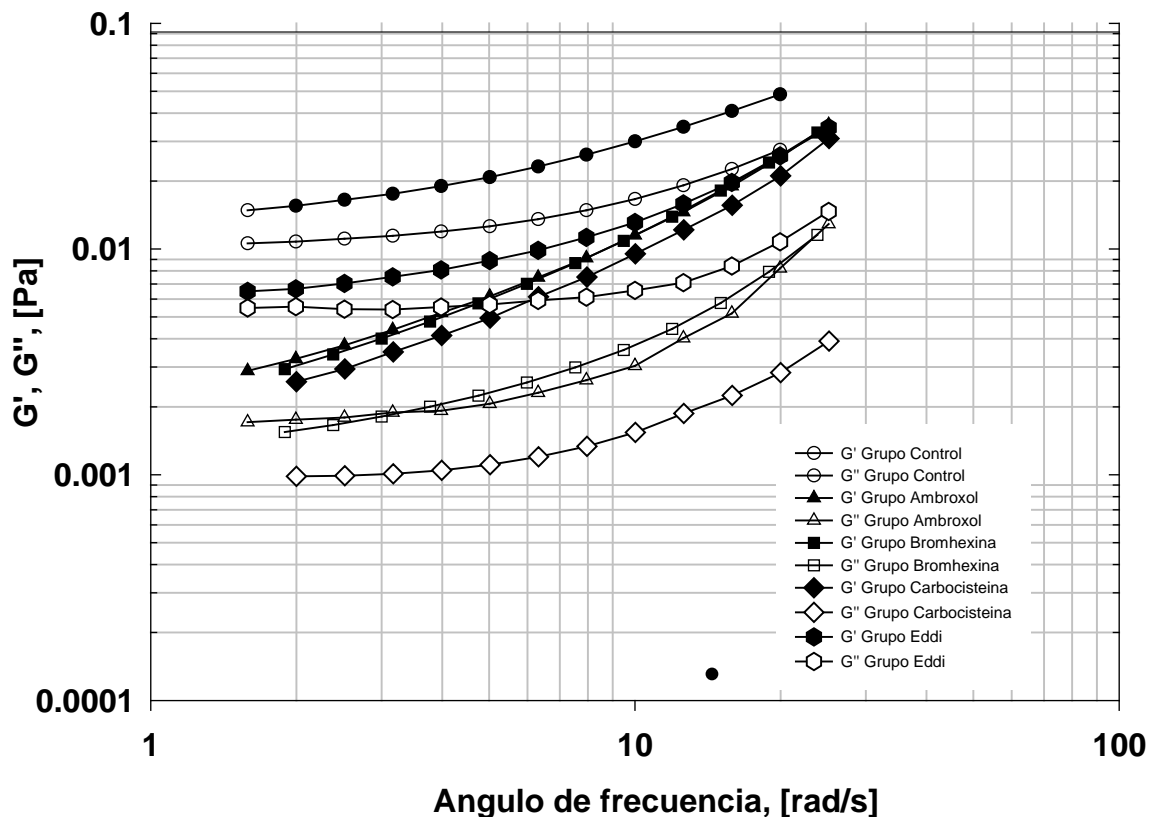
**Figura 13.** Comportamiento de viscosidad de los diferentes grupos administrados con los mucolíticos.

## 7.2 Resultados de viscoelasticidad lineal

La viscosidad es directamente proporcional al peso molecular, el cual depende de la configuración de la cadena polimérica, ya que los entrecruzamientos aléatorios presentes dificultan el flujo; sin embargo, a altas velocidades de corte los entrecruzamientos desaparecen, las cadenas se deslizan una sobre otra y la respuesta viscosa depende sólo de la concentración [Barnes, 2000].

Las determinaciones de los módulos de pérdida  $G''$  y de almacenamiento  $G'$  además de viscosidad compleja en función de la frecuencia fueron realizados ( $0.1-100 \text{ s}^{-1}$ ) en la región visco elástica lineal para los distintos tratamientos. En la **Figura 14** se muestra la variación

de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), se observó que todos las muestras presentan comportamiento pseudosólido por lo que el módulo viscoso predomina sobre su módulo elástico  $G'' > G'$  con la misma frecuencia en todo el rango estudiado. Este espectro es representativo de un comportamiento viscoelástico. En las determinaciones de los módulos de pérdida  $G''$  y de almacenamiento  $G'$  en función de la frecuencia se observó que las componentes elásticas y viscosas son representaciones de las modificaciones que existen en las interacciones interparticulares para los diferentes tratamientos, se puede predecir que el grupo carbocisteína existe una unión intermolecular con enlaces muy débiles por lo que las cadenas de glicopolisacáridos que conforman la estructura del moco se separan muy fácilmente con forma es sometido a las fuerzas oscilatorias en las pruebas no destructivas.

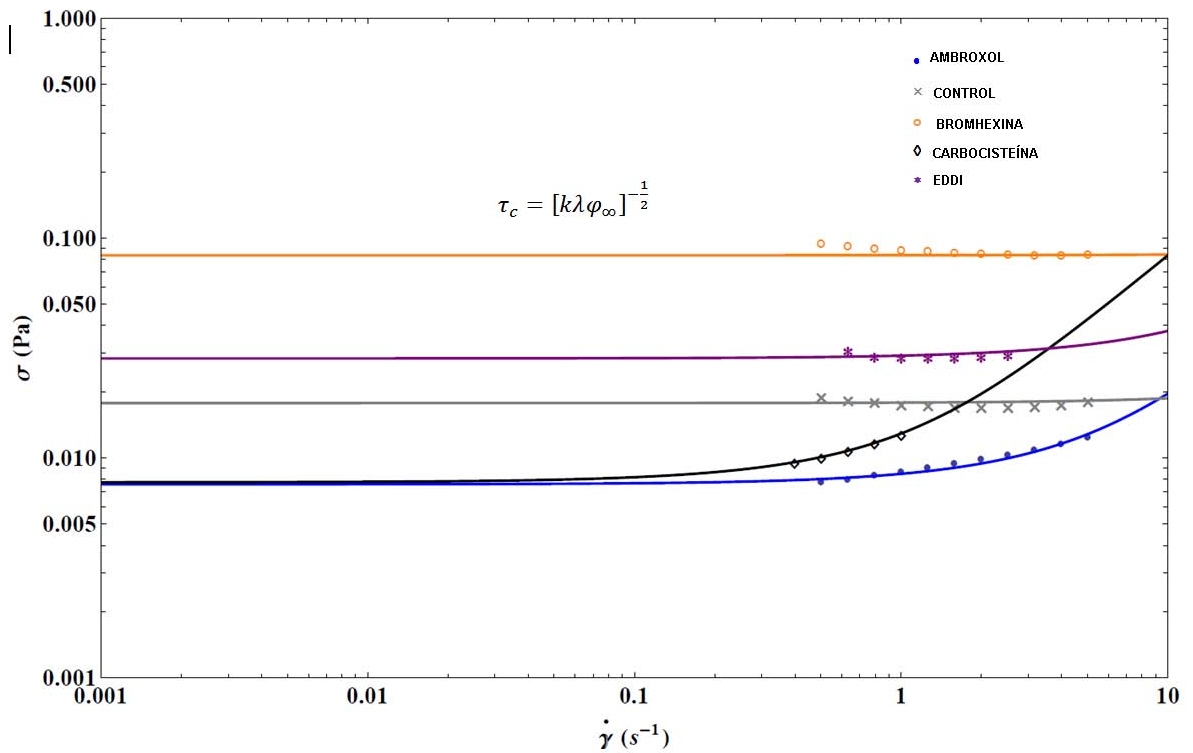


**Figura 14.** Curvas de viscoelasticidad de  $G'$  y  $G''$  vs frecuencia de diferentes grupos administrados con los mucolíticos.

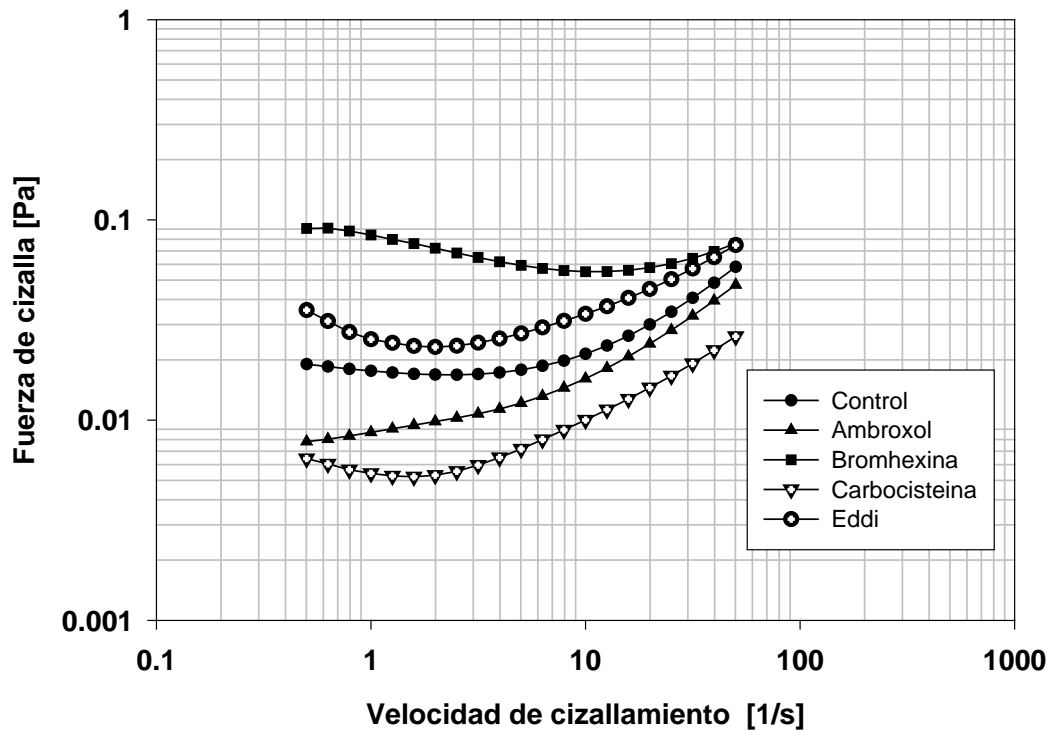
### 7.3 Resultados de esfuerzo de cedencia

Se presenta el esfuerzo de cedencia (fuerza para que puedan fluir) en todos los tratamientos incluyendo al control, tal como se muestra en la **Figura 15 y 16** a bajos cortes, en dirección a la dirección al flujo, esto debido a las interacciones entre las cadenas adyacentes a bajos flujos.

El comportamiento de adelgazamiento por corte no newtoniano se atribuye en función de los fármacos mucolíticos administrados ( $n < 1$ ). Como se observa en la **Figura 15 y 16**, el grupo que mayor esfuerzo de cedencia presenta es bromhexina seguido de eddi, control, carbocisteína y ambroxol respectivamente. Véase **Cuadro 2**



**Figura 15.** Esfuerzo de cedencia de los diferentes grupos administrados con los mucolíticos ajustados al modelo BMP



**Figura 16.** Esfuerzo de cedencia de los diferentes grupos administrados con los mucolíticos ajustados al modelo de Casson.

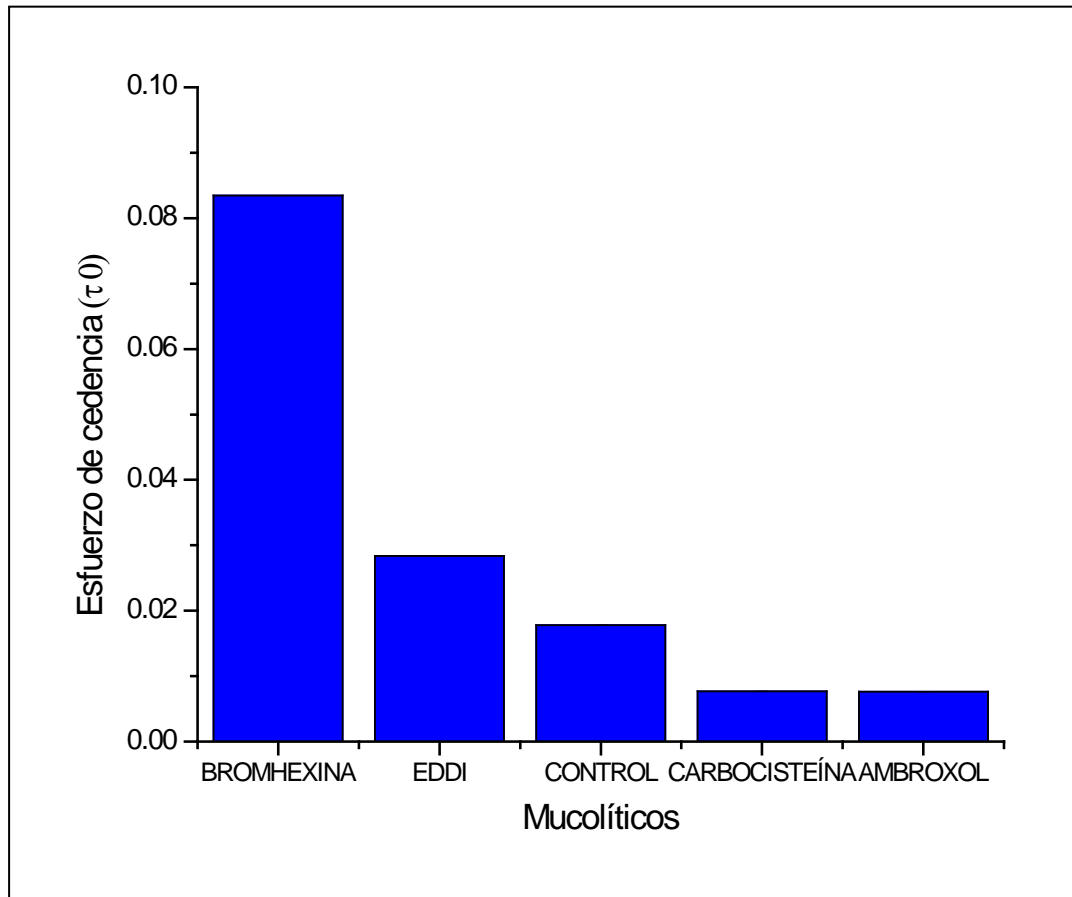
Cabe mencionar que el modelo BMP resulta de consideraciones cinético-estructurales y consideraciones físicas, el propio modelo genera un comportamiento que predice el esfuerzo de cedencia. Por otro lado, el modelo de Casson surge de una regresión lineal de una serie de datos experimentales que si bien estiman el esfuerzo de cedencia (fuerza necesaria para que el fluido pueda desplazarse) no ofrece una explicación al fenómeno físico que provoca que un fluido exhiba el fenómeno de esfuerzo de cedencia.

**Cuadro 2.** En el cuadro se muestran los valores numéricos del esfuerzo de cedencia calculado mediante el modelo BMP para muestras de moco con distintos mucolíticos.

MUESTRA	PARÁMETROS	ESFUERZO DE CEDENCIA (Pa)
BROMHEXINA	$k = 0.208$ $\lambda = 0.092$ $\varphi_{\infty} = 7500$	$\tau_c = 0.083472$
EDDI	$k = 0.156$ $\lambda = 13.2$ $\varphi_{\infty} = 604$	$\tau_c = 0.028356$
CONTROL	$k = 4.9$ $\lambda = 0.115$ $\varphi_{\infty} = 5620$	$\tau_c = 0.017769$
CARBOCISTEÍNA	$k = 50$ $\lambda = 2.87$ $\varphi_{\infty} = 118$	$\tau_c = 0.007689$
AMBROXOL	$k = 37.8$ $\lambda = 0.765$ $\varphi_{\infty} = 600$	$\tau_c = 0.007592$

Para la predicción de esfuerzo de cedencia se utilizó la ecuación constitutiva de BMP; en el estudio de las secreciones del **tracto respiratorio de las aves sanas**, éste reprodujo satisfactoriamente las curvas de flujo experimentales de los diferentes tratamientos a bajos flujos, estimando el esfuerzo de cedencia. El modelo además de estimar el valor numérico del esfuerzo de cedencia, da una interpretación cinético-estructural del fenómeno que provoca que un fluido exhiba esfuerzo de cedencia.

Como se muestra en el **Cuadro 2** y **Figura 17** en orden descendente se observan los resultados del modelo BMP los cuales nos indican que el grupo de bromhexina requiere mayor fuerza para que la secreción de moco pueda fluir y el grupo ambroxol es el que requiere menor esfuerzo de cedencia.



**Figura 17.** Esfuerzo de cedencia (fuerza necesaria para poder fluir) de los diferentes grupos administrados con los mucolíticos.

## 8. DISCUSIÓN

La disminución de la viscosidad con la velocidad de corte se atribuye a la ruptura de la estructura interna del fluido, el cual está constituido por macromoléculas unidas por interacciones físicas como se observa en el comportamiento de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), el cual con  $G'' > G'$  se asocia con el aumento en la fracción volumétrica de sólidos, así a medida que aumenta la velocidad de corte, las fuerzas se debilitan y las moléculas se orientan a lo largo del flujo teniendo como consecuencia la disminución de su viscosidad [Medina-Torres et al., 2000].

La viscosidad evaluada en las secreciones bronquiales de las aves se ve modificada a diferentes niveles por la administración de los productos mucolíticos. Se ha observado que un moco poco o nada viscoso (parecido al agua) no podrá ser expulsado activamente por los cilios; además dada su baja o nula elasticidad no se transmitirá la energía al estirarse y simplemente se fragmentará como el agua y tenderá a ubicarse en el fondo de los cilios como lo observado con carbocisteína [Majima., 2002]. De manera contraria, un moco muy viscoso y poco elástico por aumento de la resistencia al estiramiento no puede ser desplazado por el batir de los cilios, como podría ser en este caso el ambroxol. De tal forma existe un nivel crítico de viscosidad del moco para hacer eficiente su expulsión activa por el movimiento de los cilios, el cual no ha sido establecido en aves sanas y mucho menos en aves que cursan con algún problema respiratorio [Foster, 2002]. Estas consideraciones coinciden con lo descrito por otros autores [James y Pi-Wan Cheng, 1994].

El comportamiento observado es del tipo adelgazante al flujo ( $n < 1$ ), y ha sido reportado [Cárdenas *et al.* 1997 y Medina-Torres *et al.*, 2000] Estos autores atribuyen el adelgazamiento al flujo a las interacciones físico-químicas a la presencia de componentes de alto peso molecular.

Es de gran importancia señalar que la baja viscosidad del moco no significa que sea más fácil de expulsar; sin embargo sería de gran utilidad en pollos de pocos días de edad debido a que se hace prioritario el paso libre del aire con la presencia de moco acuoso. De lo contrario la presencia de moco altamente viscoso daría como consecuencia la obstrucción

total de las vías respiratorias, y por ende provocaría la muerte del animal. El contar con las bases y el conocimiento del comportamiento reológico de los mucolíticos en la industria avícola permitiría al clínico realizar una elección del mucolítico ideal en cada una de las infecciones de vías respiratorias que se le presenten, lo cual finalmente se vería reflejado en una mayor efectividad clínica [Homidan et al., 2003; Bottje et al., 1998].

Es importante considerar que los resultados fueron obtenidos en aves sanas con un epitelio ciliar no afectado por *Mycoplasma* spp, amonio, polvo, o cualquier otro agente que produce aumento en la secreciones de las vías respiratorias. Se puede predecir que el punto crítico de viscosidad para expulsar el moco sea diferente en aves enfermas, ya que en éstas se ha incrementado, tanto la cantidad de moco como modificado sus propiedades reológicas.

Además es importante considerar que las dosis de la mayoría de los mucolíticos utilizados en avicultura son extrapolaciones de otras especies y no existe una justificación de las dosis recomendadas, exceptuando a ambroxol y bromhexina [ EMEA, 1998 ]. Por lo tanto este trabajo se puede considerar como punta de lanza para futuras investigaciones, tanto para establecer dosis óptimas como para identificar las modificaciones en animales enfermos y sus posibles contribuciones a una terapéutica ideal de mucolíticos. Se recomienda realizar más pruebas reológicas en aves que cursen con alguna enfermedad respiratoria para poder establecer los parámetros reológicos y seleccionar fármacos mucolíticos con base en un mayor conocimiento.



## 9. CONCLUSIÓN

El comportamiento al flujo de cizalla simple que exhibieron las muestras de moco es no newtoniano del tipo pseudoplástico a delgazante a la cizalla ( $n < 1$ ), lo que indica que su viscosidad disminuye al incrementar la velocidad de deformación para todos los grupos. La viscosidad evaluada en las secreciones bronquiales de las aves se ve modificada a diferentes niveles por la administración de los productos mucolíticos. Además, se presenta esfuerzo de cedencia (fuerza para que puedan fluir) en todos los tratamientos incluyendo al control; el grupo que mayor esfuerzo de cedencia presenta (necesita mayor fuerza para poder fluir) es bromhexina seguido de eddi, control, carbocisteína, y ambroxol siendo este último el que menor esfuerzo necesita para que pueda ser removido por el batir de los cilios. Para las determinaciones de los módulos de pérdida  $G''$  y de almacenamiento  $G'$  en función de la frecuencia se observó que en todos los tratamientos las componentes de los módulos viscosos predominan sobre los módulos elásticos y son representaciones de las modificaciones que existen en las interacciones interparticulares para los diferentes tratamientos.

## 10. LITERATURA CITADA

- Adams R. (2001). Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Octava edición. Cap. 54. Drugs affecting the respiratory system. 1113-1117
- Barnes H. A. (2000). A Handbook of Elementary Rheology. University of Wales. 55-60, 141-149
- Bang B.G. (1961). The surface pattern of the nasal mucosa and its relation to mucous flow—a study of chicken and herring gull nasal mucosae. *J. Morphol.* 109:57-71
- Bang B.G. (1971). Functional anatomy of the olfactory system in 23 orders of birds. *Acta Anat.* 79(Suppl. 58):1-76
- Bottje W. G., Wangs S., Kelly F.J., Dunster C., Williams A. and Mudway I. (1998). Antioxidant Defenses in Lung Lining Fluid of Birds; Impact of poor ventilation conditions. *Poult Sci.* 77(4):516-522
- Brackenbury J.H.(1987). Ventilation of the lung-air sac system. *Bird Respiration. Vol I.* T.J. Seller, ed. CRC Press, Boca raton, 39-69
- Calderas F., et al. (2013). On the yield stress of complex materials. *Korean-Australia Rheology J.* (25)4: 233-242
- Cárdenas A., Higuera-Ciapara, I. y Goycoolea, F. M. (1997). Rheology and Aggregation of Cactus (*Opuntia ficus-indica*) Mucilage in Solution. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 2, 152–159.
- Cottel G.P., Surkin H.B. (1995). Pharmacology for respiratory care practitioners. *Drugs Affecting the Respiratory System; Mucokinetic, Surface-Active and Antitussive Agents.* Cap.15 : 201-218
- Davidson F.;Kaspers B. and Schat A.K. (2008). *Avian Immunology*; First Edition:273-284
- De Larrard F., (1999). Concrete mixture proportioning a scientific approach, in: S. Mindess, A. Bentur (Eds.), *Modern Concrete Technology Series* No. 7, EFN S PON, London 421
- Duncker H.R. (1971). The lung air sac system of birds. A contribution to the functional anatomy of the respiratory apparatus. *Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch.* 45(6):1-171
- EMA.(1998a). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMEA/MRL/503/98-FINAL URL:[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500011112.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011112.pdf).

- Fedde M.R. (1998). Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poult Sci* 77:1130-1138
- Fedde M.R. (1987). Respiratory muscles. *Bird respiration*, Vol I.T.J. Sellar, ed. CRC Press, Boca raton, 3-37
- Foster W .M. (2002) Mucociliary T ransport a nd C ough i n H umans. *P ulmonary Parmacology &Terapeutics* 15:277-282
- Flórez J . ( 2008). F armacología H umana. C ap. 43 F ármacos a ntitusígenos, m ucolíticos, surfactante pulmonar y estimulantes de la respiración. 5a ed. pp. 721-730
- Fredrickson A.G., (1970). A model for the thixotropy of suspensions, *AIChE J.* 16 436.93-113
- Goodwin, I. W . y Hudhes, R . W . *R heology f or C hemist.* ( 2008). An i ntroduction. 2nd edition, RSC publishing. ISBN: 978-0-85404-839-7
- Gómez J, Mosqueda A, y Ocampo L. (2002). *Terapéutica Avícola*. Segunda edición. Cap. 7: 223-261
- Homidan A; Roberson J.F; Petchey A.M.(2003). Review of the effect of ammonia and dust concentrations on broiler performance. *World's Poult Sci J.* 59(3) 340-347
- James M . S amet, Pi-Wan C heng. (1994). The R ole of A irway M ucus i n P ulmonary Toxicology. *Environmental Health Perspect* 102 (Suppl 2) pp. 89-103
- Karlheinz D., Grayson I., Kleemann A, Hans-Peter K rimmer, Wolfgang Leuchtenberger, Christoph Weckbecker “Amino Acids” in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2007, Wiley-VCH, Weinheim. [doi:10.1002/14356007.a02\\_057.pub2](https://doi.org/10.1002/14356007.a02_057.pub2)
- Klika E., Scheuermann D., De Groot-Lasseel, Bazantova I., Switka A. (1996). Pulmonary macrophages i n bi rds (barn ow l, T yto t yto alba), dom estic f owl ( Gallus g allus F . domestica), quail (Coturnix coturnix), and pigeons (Columbia livia). *Anat Rec.* 246:87-97
- King M.; Rubin B.K. (2002). Pharmacological approaches to discovery and development of new mucolytic agents. *Adv Drug Delivery Rev.* (54) pp. 1475-1490
- Macosko C .W. (1994). *Rheology: P rinciples, Measurments and A pplications*, Wiley-VCH.Toronto. Capítulo 1.
- Majima Y. (2002). Mucoactive medications and airway disease. *Paediatrics Resp. Reviews*, 3:104-109

- Mansmann R.A.(1998). How to perform bronchoalveolar lavage ( BAL) in practice. In: Proceedings of the 44 th AAEP Convention, 186-188
- Martindale, (2009). The Complete Drug Reference. Thirty-sixth edition, 1552-1553
- Malerba M., (2008). Expert Opin Drug Metab Toxicol. 4: 1119-1129
- McLelland J. (1989a). Larynx and trachea. Form and Function in birds. Vol. 4 A.S.King and J. McLelland, ed. Academic Press, London, UK, 69-103
- McLelland J. (1989b). Anatomy of the lungs and air sacs. Form and Function in birds. Vol. 4 A.S.King y J. McLelland, ed. Academic Press, London, UK, 221-279
- Medina-Torres L., Brito de la Fuente E., Torrestiana-Sánchez B., y Kattain R.(2000). Rheological properties of the mucilage gum (Opuntia ficus indica)". Food Hydrocolloids, 14:417-424
- Mensah G.A., Brain B. ( 1982). Deposition and clearance of inhaled aerosol in the respiratory tract of chickens. J. Appl. Physiol. 53:1423-1428
- Morris E.R., Cutler A.N., Ross-Murphy, D.A., y Rees J.P. (1981). Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. Carbohydrates Polymers, 1, 5-21
- Muller, H. G. (1977). Introducción a la Reología de los Alimentos. Zaragoza, España.
- Nickel R.A. (1977) Schummer, E. Seiferle, W.G. Siller, and P.A.L. Wight. Anatomy of the domestic birds, springer-verlag, New York, NY, 62-69
- Nigot P.K., Kotle G.N., Ghalsasi G.R.( 2008). Pathology of avian respiratory diseases. Venkateshguara Hatcheries Ltd. Una India
- Prause JU, Frost\_Larsen K, Hoj L, Isager H, Manthorpe R. (1984). Lacrimal and salivary secretion in Sjogren's syndrome: the effect of systemic treatment with bromhexine. Acta Ophthalmol (Copenh) Jun 62:3 489-97
- Riviere J.E., Papich M.G., (2009). Veterinary Pharmacology & Therapeutics. Ninth Edition, Cap. 49 Drugs that affect the respiratory system. 1306-1307
- Scheid P, Piiper J.(1989). Respiratory mechanics and air flow in birds. Form and function in birds. Vol 4 A.S. King and McLelland, ed Academics Press, London, UK, 369-391
- Scheid P. Fedde M.R., Piiper J. (1989). Gas exchange and air sac composition in the unanesthetized, spontaneously breathing goose. J. Exp. Biol. 142:373-385

Silberberg A. Basic rheological concepts. (1977). In *Mucus in Health and Disease*, Ed. M Elstein, DV Podke, New York: Plenum, 181-190

Stearns R.C., Barnas G.M., Walski M., Brain D. (1987). Deposition and phagocytosis of inhaled particles in the gas exchange region of the duck, *Anas platyrhynchos*. *Respir. Physiol.* 67:23-36

Sturkie P. D. (2000). *Avian Physiology*. Chap. 10 Respiration. *Anatomy of the Avian Respiratory System*. 234-236

Sumano L. H., Gutiérrez O. L. (2008). *Farmacología Clínica en aves comerciales*, 4ª. ed. pp. 663-671

Sumano, H.; Gracia, I.; Capistran, A.; Meade, G.; Rivero, A.; Ruiz-Ramirez, L. (1995). Use of ambroxol and bromhexine as mucolytics for enhanced diffusion of furaltadone into tracheobronchial secretions in broilers. *British Poultry Sci.* 36(3): 503-507

Toth T. E., Siegel, (1986) Cellular defense of the avian respiratory tract. Paucity of free-residing macrophages in the normal chicken. *Avian Dis.* 30:67-75

Toth, T.E. Siegel, Veit H. (1987) Cellular defense of the avian respiratory system. Influx of phagocytes: Elicitation versus activation. *Avian Dis.* 31:861-867

Toth, T.E., Pyle R.H., Cacciopoli P.B. Siegel, Ochs. (1988). Cellular defense of the avian respiratory system. Influx and nonopsonic phagocytosis by respiratory phagocytes activated by *Pasteurella multocida*. *Infect Immun.* 56:1171-1179