



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Mecanismo de acción y efecto útero relajante del
carvacrol e indometacina en tejido uterino gestante
aislado de rata Wistar”**

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

M. C. LILIAN SCARLET GERARDO MUÑOZ

Director de Tesis

DR. MARIO ISIDORO ORTIZ RAMÍREZ

Co-Director de Tesis

DR. VÍCTOR MANUEL MUÑOZ PÉREZ

San Agustín Tlaxiaca Hgo. Mayo de 2021



05/mayo/2021
 AAM/MCBS/038/2021
 Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Lilian Scarlet Gerardo Muñoz
Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Efecto útero relajante del carvacrol e Indometacina en tejido uterino gestante aislado de rata Wistar" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE Dr. Luis Enrique Soria Jasso
- PRIMER VOCAL Dr. Mario Isidoro Ortiz Ramírez
- SECRETARIO Dr. Víctor Manuel Muñoz Pérez
- SUPLENTE Dra. Raquel Cariño Cortés
- SUPLENTE Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.



Atentamente
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
 DIRECTOR

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
 COORDINADOR DEL PROGRAMA

DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
 COORDINADORA DE POSGRADO ICSA



Circuito ex-Hacienda La Concepcion s/n Carretera
 Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo.
 México. C.P. 42160
 Telefono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
 medicina@uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 921189.

Agradezco al Centro de Investigación de Biología de la Reproducción del Área Académica de Medicina, Escuela de Medicina Ramírez Ulloa de la Universidad Autónoma del estado de Hidalgo por prestar su apoyo, recursos e infraestructura para la realización de la investigación y tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Mario I. Ortiz por la oportunidad de ser mi tutor, agradezco su paciencia, interés y tiempo prestado a mi persona e investigación realizada, por su exigencia académica. Por ser ejemplo admirable de constancia y excelencia.

Al Dr. Víctor Manuel Muñoz Pérez por el apoyo incondicional como co-tutor y amigo, agradezco su confianza y ánimo brindado, así como su interés en mi formación profesional y personal. Es de admirar su disposición incondicional para enseñar.

Al Dr. Eduardo Fernández, maestro exigente. Agradezco su paciencia, tiempo y apoyo brindado.

A la Dra. Raquel Cariño, agradezco y admiro su manera de enseñar y explicar, así como sus consejos y motivación.

Al Dr. Luis Soria Jasso por la confianza y los consejos académicos y de vida, agradezco sus importantes contribuciones para esta tesis.

A la Biól. Metztli Ramírez, por su excelente trabajo y responsabilidad que quedó demostrada durante nuestras extensas jornadas en el laboratorio, agradezco su compañerismo académico que se transformó en amistad.

Con inmensa gratitud a mi madre Magnolia Muñoz por impulsarme a dar este paso en la vida, agradezco su motivación y acompañamiento, su cariño y sus consejos, su exigencia y ejemplo de vida; agradezco a mis hermanos Sarah y Ayrton Gerardo quienes con su presencia, cariño y apoyo hicieron llevadera, soportable y divertida esta etapa, agradezco su disposición para acompañarme en sus ratos libres al laboratorio, a ellos que son mi familia les dedico esta tesis.

Al Ing. Ricardo Cabrera por su presencia, cariño y motivación desde el primer momento de esta etapa académica.

A mis mejores amigos: L. G. Moisés Samuel Lara Ruiz y M. C. Luis Omar Figueroa Arreguín, por su amistad incondicional, apoyo y ánimo, su tiempo y su compañía, gracias.

A mis compañeras de generación de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud: L.N. Blanca Hernández, L.N. Ma. Fernanda Reséndiz e Ing. En Biotecnol. Lorena Cabrera, con quienes el compañerismo trascendió y forjó lazos de amistad que seguramente serán vitalicios.

Agradezco a la Dirección de Servicio Médico Universitario de la UAEH, en especial al M. C. Esp. Miguel Ángel Islas Cruz y a la M. C. Flor Anaya Chávez por todo el apoyo y las facilidades brindadas durante el posgrado.

Agradezco a la coordinación de la maestría, al Dr. Manuel Sánchez y a la Dra. Jeannett Izquierdo, quienes fueron guía de principio a fin.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	12
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	15
PALABRAS CLAVE	16
ABSTRACT	16
KEYWORDS.....	17
I. INTRODUCCIÓN.....	18
II. ANTECEDENTES.....	19
II.1 Generalidades.....	19
II.1 Parto prematuro.....	19
II.1.1 Definición de parto prematuro.....	19
II.1.2 Factores de riesgo para parto prematuro.....	20
II.1.3 Epidemiología.....	20
II.1.4 Fisiopatología del parto prematuro.....	20
II.2 Músculo liso.....	22
II.2.1 Mecanismo contráctil.....	22

II.2.2	Contracción y relajación del músculo liso.....	22
II.2.3	Control hormonal.....	25
II.3	Diagnóstico del parto prematuro.....	26
II.3.1	Tratamiento actual.....	26
II.4	Carvacrol.....	27
II.4.1	Naturaleza y estructura química.....	27
II.4.2	Mecanismo de acción.....	28
II.4.3	Toxicidad.....	28
II.5	Úteroinhibidores.....	29
II.5.1	Indometacina.....	29
II.5.2	Estructura química.....	29
II.5.3	Farmacocinética.....	29
II.5.4	Farmacodinamia.....	30
II.5.5	Toxicidad.....	30
II.6	Antecedentes del problema.....	30
II.6.1	Propiedades del Carvacrol.....	30
II.6.2	Efecto espasmolítico.....	31
II.6.3	Útero-inhibidores.....	31
III.	JUSTIFICACIÓN.....	33

IV.	HIPÓTESIS	34
V.	OBJETIVOS	34
V.1	Objetivo general	34
V.2	Objetivos específicos.....	34
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
V.3	Contexto de la investigación.	35
V.4	Tipo de estudio	35
V.5	Criterios de inclusión	35
V.6	Criterios de exclusión.....	35
V.7	Animales de experimentación	35
V.8	Fármacos	36
V.9	Reactantes.....	36
V.10	Diagrama de diseño experimental	37
V.11	Sistema de registro isométrico	37
V.11.1	Principio.....	37
V.11.2	Procedimiento	38
V.11.3	Estudio del mecanismo de acción del carvacrol e indometacina	40
V.12	Análisis estadístico.....	40
V.13	Aspectos éticos.....	40

VII.	RESULTADOS	41
VII.1	Efecto útero relajante del carvacrol en contracciones espontáneas.....	41
VII.2	Efecto útero relajante del carvacrol e indometacina en contracciones tónicas inducidas con KCl 60 mM.....	43
VII.3	Efecto útero relajante del carvacrol e indometacina en contracciones fásicas inducidas con oxitocina 1.6 µL.	46
VII.4	Comparación de las curvas concentración - respuesta de la indometacina y el carvacrol con nifedipino en contracciones tónicas inducidas.....	49
VII.5	Comparación de las curvas concentración respuesta de la indometacina y el carvacrol con nifedipino en contracciones fásicas inducidas.	50
VII.6	Comparación de las curvas concentración respuesta de la indometacina y el carvacrol con nifedipino en contracciones fásicas inducidas con KCl sin Ca ²⁺	51
VII.7	Estudio del mecanismo de acción del carvacrol.....	53
VII.8	Estudio del mecanismo de acción de la indometacina.	54
VIII.	DISCUSIÓN.....	56
VIII.1	De manera dependiente de concentración, el carvacrol inhibe las contracciones fásicas espontáneas en útero aislado de rata gestante.....	57
VIII.2	Indometacina y Carvacrol de manera individual inhiben la contracción tónica inducida con K ⁺ en forma dependiente de la concentración.....	57
VIII.2.1	Carvacrol.....	57
VIII.2.2	Indometacina.....	58

VIII.3	Efecto útero relajante de la indometacina y el carvacrol sobre la contracción fásica inducida con oxitocina.....	58
VIII.2.3	Carvacrol.....	59
VIII.2.4	Indometacina.....	59
VIII.4	El efecto útero relajante de la indometacina es más potente que el del carvacrol. 59	
VIII.5	Mecanismo de acción del carvacrol e indometacina.....	60
IX.	CONCLUSIÓN	62
X.	PERSPECTIVAS.....	62
XI.	REFERENCIAS	63
XII.	ANEXOS	69
XII.1	Artículo: Tocolytic effect of the monoterptenic phenol isomer, Carvacrol, on the pregnant rat uterus	69
XII.2	Acta aprobación de CIEQUAL	70
XII.3	Constancia de curso “Manejo de animales de Bioterio”, enero 2019	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación de la contracción del músculo liso.	23
Figura 2. Relajación del músculo liso.	25
Figura 3. Estructura química del carvacrol.....	28
Figura 4. Estructura química de la indometacina.	29
Figura 5. Diseño experimental.	37
Figura 6. Efecto útero-relajante (%) de Carvacrol sobre contracciones espontáneas.	41
Figura 7. La contracción espontánea (sin estímulo).....	42
Figura 8. Efecto relajante del carvacrol (%) sobre estímulo electromecánico de KCl 60 mM.....	43
Figura 9. Efecto relajante de la indometacina (%) sobre estímulo electromecánico de KCl 60 mM.....	44
Figura 10. Curva concentración-respuesta del carvacrol e indometacina.	45
Figura 11. Trazo típico que muestra la inhibición de la contracción tónica inducida por indometacina, nifedipino y carvacrol.	45
Figura 12. Efecto relajante del carvacrol sobre estímulo fármaco mecánico de oxitocina (5 UI/mL) 1.6 µL.	46
Figura 13. Efecto relajante de la indometacina sobre estímulo farmacomecánico con oxitocina (5 UI/mL) 1.6 µL.	47
Figura 14. Curva concentración-respuesta del carvacrol e indometacina.	48
Figura 15. Trazo típico de la inhibición de la contracción fásica inducida.	48

Figura 16. Curva logarítmicas comparativas del efecto del carvacrol, indometacina y nifedipino (control) en contracciones tónicas inducidas con KCL 60 nM.	49
Figura 17. Curvas logarítmicas comparativas del efecto del carvacrol, indometacina y nifedipino (control) en contracciones fásicas inducidas con oxitocina 1.6 μ L.	50
Figura 18. Curvas logarítmicas comparativas del efecto del carvacrol, indometacina y nifedipino (control) en contracciones tónicas inducidas con KCL 60 nM sin Ca^{2+}	51
Figura 19. Trazo típico de la inhibición de la contracción tónica inducida con KCl sin Ca^{2+}	52
Figura 20. Efecto de los diferentes bloqueadores sobre el efecto relajante del carvacrol...	53
Figura 21. Efecto de los diferentes bloqueadores sobre el efecto relajante de la indometacina.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. IC_{50} y $R_{m\acute{a}x}$ de carvacrol, indometacina y nifedipino.....	52
--	----

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina.
ADP	Difosfato de adenosina.
MLC	Cadena ligera de miosina.
RSP	Retículo sarcoplásmico.
PLC	Fosfolipasa C.
IP3	Trifosfato de Inositol.
DAG	Diacilglicerol.
PKC	Cinasa de Proteína C.
Rho-GEF	Factores de intercambio de nucleótidos de guanina.
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico.
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico.
PP	Parto prematuro.
DDG	Días de gestación.
FUM	Fecha de última menstruación.
PRSS	Patrones de reconocimiento de receptores.
COX 1-2	Ciclooxigenasa isoforma tipo 1 o 2.
AINE	Analgésico antiinflamatorio no esteroideo.
FDA	Food Drug Administration.

L-NAME	Clorhidrato de éster metílico de N _ω -nitro-L-arginina.
4-AP	4-aminopiridina.
TEA	Tetraetil amonio.
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalina-1-ona.
SRL	Solución Ringer Locke.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50.
R _{máx}	Respuesta máxima.
ABC	Área Bajo la Curva
ABC _r	Área bajo la curva medido en centímetros previo a la exposición al fármaco.
ABC _i	Área bajo la curva medido en centímetros posterior a la exposición al fármaco.
KCl	Cloruro de potasio.
Ca ²⁺	Calcio.
DMSO	Dimetil Sulfóxido
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
R _{máx}	Respuesta máxima
EEM	Error estándar de la media

RESUMEN

El parto prematuro es el nacimiento del producto de la concepción antes de las 37 semanas de gestación. Uno de los fármacos tocolíticos es la indometacina, cuyos efectos adversos son importantes, por lo que es necesaria una alternativa terapéutica. El carvacrol, del *Origanum vulgare*, demostró efecto espasmolítico en músculo liso. **Objetivo:** Determinar el efecto útero relajante del carvacrol e indometacina, así como su posible mecanismo de acción en útero aislado de rata gestante. **Metodología:** El efecto útero relajante inducido por carvacrol e indometacina se evaluó midiendo la relajación de la contracción inducida farmacomecánica (contracción fásica inducida con oxitocina) y electro mecánicamente (contracción tónica sostenida inducida con KCl) en tiras de útero gestante aislado de rata Wistar. El mecanismo de acción se determinó midiendo el efecto del carvacrol e indometacina contra los diferentes inhibidores (L-NAME, TEA, 4-AP, metformina, cimetidina, propranolol, glipizida, glibenclamida, ODQ y exposición a calcio). **Resultados:** El carvacrol y la indometacina presentan un efecto útero relajante dependiente de concentración en contracciones espontáneas e inducidas fármaco mecánicamente y electro mecánicamente. El efecto útero relajante del carvacrol se vio modificado por biguanida, TEA y 4-AP, lo que propone el mecanismo de acción bloqueador de canales de K^+ dependientes de ATP, dependientes de voltaje y bloqueador de canales de Ca^{2+} . El efecto útero relajante de la indometacina se modificó ante cimetidina, biguanida, L-NAME y propranolol, esta modificación del efecto propone los mecanismos de acción bloqueador de receptores de histamina H_2 , bloqueador de canales de K^+ , bloqueador de la síntesis de óxido nítrico y bloqueador de canales de Ca^{2+} . **Conclusión:** El carvacrol y la indometacina presentan un efecto útero relajante dependiente de concentración. La biguanida, TEA y 4-AP mostraron un efecto sinérgico con el carvacrol. La indometacina, de manera individual presenta un efecto sinérgico con la biguanida por lo que se encuentran los mecanismos de acción bloqueador de receptores de histamina H_2 , canales de K^+ dependientes de ATP y bloqueador de la síntesis de óxido nítrico, además de los ya descritos en la literatura.

PALABRAS CLAVE

Carvacrol, indometacina, efecto útero relajante, parto prematuro, mecanismo de acción, músculo liso.

ABSTRACT

Preterm delivery is defined as the birth of the conception product that occurs before 37 weeks of gestation or less than 259 days of gestation. In Hidalgo State, it represents 18.5% of deaths in children under five years of age (2012). The first-line relaxing uteri indicated for the arrest of labor are prostaglandin inhibitors (indomethacin), which can present adverse effects that are harmful to the binomial; thus, a therapeutic alternative is necessary. Carvacrol, one of the main compounds of *Origanum vulgare*, has shown a spasmolytic effect on gastrointestinal and arterial smooth muscle, as well as analgesic, expectorant, and antibiotic properties.

Objective: To determine the relaxing uterine effect of carvacrol and indomethacin, as well as its possible mechanism of action in the isolated uterus of pregnant rats. **Methodology:**

The relaxing uterine effect induced by carvacrol and indomethacin was evaluated by measuring the relaxation of pharmacomechanical-induced (oxytocin-induced phasic contraction) and induced electromechanically contractions (KCl-induced sustained tonic contraction) in strips of the isolated pregnant uterus from Wistar rat. The mechanism of action was determined by measuring carvacrol and indomethacin effects against the different inhibitors (L-NAME, TEA, 4-AP, metformin, cimetidine, propranolol, glipizide, glibenclamide, ODQ, and exposure to calcium). **Results:** Carvacrol and indomethacin showed a concentration-dependent inhibitory effect on phasic and tonic contractions induced by pharmaco- and electromechanical stimulation; indeed, the effects induced by carvacrol and indomethacin were modified using metformin, TEA, and 4-AP. That suggests the carvacrol can probably block K^+ channels such as one of the K^+ channel blockers mentioned above.

Conclusion: Carvacrol and indomethacin have a concentration-dependent uterus-relaxant effect on spontaneous contractions and those drug-induced and electromechanically. Indomethacin, individually, has a synergistic effect with biguanide, which is why there are mechanisms of action that block H₂ histamine receptors, ATP-dependent K^+ channels, and nitric oxide synthesis blocker, in addition to those already described in the literature.

KEYWORDS

Carvacrol, indomethacin, tocolytic effect, preterm delivery, mechanism of action, smooth muscle.

I. INTRODUCCIÓN

El parto prematuro (PP), de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud se define como el nacimiento del producto de la concepción que ocurre antes de las 37 semanas de gestación (SDG) (1). Representa el 75% de las muertes en menores de 5 años a nivel mundial y el 50% de los supervivientes presenta secuelas neuronales (1,2). En México el Instituto Nacional de Perinatología reporta una incidencia del 19.5% anual, lo cual representa el 38.4% de las muertes neonatales (3). La tocólisis se define como la administración de fármacos para el tratamiento del parto prematuro (4), la cual se centra en inhibir las contracciones uterinas y así poder administrar corticoesteroides, los cuales inducen la maduración pulmonar fetal (5). El carvacrol es un aceite esencial presente en el Orégano (*Origanum Vulgare*) (6) el cual inhibe la vía de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), disminuye la producción de prostaglandinas (7). Estudios como el de Ravanos K, demuestran la efectividad del carvacrol similar a la de la indometacina y el NS-398 (8). La línea de tratamiento para el parto prematuro se centra en inhibir las contracciones efectivas del trabajo de parto desencadenado, dentro de estas opciones de tratamiento se encuentran los antagonistas de receptores de oxitocina, los bloqueadores de canales de Ca^{2+} y los inhibidores de la COX (3) como la indometacina, la cual es un analgésico antiinflamatorio no esteroideo derivado del ácido indolacético, usado comúnmente como antipirético, analgésico y antiinflamatorio (10), en el útero es metabolizada por CYP2C9 y carboxiesterasa (11). Su farmacodinamia consiste en inhibir la COX de manera reversible (10). Como útero relajante presenta un excelente efecto hasta antes de las 32 SDG, su administración posterior se asocia a efectos adversos (13,14). Actualmente ningún medicamento proporciona el 100% de seguridad para el binomio durante el arresto del PP, es por eso que se buscan nuevas opciones, las cuales ofrezcan una terapia efectiva con disminución de los riesgos tanto para la madre como para el producto. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto útero relajante del carvacrol e indometacina y su mecanismo de acción en útero aislado de rata gestante como parte de la contribución para valorar el uso del carvacrol como una posible alternativa terapéutica a futuro.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Generalidades.

El embarazo forma parte del proceso de reproducción humana, éste inicia desde la implantación del óvulo fecundado hasta el nacimiento y alumbramiento de los anexos y cuya duración es de 37-42 semanas (1)

II.1 Parto prematuro

El parto se define como el conjunto de fenómenos pasivos y activos que permiten la expulsión del feto de 22 semanas de gestación o más y sus anexos por vía vaginal (4). Dicho proceso suele presentar complicaciones que pueden ser potencialmente letales para la madre y/o el producto. Una de estas complicaciones es el parto prematuro.

II.1.1 Definición de parto prematuro

La Organización Mundial de la Salud define al PP como el nacimiento del producto de la concepción que ocurre antes de las 37 SDG completas o menos de 259 días de gestación (DDG) contados a partir del primer día de la fecha de última menstruación (FUM) con un peso menor a 2500 g (5). El período comprendido de la semana 1 a la semana 37 es bastante amplio, es por eso que se determina a partir de las 20 0/7 SDG y cuyo trabajo de parto se acompaña de cambios en cérvix, dilatación de más de 2 cm y borramiento del cuello y contracciones regulares y efectivas (6). El PP, de acuerdo a su edad gestacional se clasifica en: 1) PP extremo (de las 20 0/7 a las 23 6/7 SDG); 2) PP temprano (de las 24 0/7 a las 33 6/7 SDG) y 3) PP tardío (de las 34 0/7 a las 36 6/7 SDG) (7) y, de acuerdo a su causa se clasifica en iatrogénico y espontáneo. El PP espontáneo se deriva de infecciones genitourinarias, estrés, *abruptio placentae*, etc. Y el PP iatrogénico o indicado es aquel que se induce ante la existencia de alguna complicación materno-fetal que pone en riesgo la vida (8).

II.1.2 Factores de riesgo para parto prematuro.

Son diversos los factores de riesgo asociados al PP, se clasifican en:

- 1) Condiciones sociodemográficas como edad materna avanzada, raza negra, nivel socioeconómico bajo.
- 2) Estilo de vida como tabaquismo, drogadicción, desnutrición u obesidad materna.
- 3) Antecedentes ginecoobstétricos, como período intergenésico corto, antecedente de parto prematuro previo, gesta múltiple.
- 4) Complicaciones durante la gesta como placenta previa, polihidramnios, oligohidramnios.
- 5) Enfermedades crónico degenerativas maternas.
- 6) Factores psicosociales como estrés y depresión y
- 7) Infecciones, ruptura de membranas o anomalías fetales (9).

II.1.3 Epidemiología

El PP representa el 75% de las muertes neonatales a nivel mundial, del 25% superviviente, el 50% presenta secuelas neuronales (3,10) Se estima que los nacimientos prematuros representan del 5 al 18% de los embarazos mundialmente, en Norteamérica se contabilizan aproximadamente 15 millones por año (11), lo que para Estados Unidos representa un gasto anual de aproximadamente de 26.2 billones de dólares (12). En México, el Instituto Nacional de Perinatología, menciona una incidencia del 19.5% anual, lo cual representa el 38.4% de las muertes neonatales y, en Hidalgo tiene una incidencia del 18.5% (13).

Las consecuencias económicas familiares son realmente importantes puesto que se deben contabilizar los días de estancia en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales y los gastos posteriores derivados de las complicaciones como ceguera, fallo neurológico consecuencia de la hipoxia neonatal, entre otros.

II.1.4 Fisiopatología del parto prematuro

La progesterona, hormona sintetizada en el hipotálamo, mantiene estática la contractilidad uterina bloqueando la síntesis de proteínas asociadas a la contracción muscular como la

conexina 43, disminuye la expresión de oxitocina y del receptor F2 α de prostaglandinas (8) mediante la inhibición de la expresión del gen MIR-200 (11).

Cuando se activan los patrones de reconocimiento de receptores (PRSS), los cuales se expresan sobre células competentes (células Toll – Like), se activa la vía del complemento, estimula fagocitos y desencadena la cascada inflamatoria donde participan citocinas, IL-1 e IL-6 causando estrés oxidativo e hipoxia, esto activa la cascada de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), patrón molecular asociado a patógeno (MAMPs) y receptores de progesterona (PRs) , activando la síntesis de prostaglandinas y expresando el gen CAP (14). Al disminuir la progesterona, los niveles de estrógeno aumentan y estimulan la producción de oxitocina a nivel hipotálamico, liberando al torrente sanguíneo corticoesteroides que estimulan a la glándula adrenal para producir cortisol, lo que induce la maduración pulmonar fetal y, en la placenta expresa el gen de la hormona liberadora de corticotropina (CRHmRNA) para producir estrógeno placentario (por retroalimentación positiva), que se une a sus receptores que se encuentran acoplados a las proteínas G_{q/11}, que activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza al 4,5 bifosfato de inositol generando IP3 y DAG. IP3 se une a sus receptores en retículo sarcoplásmico produciendo la liberación de Ca²⁺. El Ca²⁺ se une a calmodulina desencadenando la contracción uterina (1,15).

Las causas más comunes para que una mujer inicie con una amenaza de PP y/o que entre el labor de parto son, en primer lugar, las infecciones genito-urinarias y el abrupcio placentae (5); durante las infecciones, las bacterias colonizan de manera ascendente por el tracto vaginal, alcanzando el útero y, en ocasiones atravesando la barrera hematoplacentaria. Cuando esto sucede inicia un proceso inflamatorio, los microbios son reconocidos por los receptores tipo Toll (TRLs), quienes inducen quimiocinas y citocinas IL-8, IL-1, CCL-2, IL- β , TNF- α estimulando a los receptores de prostaglandinas quienes inducen el trabajo de parto. Al aumentar la IL-1 y el TNF- α en decidua, ésta activa metaloproteasas de matriz extracelular (MMP)-8 Y MMP-9 disminuyendo las cadenas de fibronectina (apoptosis) lo cual ocasiona ruptura de membranas, consecuentemente, corioamnionitis (11,16). Otra causa es la sobre distensión uterina, causada por gestas múltiples producto de tratamientos de reproducción asistida o bien, causas maternas como la preeclampsia (5).

II.2 Músculo liso.

El músculo liso, a comparación del músculo esquelético, se compone de fibras mucho menores, dispuestas en 2 tipos:

1. Multiunitario → Fibras musculares separadas que actúan por separado, aunque su innervación sea única. Cada fibra está cubierta de colágena fina y glicoproteínas, también se caracteriza por tener control dependiente de estímulos no nerviosos (17).
2. Unitario → También llamado sincitial o visceral. Se disponen organizadas en láminas o fascículos de modo que, si una recibe estímulo contráctil, la señal se propaga hacia las demás mediante uniones en hendidura, estas uniones permiten el paso de los iones y la propagación de los potenciales de acción de una fibra a otra libremente, provocando una contracción como unidad (17).

II.2.1 Mecanismo contráctil.

A comparación del músculo esquelético, el músculo liso carece del complejo de troponina, en su lugar se sitúan filamentos de actina, este filamento tira de las fibras por ambos lados lo que permite un 80% de la contracción manteniéndose unidos a cuerpos densos que se activan mediante trifosfato de adenosina (ATP) y Ca^{2+} , los cuales se degradan en difosfato de adenosina (ADP) (17).

II.2.2 Contracción y relajación del músculo liso.

La contracción se encuentra regulada principalmente por las cadenas de actina y miosina y puede ser regulada por dos estímulos, electro-mecánico y fármaco-mecánico; el primero puede ser activado por un cambio en el potencial de la membrana, lo cual estimula canales iónicos operados por voltaje lo que conduce a la contracción tónica. El segundo estímulo inicia con la unión de un agonista, hormona, mediador inflamatorio, etc. a su receptor específico sobre la membrana celular del músculo liso, como por ejemplo la oxitocina, lo que induciría contracciones fásicas. Los mecanismos intracelulares de ambos estímulos son dependientes de Ca^{2+} , principalmente al activar las señalizaciones de segundos mensajeros y proteínas contráctiles. En este sentido, la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula tiende a unirse a la calmodulina, formando un complejo Ca^{2+} -calmodulina, cuya función principal es activar

la cadena ligera de la miosina (MLC). MLC Dicha cadena inicia el cambio de sus filamentos, los dependientes de Ca^{2+} , esto induce una respuesta intracelular que consiste en el aumento de Ca^{2+} intracelular, el Ca^{2+} entra a la célula por los canales de Ca^{2+} operados por receptor y el resto proviene del retículo sarcoplásmico (RSP). Al existir tal aumento del Ca^{2+} intracelular, este se combina con la proteína calmodulina, formando el complejo calcio-calmodulina, el cual activa la cinasa MLC para fosforilarla manteniéndose así gracias a la proteína Rho-A. Cuando el Ca^{2+} extracelular se une al receptor tipo proteína G, se estimula la fosfolipasa C (PLC), formando fosfatidilinositol 4,5 bifosfato el cual forma 2 segundos mensajeros: trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 se une a los receptores del RSP, incrementando así el Ca^{2+} intracelular. El DAG activa la cinasa de proteína C (PKC) y fosforila a las proteínas transmembrana tipo L- Ca^{2+} , los cuales son operados por el voltaje (17,18). Figura 1.

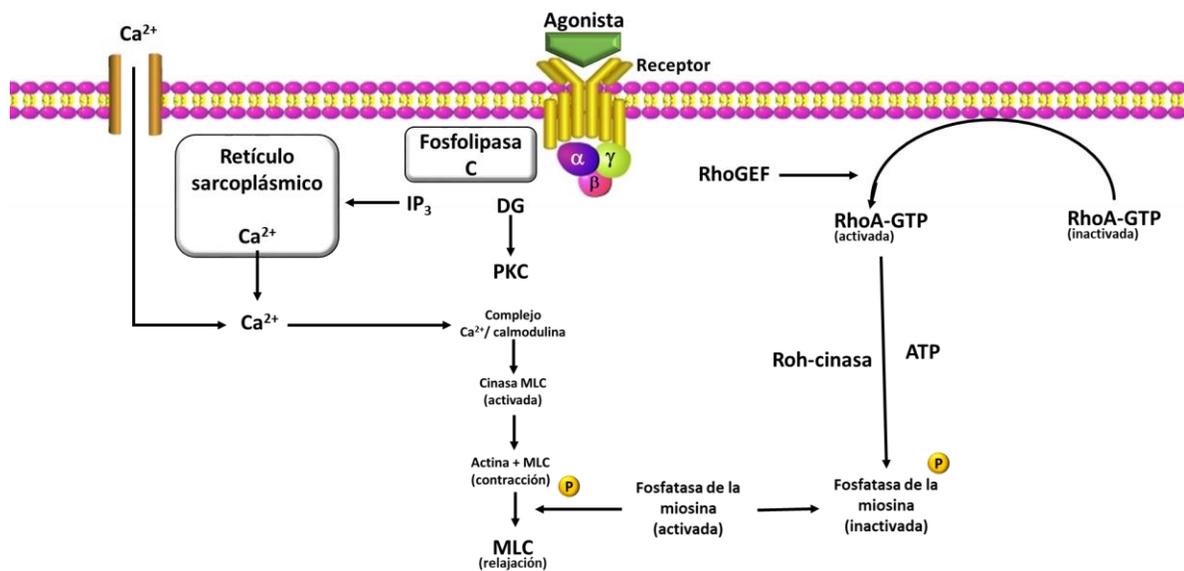


Figura 1. Regulación de la contracción del músculo liso.

Un agonista (hormona, fármaco, etc.) se une al receptor específico para iniciar la contracción. Después de unirse al receptor, la célula responde aumentando la actividad de la PLC mediante el acoplamiento a través de la proteína G, esta fosfolipasa produce dos segundos mensajeros a partir del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, el DAG e IP_3 , este último se une a los receptores de RSP el cual libera Ca^{2+} lo que provoca la liberación del activador de Ca^{2+} que activa a PKC y fosforila proteínas diana específicas. La PKC regula la fosforilación de los canales de

Ca^{2+} u otras proteínas que regulan el ciclo del puente de cruzado. El activador del Ca^{2+} se une a la calmodulina activando la cinasa de la MLC, esta cinasa fosforila la MLC y junto a la actina hace un puente cruzado y el músculo se contrae. La contracción se mantiene mediante un mecanismo de sensibilización al Ca^{2+} provocado por la inhibición de la actividad de la fosfatasa de la miosina por la Rho cinasa, este mecanismo inicia al tiempo que la PLC se activa y activa a la proteína de unión a GTP y RhoA. La proteína RhoA se activa por el receptor acoplado a proteína G e involucra un intercambio de nucleótidos de guanina RhoGEF, esta proteína aumenta la actividad de la cinasa Rho lo que inhibe a la fosfatasa de la miosina promoviendo así la contracción ya que la MLC no puede desfosforilarse.

Para revertir este proceso, la relajación muscular depende de la disminución de Ca^{2+} y el aumento de la fosfatasa de la MLC, para esto, la Rho cinasa bloquea la unión de la MLC con la miosina de manera competitiva con el sitio de unión ATP a través de factores de intercambio de nucleótidos de guanina (RhoGEF), se elimina así el Ca^{2+} intracelular, una parte se reabsorbe por el RSP dependiente del hidrólisis de ATP. La membrana proporciona un mecanismo adicional, en el que la enzima de la calmodulina se le une y provoca la estimulación de la bomba $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ que difunde el Ca^{2+} hacia el exterior de la célula (17–21). Figura 2.

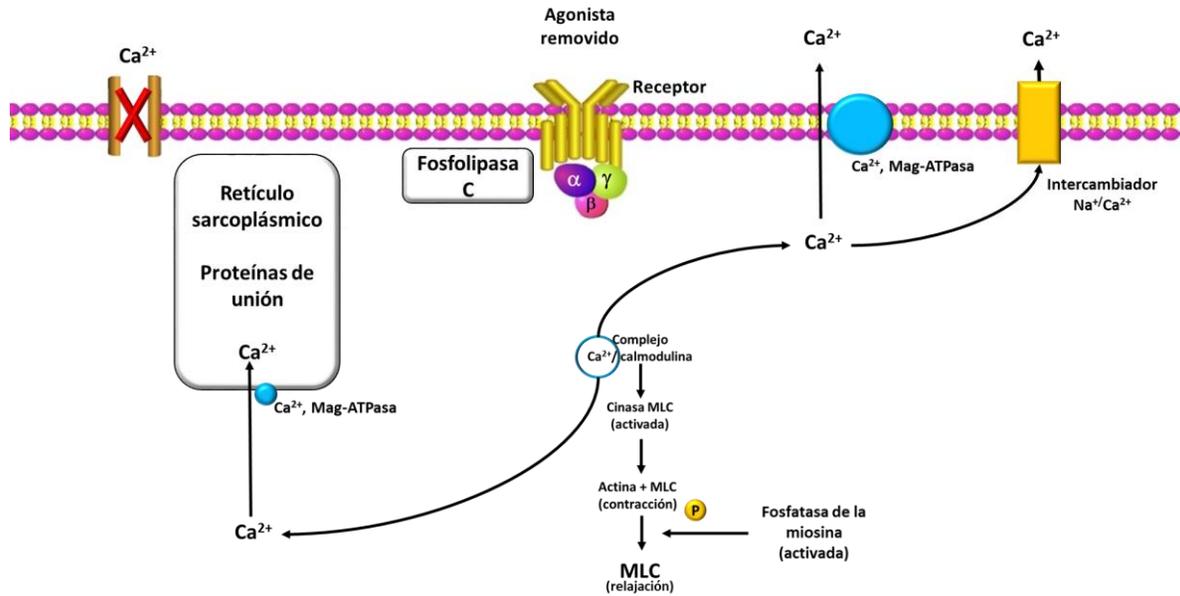


Figura 2. Relajación del músculo liso.

La relajación se produce tras la eliminación del estímulo contráctil o por acción directa de una sustancia que inhibe la contracción, de manera general, la relajación requiere una disminución de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y del aumento de la actividad de la fosfatasa de la MLC. El RSP y la membrana contienen Ca^{2+} , Mg ATPasas que eliminan el Ca^{2+} del espacio intracelular. Los intercambiadores $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$, localizados en la membrana ayudan también a disminuir el Ca^{2+} intracelular. Durante la relajación los canales de Ca^{2+} operados por receptor y por voltaje, localizados en la membrana, se cierran, esto reduce la entrada de Ca^{2+} a la célula.

II.2.3 Control hormonal.

La oxitocina es una hormona, neuropéptido sintetizado en los núcleos supra ópticos y paraventriculares del hipotálamo y, durante el embarazo, en el decidua, placenta, cuerpo lúteo y amnios (3). Cuando la oxitocina se une al receptor de oxitocina el cual es una rodopsina tipo 1 de la familia de las proteínas G ($G_{\alpha q/11}$), se acopla a la fosfolipasa β - C (PLC- β), la cual controla la hidrólisis del fosfatidilinositol di fosfato en fosfatidil inositol trifosfato y diacilglicerol, permitiendo la movilización de Ca^{2+} del RSP, tanto la contracción como la relajación activan el adenilato y guanilato ciclasa, formando monofosfato cíclico de adenosina. El monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) y el monofosfato cíclico de

guanosina (GMPc) activan las proteínas dependientes de GMPc y AMPc, los cuales fosforilan enzimas que inhiben la contracción, activando la bomba de Ca^+ para moverlo del retículo sarcoplásmico y fuera de la célula. Así disminuye el Ca^{2+} intracelular y el músculo se relaja (17, 3).

II.3 Diagnóstico del parto prematuro.

El diagnóstico del PP se establece cuando se presentan contracciones regulares y efectivas, es decir que duren 30 segundos y que se presenten al menos 3 en 30 min acompañados de cambios cervicales como la longitud del cuello de 1 cm y dilatación de 1 a 3cm, prueba de fibronectina positiva o bien, rotura de membranas (6,10,22); la Guía de práctica Clínica Mexicana establece el diagnóstico ante la presencia de 2 contracciones uterinas en 10 min o 4 en 40 min y 8 en 60 min, acompañado de dilatación cervical igual o mayor a 3 cm, borramiento del 50% y confirmarlo mediante especuloscopia y observación de fibronectina en muestra cervical, corroborar los datos obtenidos mediante el tacto y verificar la presencia de sangrado (7). Teniendo estos datos se decide la mejor opción para el binomio, ya sea la administración de fármacos útero relajantes o la interrupción del embarazo.

II.3.1 Tratamiento actual.

La tocólisis es la administración de fármacos para prevenir el parto, se subdivide en tocólisis primaria que consiste en la administración en bolo del fármaco elegido con el objetivo de frenar el trabajo de parto y la tocólisis de mantenimiento, consiste en la administración del resto del tratamiento único o en combinación con otros útero relajantes posterior al arresto exitoso del parto prematuro (23). Todo fármaco útero relajante debe ser seguro tanto para la madre como para el producto y, adicionalmente debe disminuir la morbi mortalidad del neonato.

La tocólisis se centra en inhibir las contracciones uterinas, al menos durante 48 h, esto permite la administración de corticoesteroides, cuya función es promover la maduración pulmonar del producto y provee el tiempo justo para la referencia de la madre a un hospital que cuente con Unidad de Cuidados Intensivos neonatales (3,24–26). La intervención se indica sólo cuando la edad gestacional nos provea un producto viable ya que hacerlo antes no asegura la supervivencia de este, aumenta el riesgo de complicaciones postnatales y

malformaciones fetales. Dicha intervención farmacológica se contraindica cuando el riesgo de complicaciones materno-fetales aumente o bien, se ponga en riesgo la vida de la madre (ej. Preeclampsia, eclampsia, óbito etc.)(6).

Los fármacos más comunes a utilizar son sulfato de magnesio, como neuroprotección, bloqueadores de canales de calcio (nifedipino), antagonista de oxitocina (atosiban), inhibidores de la síntesis de prostaglandinas (indometacina) y antagonistas beta-adrenérgicos (ritodrina). se ha comprobado que el fármaco de elección en gestas de menos de 32 semanas es la indometacina (3) y terapia antibiótica en caso de ruptura de membranas por el riesgo existente de corioamnionitis (27), en comparación con la Guía de Práctica clínica, se sugiere la administración de Sulfato de magnesio como neuroprotección, como inhibidor de contracciones Atosiban de la siguiente manera:

- Primera fase: intravenoso de 6.75 mg/0.9 mL en bolo.
- Segunda fase: 75 mg/10 ml + 90 cc de solución de NaCl 0.9% en infusión de 24 ml por hora, durante 3 h.
- Tercera fase: de 75 mg/10 ml + 90 cc de solución de NaCl 0.9% en infusión de 8 mL por hora durante 45 h.

En caso de que la gesta sea menor a 32 semanas se indica indometacina por vía oral, con dosis inicial de 50 mg, seguida de 25 a 50 mg cada 6 h durante 48 h o vía rectal en supositorios de 100 mg cada 12 h 4 dosis; como madurador pulmonar betametasona intramuscular 12 mg cada 24 h, 2 dosis o Dexametasona 6 mg intramuscular cada 12 h, 4 dosis y como media profiláctica, antibioterapia (7).

II.4 Carvacrol

II.4.1 Naturaleza y estructura química

El carvacrol es uno de los aceites esenciales presentes en el orégano (*Origanum vulgare*), hierba de la especie Mediterránea, de la familia Lamiaceae; el carvacrol, junto con otros aceites esenciales como timol, linalol y p-cimeno, fenoles como flavonoides y ácidos fenólicos, triterpenoides y esteroides forman parte del *O. vulgare* (28,29)

La estructura química del carvacrol se caracteriza por la presencia de un grupo hidroxilo (-OH) sobre el anillo de benceno (30). Figura 3.

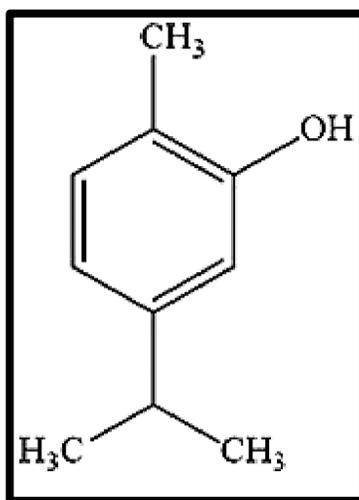


Figura 3. Estructura química del carvacrol.

2-metil-5(1-metiletil)-fenol ($C_{10}H_{14}O$). Fenol monoterpénico (31).

II.4.2 Mecanismo de acción

Suprime la vía de la ciclooxygenasa isoforma 2 (COX-2) disminuyendo la producción de prostaglandinas E2 (32). Es insoluble en agua, soluble en etanol y éter. Tras la administración oral del carvacrol (en roedores) se absorbe el 45% en estómago y duodeno, el resto es degradado por la biota normal, alcanzando el pico máximo en plasma a las 1.39 h, se excreta en heces y en orina 24 h después de su administración (28).

II.4.3 Toxicidad.

La toxicidad reportada en ratas como dosis letal 50 (LD_{50}) es de $810 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, ratones LD_{50} $73 - 80 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ perros $310 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ y conejos $2700 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ (30).

II.5 Úteroinhibidores

II.5.1 Indometacina

Analgésico antiinflamatorio no esteroideo derivado del ácido indolacético, usado comúnmente como antipirético, analgésico y antiinflamatorio (33).

II.5.2 Estructura química

Descrita en 1982 por el Doctor Carl Stevenson. Cuyo nombre sistemático es: 1 p-clorobenzoil-5 metoxi-2 metilindol-3 ácido acético (33). Figura 4.

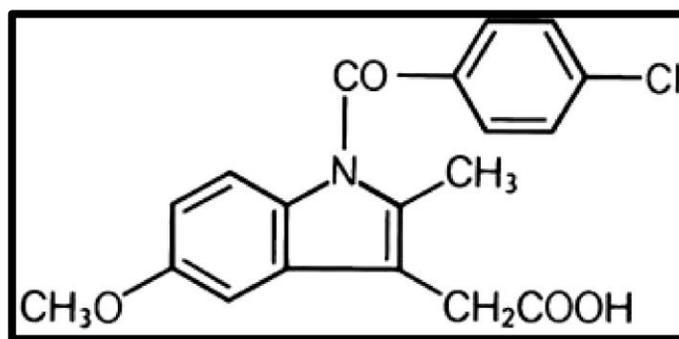


Figura 4. Estructura química de la indometacina.

1 p-clorobenzoil-5 metoxi-2metilindol-3 ácido acético (33).

II.5.3 Farmacocinética.

Tras su administración por vía oral y absorción gastrointestinal, tiene una biodisponibilidad del 100%, lo que nos indica que no está sujeta al metabolismo del primer paso; alcanza un pico máximo de concentración en plasma (T_{max}) entre 0.9 ± 0.4 h.

La absorción se ve afectada si se ingiere con alimentos altos en proteínas, carbohidratos, grasas y antiácidos a base de hidróxido de magnesio, pero su biodisponibilidad no se ve afectada significativamente. La distribución se efectúa en un 90% unida a proteínas plasmáticas.

Su metabolismo se lleva a cabo en el hígado, mediante conjugación de ácido glucurónico y su excreción se lleva a cabo en la orina, la bilis y las heces, y varía de las 2-11 h ya que su

eliminación es bifásica. (33) y en el útero es metabolizada por el CYP2C9 y la carboxilesterasa (34).

II.5.4 Farmacodinamia

El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la COX de manera reversible, tiene una constante de disociación (pK_a) de 3 a 4.5, es decir se concentra donde el medio es más ácido. (33), al inhibir la COX-2 bloquea la síntesis de prostaglandinas mediante el bloqueo de la conversión del ácido araquidónico, producido en el útero, en prostaglandinas, bloqueando la respuesta inflamatoria (34,35).

II.5.5 Toxicidad

La toxicidad de la indometacina, es como en la mayoría de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), en el tracto gastrointestinal, presentando una incidencia de un 3 a un 9% de dolor epigástrico, constipación, diarrea, úlcera gástrica, esofágica y/o duodenal. Los cuales disminuyen con la ingesta de alimentos. Este daño, se debe a que la indometacina se acumula en las células gástricas parietales. (33).

II.6 Antecedentes del problema

II.6.1 Propiedades del Carvacrol

El orégano se ha usado como remedio tradicional desde hace ya mucho tiempo, su principal aplicación ha sido como expectorante, actualmente se usa como antimicrobiano por sus propiedades y como antioxidante en la industria alimentaria y cosmética. Muchas de las propiedades del carvacrol, uno de los aceites esenciales del orégano, han sido descubiertas recientemente, entre ellas la aplicación como antiviral, antiinflamatorio, antiespasmódico, antiproliferativo y neuroprotector, siendo la aplicación antimicrobiana la más estudiada ya que suprime crecimiento bacteriano en cultivos en un diámetro de 16 a 19 mm, tanto como la gentamicina y la anfotericina B, funciona como antifúngico especialmente ante *A. niger*. (36). El mecanismo de acción estudiado como antimicrobiano consiste en desestabilizar la membrana bacteriana, disminuyendo su potencial y, por lo tanto, interrumpiendo sus funciones lipídicas en el citoplasma, conduciendo así a la apoptosis (31).

II.6.2 Efecto espasmolítico.

El efecto antiinflamatorio y espasmolítico del carvacrol fue descrito en 1986 por Wagner, quien propuso que el mecanismo de acción era mediado por la inhibición de la vía de la COX-2 disminuyendo la producción de prostaglandinas E2; en su estudio demostró que tenía un efecto del 94% en comparación con eugenol 87% y urshiol 100% (32). Estudios posteriores demuestran la efectividad del carvacrol similar a la de la indometacina y el NS-398 (37). En músculo liso, específicamente en íleo de rata Wistar, se ha probado también induciendo contracciones con KCl, demostrando inhibición del 100% tanto en amplitud como en frecuencia (38).

II.6.3 Útero-inhibidores.

II.6.3.1 Indometacina.

Este AINE se indica para el tratamiento de enfermedades como la osteoartritis, procesos inflamatorios agudos y como analgésico en el post operatorio de cirugías de traumatología y ortopedia (3,39).

II.6.3.1.1 Indicaciones terapéuticas de la indometacina.

La tocólisis tiene como objetivo prolongar el parto hasta 48 h para la administración de corticoesteroides y poder transferir a la paciente a un nivel apropiado para su atención; la indometacina específicamente, puede prolongar el embarazo hasta 7 días (3,26)

La administración durante la gestación es categorizada por la “Food and Drug Administration” (FDA) en categoría de riesgo B durante el primer trimestre del embarazo (no se han descrito riesgos en humanos y se acepta su uso durante el embarazo) y categoría D en el tercer trimestre (existen indicios de riesgo fetal; puede usarse sólo en casos de no existencia de alternativas) (40).

Como útero relajante, inhibe la síntesis de prostaglandinas ya que estas inducen la contracción uterina mediante la optimización de las conexiones que incrementan la entrada de calcio y por lo tanto aumentando la concentración intracelular de calcio (25). Presenta un

excelente efecto hasta antes de las 32 semanas de gestación, ya que su uso previo a esta edad gestacional se relaciona al cierre prematuro del conducto arterioso; Su uso se ve limitado a 48 h, ya que si se prolonga el uso puede causar oligohidramnios, enterocolitis necrotizante, leucomalacia periventricular (3,41)

El metanálisis de Haas en 2012, recomienda a la indometacina como el mejor fármaco útero-inhibidor ya que se ha comprobado que puede llevar a término (37 semanas de gestación) el embarazo.(3,22).

III. JUSTIFICACIÓN

Se conoce de la administración de la infusión a base de orégano (*Origanum vulgare*), cuyo principal compuesto es el Carvacrol, durante el trabajo de parto con la finalidad de acelerarlo y reducir el tiempo de estancia intrahospitalaria. Se ha visto que, tras ingerir dicho brebaje, el trabajo de parto se complica. Al nacer un producto que no ha llegado a término se enfrenta a complicaciones post natales, tales como ceguera, fallo neurológico consecuencia de la hipoxia neonatal, entre otros, con secuelas que impedirán el pleno desarrollo del infante además del elevado costo del internamiento en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales y el desgaste físico y emocional para los padres y/o cuidadores. Actualmente los medicamentos de primera línea presentan efectividad con poca seguridad de uso puesto que sus efectos adversos suelen representar importante riesgo para el binomio, es por eso que se buscan nuevas alternativas terapéuticas, desarrollando medicamentos útero relajantes que sean efectivos y, a la par, produzcan efectos adversos menores o nulos.

La investigación presente describe el efecto útero relajante del carvacrol el cual inhibe la contracción al igual que la indometacina y se compara dicho efecto mostrando equiefectividad y equipotencialidad; es probable que el carvacrol y la indometacina compartan algún mecanismo de acción al inhibir la contracción uterina, esto permite abrir un nuevo camino hacia investigaciones futuras que busquen realizar combinaciones de fármacos útero-inhibidores, esto aunado a los usos conocidos del carvacrol propone un fármaco ideal para el arresto del parto prematuro.

IV. HIPÓTESIS

Si el carvacrol y la indometacina inhiben las contracciones uterinas de rata gestante, entonces el carvacrol presentará actividad útero relajante y posiblemente mecanismos de acción similares al de la indometacina.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Determinar el efecto útero relajante del carvacrol e indometacina, así como su posible mecanismo de acción en útero aislado de rata gestante.

V.2 Objetivos específicos

- I.* Estudiar el efecto útero relajante del carvacrol en contracciones espontáneas de útero gestante aislado de rata.
- II.* Evaluar el efecto útero relajante del carvacrol e indometacina de sobre las contracciones tónicas uterinas inducidas con KCl para determinar los parámetros farmacológicos CI_{50} y R_{max} .
- III.* Estudiar el efecto útero relajante del carvacrol e indometacina sobre las contracciones fásicas inducidas con oxitocina para determinar los parámetros farmacológicos CI_{50} y R_{max} .
- IV.* Determinar el posible mecanismo de acción del carvacrol e indometacina al combinarlos con bloqueadores de canales de K^+ dependientes de voltaje, bloqueadores de canales de K^+ dependientes de ATP, bloqueadores de canales de Ca^{2+} , bloqueadores de receptores histaminérgicos H_2 , bloqueadores β -adrenérgicos y bloqueadores de la síntesis de óxido nítrico.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

V.3 Contexto de la investigación.

El estudio presente se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biología de la Reproducción, ubicado el Área Académica de Medicina Dr. Eliseo Ramírez Ulloa de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto Hidalgo. La parte experimental se llevó a cabo de enero de 2019 a febrero de 2020 a la par, la interpretación de resultados y compilación de estos, luego, de marzo a julio se realizaron los análisis estadísticos, revisión, discusión de resultados, escritura de tesis y redacción del artículo.

V.4 Tipo de estudio

La investigación presente fue biomédica básica, de corte experimental y de alcance analítico.

V.5 Criterios de inclusión

- ✓ Ratas hembra preñadas de la línea albina Wistar.
- ✓ Edad gestacional de 16 a 19 días de gestación.
- ✓ Peso de 200 a 250 g.
- ✓ Buen estado de salud.

V.6 Criterios de exclusión

- Reporte de enfermedad o infección de la rata.

V.7 Animales de experimentación

Se usaron 90 ratas hembra gestantes de la línea Wistar, cuya edad gestacional oscilaba de entre los 16 y 19 días de gestación, contados a partir del día en que presentaron tapón espermático en introito vaginal. Las condiciones a las que se mantuvieron fue con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h, *ad libitum*, de acuerdo a las directrices establecidas en la NOM “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” NOM-062-ZOO-1999 y fueron sacrificadas por eutanasia en cámara de CO₂ seguido de dislocación cervical; así mismo las crías obtenidas de cada cuerno uterino fueron sacrificadas

de la misma manera, para su posterior disposición como Residuo Peligroso Biológico Infeccioso y su pertinente eliminación.

V.8 Fármacos

Se utilizaron los siguientes compuestos: indometacina 98%, carvacrol $\geq 98\%$, oxitocina 5 UI/ml, dimetil sulfónico $\geq 99.9\%$ (DMSO), nifedipino $\geq 98\%$, cimetidina, biguanida, metformina, clorhidrato de éster metílico de N(G)-nitro-L-arginina (L-NAME), propranolol, tetraetil amonio (TEA), 4-aminopiridina (4-AP), glibenclamida, glipizida y 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-uno (ODQ), todos ellos adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich^{MR}. Oxitocina ampollita de 5 UI/ml de venta al público en general.

V.9 Reactantes

Se utilizaron los siguientes reactantes: cloruro de sodio (NaCl), bicarbonato (NaHCO₃), cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl₂), y glucosa, los cuales se disolvieron en agua bidestilada.

V.10 Diagrama de diseño experimental

El diseño experimental de la presente investigación se detalla en la Figura 5.

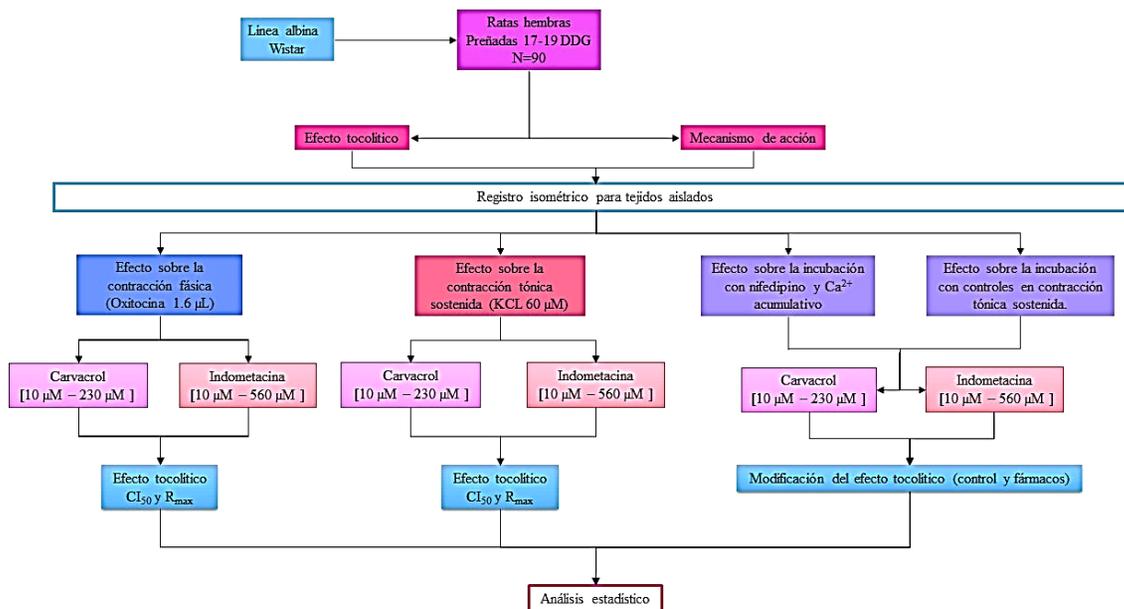


Figura 5. Diseño experimental.

V.11 Sistema de registro isométrico

V.11.1 Principio

Para evaluar el efecto útero relajante del carvacrol y la indometacina sobre la contracción tónica sostenida y fásica del tejido uterino aislado de rata se utilizó el sistema de registro isométrico para tejidos aislados, el cual permite registrar la actividad funcional de los tejidos, contracción o relajación y determinar el efecto de las sustancias que inducen o inhiben la contracción; con los datos obtenidos de las mediciones de los trazos se pueden cuantificar los parámetros farmacológicos concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) y respuesta máxima (R_{máx}) utilizando estímulos electromecánicos y farmacomecánicos (42).

V.11.2 Procedimiento

Las ratas fueron sacrificadas en cámara de O₂ con posterior dislocación cervical el día 16 - 19 de gestación, se realizó un corte horizontal de ángulo costal a ángulo costal y un corte en la línea media del abdomen con tijera real roma y pinzas de disección sin dientes. Se extrae el útero y se coloca en solución SRL para su disección y extracción de crías y anexos, se retira del útero la línea de cotiledones, adherencias placentarias y tejido graso para recolocarlos en Ringer normal limpio. De cada útero se obtienen 15 tiras de tejido uterino de 5mm × 10mm; en cada extremo de la tira se colocó hilo de seda 4-0 para anclar un extremo a la base de las cámaras y el otro extremo atarlo a un transductor de tensión FT03. El volumen de cada cámara fue de 3 mL, y la composición del Ringer Locke (SRL) utilizada fue (mM): NaCl 154, NaHCO₃ 5.95, KCl 5.63, CaCl₂ 1 y glucosa 0.277.

La temperatura se mantuvo a 37°C hasta finalizar el experimento. Los tejidos se mantuvieron inmersos en SRL, a una tensión de 1g y con borboteo constante de gas carbógeno al 95% O₂ y 5% de CO₂.

Para la estabilización de los tejidos, éstos fueron sometidos a un período de equilibrio (30 min) durante los cuales se lavaron con 3mL de SRL fresco cada 15 min, posteriormente se estimularon electro mecánicamente con una solución despolarizante de KCl (60 mM) para inducir la contracción tónica sostenida, para las contracciones fásicas inducidas de manera farmacomecánica se utilizó oxitocina (1.6 µL) en cada cámara con SRL y se incubó por un período de 24 min estabilizando a 1 g.

Las respuestas contráctiles se registraron haciendo uso de un polígrafo RPS-312 RM (Grass Telefactor, RI, EE. UU.) y los datos se digitalizaron en el programa Poly View 2.5, de acuerdo con técnica descrita por Ponce-Monter et al. (43,44) y Muñoz Pérez et al. (45,46).

La interpretación de los resultados se hizo mediante la obtención del área bajo la curva (ABC) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100\% - (ABC_r/ABC_i) \times 100 \quad (46)$$

Donde AUCr es el área bajo la curva medido en cm previo a la exposición al fármaco y con incubación de 8 min y AUCi es el área bajo la curva medido en centímetros posterior a la exposición al fármaco (46).

V.2.2.2 Evaluación del efecto útero relajante del carvacrol e indometacina en contracciones fásicas.

Tras la estabilización del tejido uterino estimulado fármaco mecánicamente con oxitocina (1.6 μ L) y su incubación por 15 min, se colocó carvacrol e indometacina a diferentes concentraciones (n = 6) para estudiar el efecto útero relajante y la interpretación de los resultados, obtener el porcentaje de inhibición mediante el cálculo del ABC.

V.2.2.3 Evaluación del efecto útero relajante del carvacrol e indometacina en contracciones tónicas.

Tras la estabilización del tejido uterino estimulado electro mecánicamente con KCl (60 μ M) y su incubación por 15 min, se colocó carvacrol e indometacina a diferentes concentraciones (n = 6) para estudiar el efecto útero relajante y la interpretación de los resultados, obtener el porcentaje de inhibición mediante el cálculo del ABC.

V.2.2.4 Evaluación del carvacrol e indometacina ante el fármaco bloqueador control (Nifedipino).

Tras la estabilización del tejido uterino estimulado electro mecánicamente con KCl (40 mM) sin Ca^{2+} y su incubación por 8min, se colocó Nifedipino, seguido del carvacrol (n=6) y la indometacina ambas a diferentes concentraciones (n = 6), para posteriormente realizar exposiciones a Ca^{2+} (5 exposiciones) para estudiar el posible mecanismo de acción de los 2 fármacos estudiados.

V.11.3 Estudio del mecanismo de acción del carvacrol e indometacina

Tras la estabilización del tejido uterino estimulado electro mecánicamente con KCl (6 0mM) y su incubación por 20 minutos, se colocaron los bloqueadores cimetidina, biguanida, metformina, L-NAME, propanolol, TEA, 4-AP, glibenclamida, glipizida y ODQ seguido de la concentración de carvacrol e indometacina y se incubó por 20 minutos más. Se observó la modificación del efecto y posteriormente se analizan e interpretan los resultados para obtener el porcentaje de inhibición mediante el cálculo del ABC.

V.12 Análisis estadístico

Los datos se procesaron por un análisis de varianza ANOVA, seguido de un post prueba Tukey y/o Dunnett, considerando valores estadísticamente significativos aquellos cuya $p \leq 0.05$ o $p \leq 0.0001$ y análisis de regresión lineal para obtener IC_{50} y $R_{m\acute{a}x}$. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0 aplicando pruebas ANOVA, regresión lineal, Tukey y Dunnett.

V.13 Aspectos éticos.

La investigación se realizó una vez aprobado el protocolo por el Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Anexo 1). Los animales recibieron trato humanitario de acuerdo con lo establecido en Norma Oficial Mexicana “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” NOM-062-ZOO-1999 (Anexo 2).

VII. RESULTADOS

VII.1 Efecto útero relajante del carvacrol en contracciones espontáneas.

Se evaluó el efecto útero relajante del carvacrol en contracciones espontáneas, para las cuales, el tejido se mantuvo en un medio de Ringer Locke, a 37°C y con flujo constante de gas carbógeno. La figura 6 muestra inhibición del 12.6% al 100% en las contracciones fásicas espontáneas tras la administración de carvacrol (10µM a 230µM) con una inhibición dependiente de la concentración. La figura 7 representa el trazo típico de la inhibición de la contracción uterina espontánea.

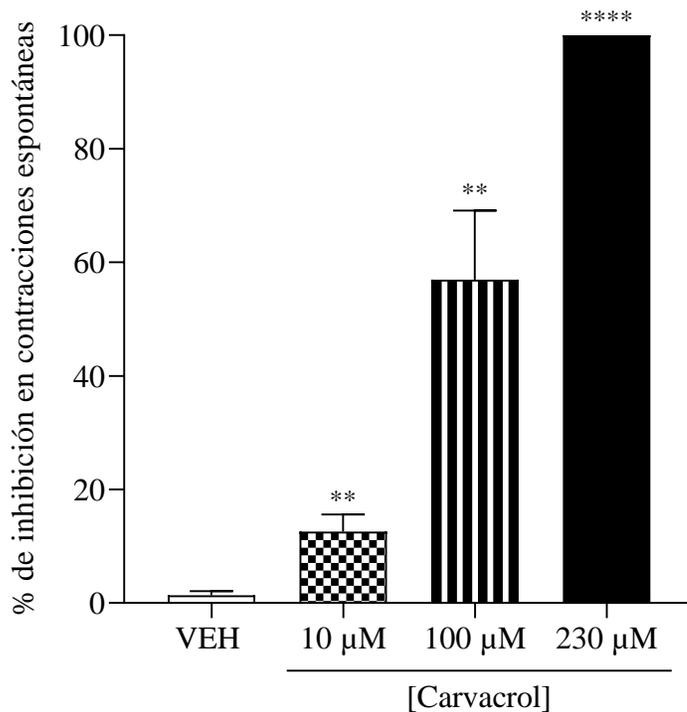


Figura 6. Efecto útero-relajante de carvacrol sobre contracciones espontáneas.

Cada punto representa el valor promedio de 6 experimentos (n=6) y las barras verticales indican el EEM, **** p= <0.0001, ** p= <0.05. Prueba ANOVA seguida de una prueba de comparación múltiple Dunnett.

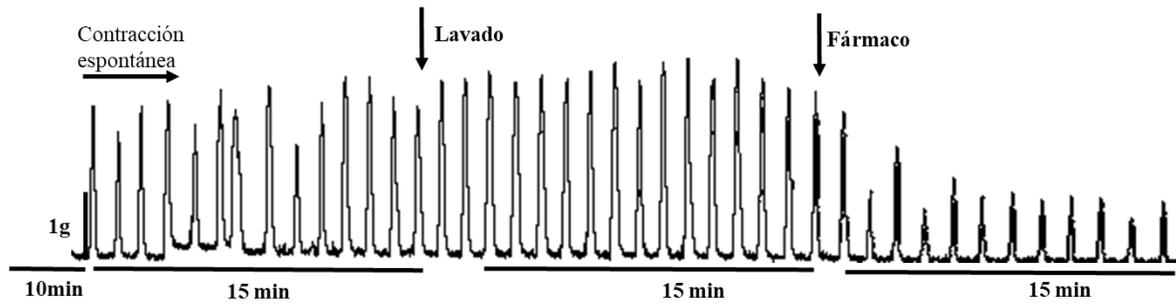


Figura 7. La contracción espontánea (sin estímulo).

La contracción espontánea del músculo liso fue inhibida por los fármacos carvedilol, indometacina y nifedipino.

VII.2 Efecto útero relajante del carvacrol e indometacina en contracciones tónicas inducidas con KCl 60 mM.

Los resultados del efecto relajante del carvacrol en contracciones tónicas inducidas con KCl se muestran en la figura 8, la inhibición de la contracción por carvacrol se dio en forma dependiente de concentración; El efecto útero-relajante de la indometacina sobre las contracciones tónicas inducidas con KCl se observa en la figura 9, la cual muestra inhibición de la contracción dependiente de concentración en contracciones tónicas inducidas con KCL. la figura 10 muestra la curva concentración-respuesta donde el carvacrol inhibe al 100% la contracción a la concentración de 230 μM , mientras que se determinó la $\text{IC}_{50}=64.62 \mu\text{M}$, $\text{LogIC}_{50}= 1.81 \mu\text{M}$, $R_{\text{máx}}=230 \mu\text{M}$, muestra también la curva concentración-respuesta del porcentaje de inhibición de la indometacina. Se determinaron los parámetros farmacológicos $\text{IC}_{50}=53.04 \mu\text{M}$, $\text{LogIC}_{50} = 1.72 \mu\text{M}$ y $R_{\text{máx}}= 420 \mu\text{M}$. El trazo típico de la inhibición de la contracción tónica inducida se observa en la figura 11.

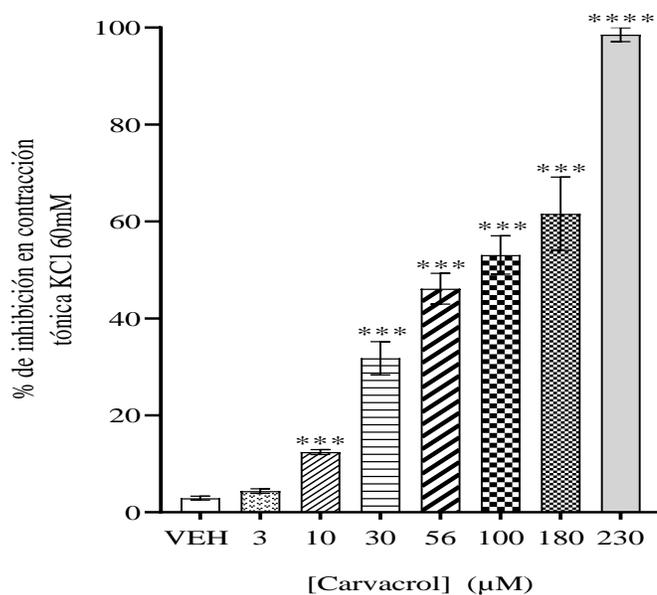


Figura 8. Efecto relajante del carvacrol sobre estímulo electromecánico de KCl 60 mM.

Cada columna representa el aumento de concentración de carvacrol en tiras aisladas de útero gestante de rata y el promedio de 6 experimentos ($n=6$) y las barras verticales el valor de la

EEM. **** $p < 0.0001$) y *** ($p < 0.05$). Prueba ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple Tukey.

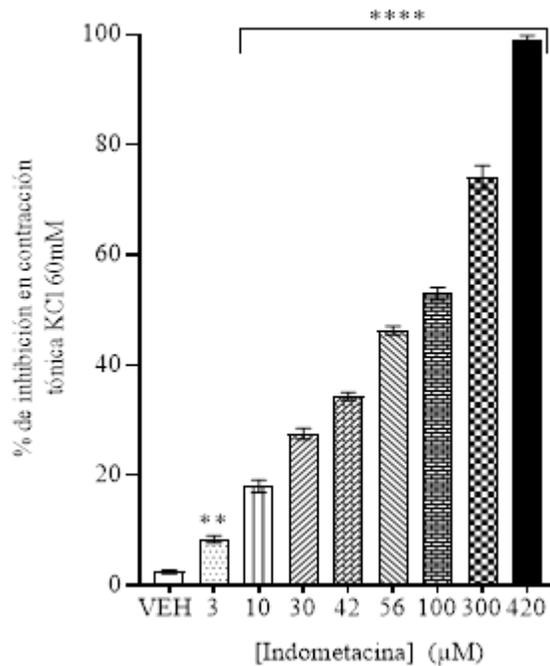


Figura 9. Efecto relajante de la indometacina sobre estímulo electromecánico de KCl 60 mM.

Cada columna representa el aumento de concentración de indometacina en tiras aisladas de útero gestante de rata y el promedio de 6 experimentos ($n = 6$) y las barras verticales el valor de la EEM. **** $p < 0.0001$) y ** ($p < 0.05$). Prueba ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple Dunnett.

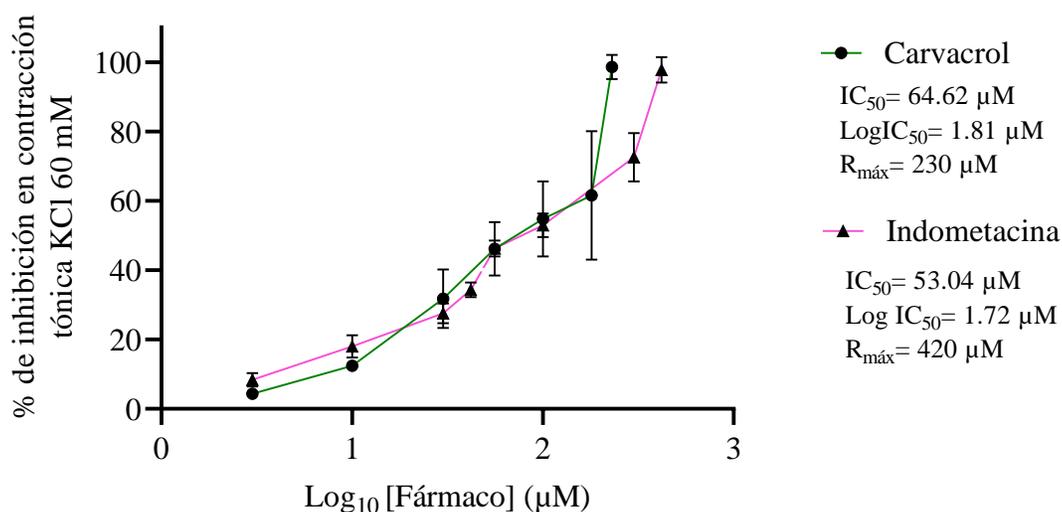


Figura 10. Curva concentración-respuesta del carvacrol e indometacina.

Efecto de diferentes concentraciones de carvacrol [3 μM, 10 μM, 30 μM, 56 μM, 100 μM, 180 μM, 230 μM] e indometacina [3 μM, 10 μM, 30 μM, 42 μM, 56 μM, 100 μM, 300 μM, 420 μM] sobre un estímulo electromecánico de KCl 60 mM. Cada punto representa el valor promedio de 6 experimentos (n=6) y las barras verticales representan el valor de la EEM. Datos obtenidos por medio de una prueba de regresión lineal.

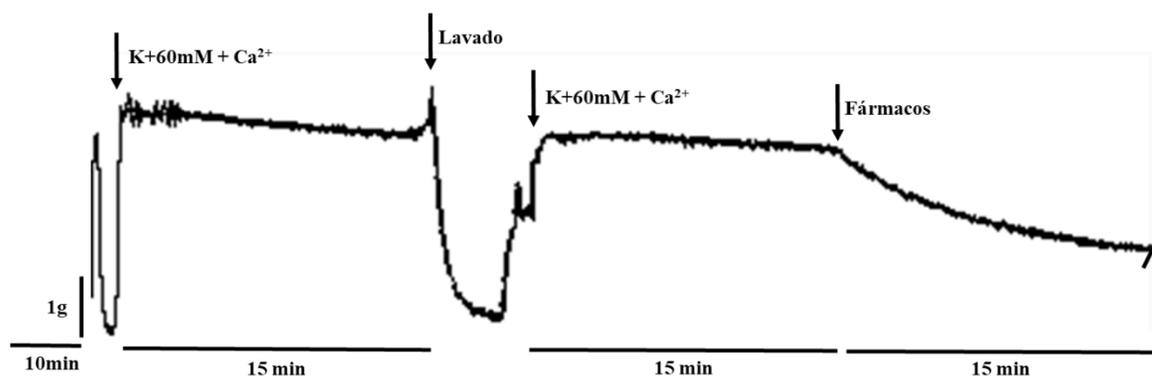


Figura 11. Trazo típico de la inhibición de la contracción tónica inducida por indometacina, nifedipino y carvacrol.

La contracción tónica fue inducida con KCl 60 mM e inhibida por los fármacos nifedipino, carvacrol e indometacina.

VII.3 Efecto útero relajante del carvacrol e indometacina en contracciones fásicas inducidas con oxitocina 1.6 μ L.

El efecto útero inhibidor del carvacrol e indometacina en contracciones fásicas inducidas fármaco mecánicamente se observa en la figura 12, el carvacrol presentó una inhibición dependiente de concentración en contracciones fásicas inducidas con oxitocina así como la indometacina mostró también una inhibición dependiente de concentración, como se muestra en la figura 13. La figura 14 muestra la curva concentración – respuesta de carvacrol e indometacina, para calcular los parámetros farmacológicos de carvacrol: $IC_{50}=66.55 \mu M$, $\text{Log } IC_{50}= 1.82 \mu M$ y $R_{\text{máx}}=100\%$. La indometacina mostró un efecto inhibidor de manera dependiente de concentración en contracciones fásicas la curva concentración - respuesta muestra los parámetros farmacológicos $IC_{50}= 55.47 \mu M$, $\text{Log}IC_{50}= 1.74 \mu M$ y $R_{\text{máx}}=100\%$. El trazo típico de la inhibición de la contracción fásica inducida se observa en la figura 15.

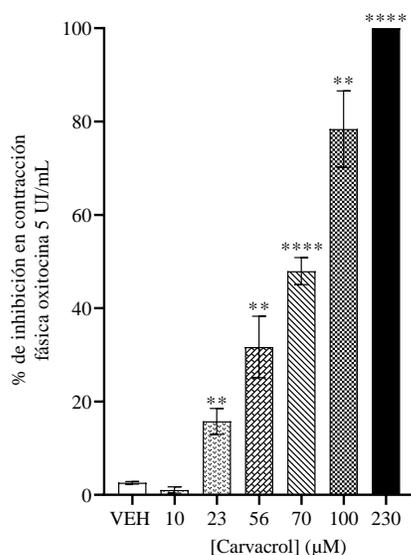


Figura 12. Efecto relajante del carvacrol sobre estímulo fármaco mecánico de oxitocina (5 UI/mL) 1.6 μ L.

Cada columna representa el aumento de concentración de carvacrol en tiras aisladas de útero gestante de rata y el promedio de 6 experimentos ($n=6$) y las barras verticales el valor de la EEM. **** $p<0.0001$ y ** $p<0.05$. Prueba ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple Dunnett.

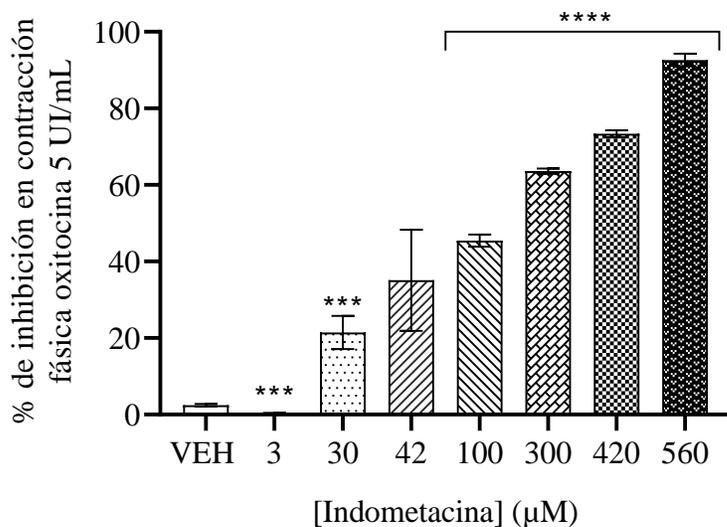


Figura 13. Efecto relajante de la indometacina sobre estímulo farmacomecánico con oxitocina (5 UI/mL) 1.6 μL.

Cada columna representa el aumento de concentración de indometacina en tiras aisladas de útero gestante de rata y el promedio de 6 experimentos (n=6) y las barras verticales el valor de la EEM. **** p<0.0001) y ** (p<0.05). Prueba ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple Dunnett.

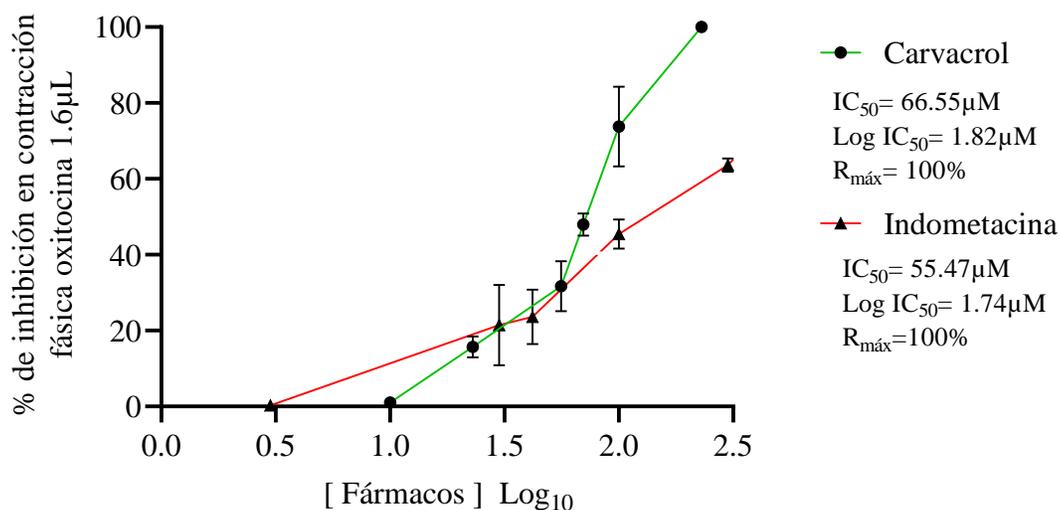


Figura 14. Curva concentración-respuesta del carvacrol e indometacina.

Efecto de diferentes concentraciones de carvacrol [10 µM, 23 µM, 56 µM, 70 µM, 100 µM, 230 µM] e indometacina [3 µM, 30 µM, 42 µM, 100 µM, 300 µM, 420 µM, 560 µM] sobre un estímulo fármaco mecánico con oxitocina (5 UI/mL) 1.6 µL. Cada punto representa el valor promedio de 6 experimentos (n= 6) y las barras verticales representan el EEM. Datos obtenidos por medio de una prueba de regresión lineal.

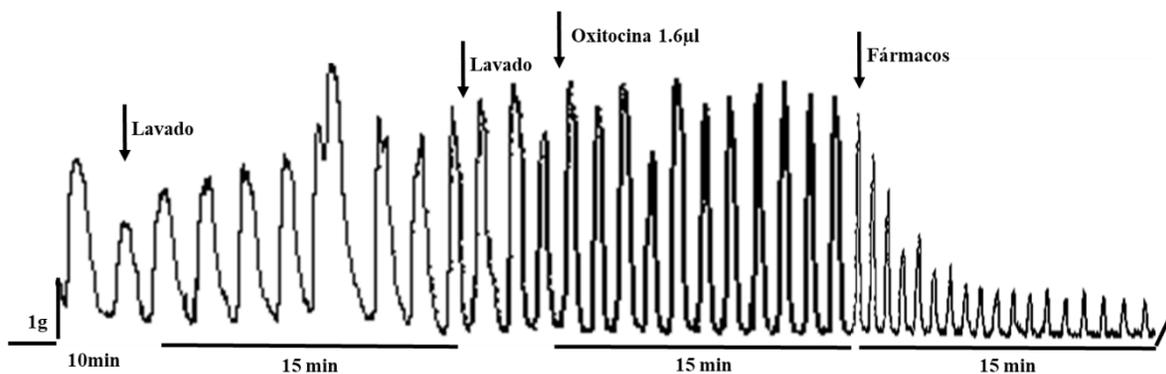


Figura 15. Trazo típico de la inhibición de la contracción fásica inducida.

La contracción fásica fue inducida con oxitocina (5 UI/mL) 1.6 µL e inhibida por los fármacos nifedipino, carvacrol e indometacina.

VII.4 Comparación de las curvas concentración - respuesta de la indometacina y el carvedilol con nifedipino en contracciones tónicas inducidas.

Se realizó la comparación de las curvas sigmoideas dependientes de concentración del efecto útero-relajante sobre contracciones tónicas inducidas con KCL de los fármacos carvedilol e indometacina y se compararon con el bloqueador de canales de Ca^{2+} . La curva sigmoidea de nifedipino se localiza completamente desplazada a la izquierda en el orden de $2.3 \cdot 10^{-8}$ M y alcanzó una inhibición del 95.5%, mientras que las curvas sigmoideas dependientes de concentración de carvedilol e indometacina se observan en la misma posición en el orden y mostraron una inhibición máxima del 100%, por lo tanto el carvedilol y la indometacina mostraron ser menos potentes y efectivos que el nifedipino y el carvedilol e indometacina presentan potencia similar y equiefectividad. Figura 16.

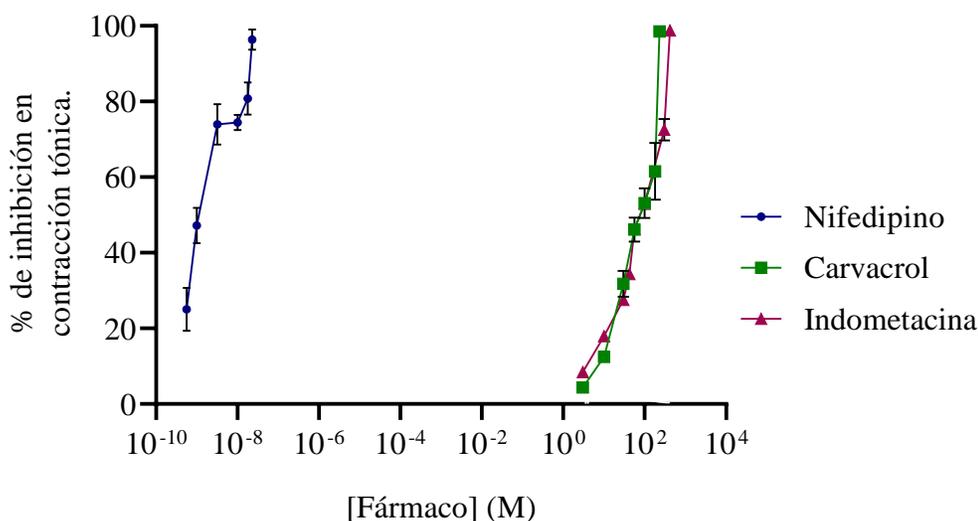


Figura 16. Curvas logarítmicas comparativas del efecto del carvedilol, indometacina y nifedipino (control) en contracciones tónicas inducidas con KCL 60 nM.

Datos obtenidos por medio de una prueba de regresión lineal. Se observa un total desplazamiento de la curva sigmoidea del nifedipino lo que indica mayor potencia y efectividad comparado con el carvedilol y la indometacina quienes comparados entre sí se localizan en la misma posición indicando potencia similar y equiefectividad entre el carvedilol y la indometacina. cada punto en la gráfica indica el promedio de cada concentración utilizada para indometacina, carvedilol y nifedipino; las barras verticales representan el EEM.

VII.5 Comparación de las curvas concentración respuesta de la indometacina y el carvacrol con nifedipino en contracciones fásicas inducidas.

Se realizó la comparación de las curvas sigmoideas dependientes de concentración del efecto útero-relajante sobre contracciones fásicas inducidas con oxitocina de los fármacos carvacrol e indometacina y se compararon con el bloqueador de canales de Ca^{2+} nifedipino. La curva sigmoidea de nifedipino se localiza completamente desplazada a la izquierda en el orden de $5.6 \cdot 10^{-10}$ M y alcanzó una inhibición del 95.5%, mientras que la curva sigmoidea dependiente de concentración de indometacina se observa en el orden de 3 μM con una inhibición del 93% y la de carvacrol en 10 μM con una inhibición del 100%, demostrando así que el fármaco más potente y efectivo es el nifedipino, seguido de la indometacina y siendo el carvacrol más efectivo que ésta. Figura 17.

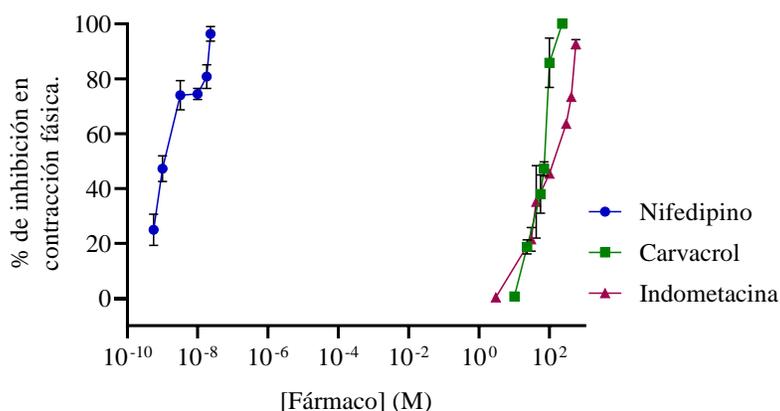


Figura 17. Curvas logarítmicas comparativas del efecto del carvacrol, indometacina y nifedipino (control) en contracciones fásicas inducidas con oxitocina 1.6 μL .

Datos obtenidos por medio de una prueba de regresión lineal. Se observa un total desplazamiento de la curva sigmoidea del nifedipino lo que indica mayor potencia y efectividad comparado con el carvacrol y la indometacina seguido en potencia por la indometacina y en efectividad por el carvacrol. Cada punto en la gráfica indica el promedio de cada concentración utilizada para indometacina, carvacrol y nifedipino; las barras verticales representan el error estándar de la media (EEM).

VII.6 Comparación de las curvas concentración respuesta de la indometacina y el carvacrol con nifedipino en contracciones fásicas inducidas con KCl sin Ca²⁺.

La comparación realizada de las curvas sigmoideas dependientes de concentración del efecto útero-relajante sobre contracciones tónicas inducidas con KCl sin Ca²⁺ de los fármacos carvacrol e indometacina y se compararon con el bloqueador de canales de Ca²⁺ nifedipino. La curva sigmoidea de nifedipino se localiza completamente desplazada a la izquierda en el orden de 5.6⁻¹⁰ M y alcanzó una inhibición del 95.5%, siendo éste el más potente y efectivo, mientras que la curva sigmoidea dependiente de concentración de indometacina se observa en el orden de 3 µM con una inhibición del 93% y la de carvacrol en 10 µM con una inhibición del 100%, demostrando que la indometacina es más potente que el carvacrol y éste más efectivo que la indometacina como se muestra en la figura 18. El trazo típico de la inhibición de contracción tónica inducida con KCl sin Ca²⁺ se observa en la figura 19.

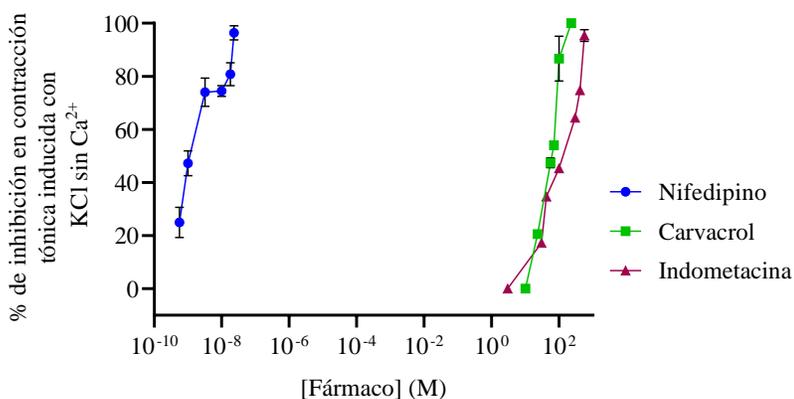


Figura 18. Curvas logarítmicas comparativas del efecto del carvacrol, indometacina y nifedipino (control) en contracciones tónicas inducidas con KCL 60 nM sin Ca²⁺.

Datos obtenidos por medio de una prueba de regresión lineal. Se observa un total desplazamiento de la curva sigmoidea del nifedipino lo que indica mayor potencia y efectividad comparado con el carvacrol y la indometacina, seguido en potencia por la indometacina y en efectividad por el carvacrol. Cada punto en la gráfica indica el promedio de cada concentración utilizada para indometacina, carvacrol y nifedipino; las barras verticales representan el error estándar de la media (EEM).

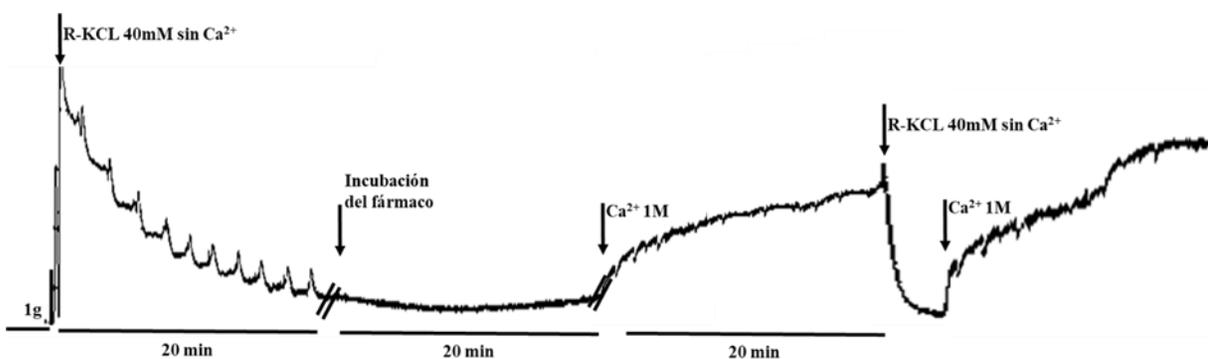


Figura 19. Trazo típico de la inhibición de la contracción tónica inducida con KCl sin Ca²⁺.

La contracción tónica fue inducida con KCl 40 mM sin Ca²⁺ e inhibida por los fármacos nifedipino, carvacrol e indometacina.

La comparación de los parámetros farmacológicos IC₅₀ Y R_{máx} entre el control positivo nifedipino y carvacrol e indometacina se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. IC₅₀ y R_{máx} de carvacrol, indometacina y nifedipino.

Contracción	Fásicas inducidas con Oxitocina		Tónicas inducidas con KCl		Tónicas inducidas con KCl sin Ca ²⁺	
	IC ₅₀ (μM)	R _{máx} (%)	IC ₅₀ (μM)	R _{máx} (%)	IC ₅₀ (μM)	R _{máx} (%)
Carvacrol	66.5 ± 12.37 *	100 ± 0.0	64.62 ± 12.04 *	94.16 ± 3.8	65.36 ± 15.52 *	100 ± 0.0
Indometacina	55.47 ± 15.09 *	92.66 ± 1.7	53.04 ± 10.43 *	89.35 ± 6	55.89 ± 10.59 *	95.37 ± 6.9
Nifedipino	0.01157 ± 0.001085	100 ± 0.0	0.01133 ± 0.001070	96.39 ± 4.7	0.01165 ± 0.001051	100 ± 0.0

Los resultados expresan la media y el EEM de los compuestos. Las diferencias estadísticas de la IC₅₀ de carvacrol e indometacina fueron significativas en comparación con la IC₅₀ del control positivo, nifedipino. EEM: error estándar de la media; IC₅₀: concentración inhibitoria 50; R_{máx}: respuesta máxima, * diferente nifedipino vs compuestos; *p*<0.0001.

VII.7 Estudio del mecanismo de acción del carvacrol.

Se evaluó la combinación de carvacrol con los diferentes bloqueadores analizándolos mediante un ANOVA de una vía, para sugerir el posible mecanismo de acción. La figura 20 muestra que las combinaciones de carvacrol con los bloqueadores cimetidina, biguanida, metformina, L-NAME, propranolol, TEA, 4-AP, glibenclamida, glipizida y ODQ los cuales fueron comparados con el vehículo para observar la modificación del efecto del carvacrol.

Los bloqueadores en los que se observó una modificación significativa, inhibiendo más la contracción comparado con el porcentaje de inhibición del carvacrol, fueron biguanida ($\bar{X}=78.8$, $DE\pm 3.52$), TEA ($\bar{X}=74.28$, $DE\pm 1.78$) y 4-AP ($\bar{X}=70.72$, $DE\pm 2.27$) lo que propone un efecto sinérgico con el carvacrol. Ninguno de los bloqueadores inhibe más la contracción de manera estadísticamente significativa comparado con el porcentaje de inhibición del carvacrol.

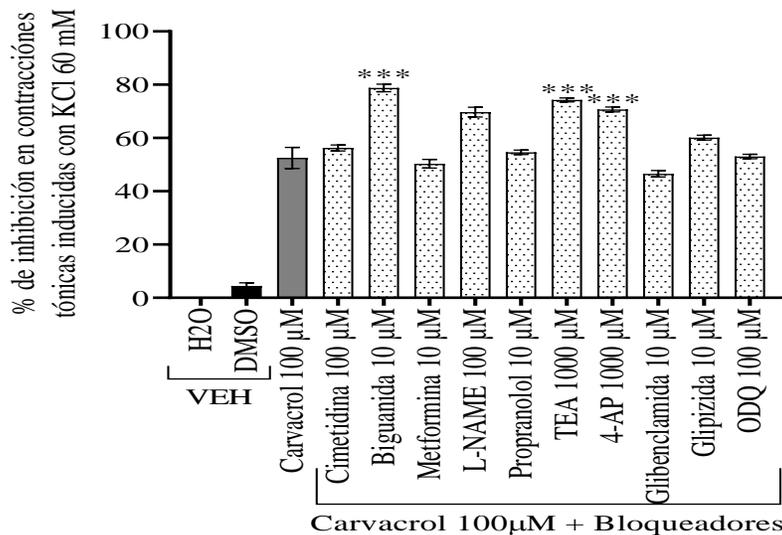


Figura 20. Efecto de los diferentes bloqueadores sobre el efecto relajante del carvacrol.

Se muestran los vehículos utilizados (VEH), el efecto individual del carvacrol y los bloqueadores cimetidina, biguanida, fenformina, L-NAME, propranolol, TEA, 4-P, glibenclamida, glipizida y ODQ. **** $p < 0.05$, $n=6$, datos obtenidos mediante un análisis de varianza ANOVA, seguido de una prueba de comparación múltiple Dunnett, las líneas verticales indican el EEM.

VII.8 Estudio del mecanismo de acción de la indometacina.

Para conocer otros posibles mecanismos de la indometacina en las contracciones electromecánicas, se evaluó la combinación de indometacina con bloqueadores diferentes y específicos. La figura 23 muestra que las combinaciones de indometacina con los compuestos cimetidina, biguanida, fenformina, L-NAME, propranolol, TEA, 4-AP, glibenclamida y glipizida.

Los bloqueadores que presentaron modificaciones significativas, inhibiendo en menor porcentaje la contracción junto con el carvacrol fueron cimetidina (\bar{x} = 45.22 DE \pm 3.38), metformina (\bar{x} = 35.26 DE \pm 2.08) y L-NAME (\bar{x} = 43.28 DE \pm 2.25) comparadas con el efecto individual de la indometacina proponiendo el mecanismo de acción como bloqueador de receptores de histamina H₂, bloqueador de canales de K⁺ y bloqueador de la síntesis de óxido nítrico; la modificación significativa inhibiendo en mayor porcentaje la contracción fueron biguanida (\bar{x} = 76.10 DE \pm 6.15) y propranolol (\bar{x} = 59.63 DE \pm 1.75) comparadas con el efecto individual de la indometacina, al efecto de la indometacina fueron biguanida observando un efecto sinérgico con el carvacrol.

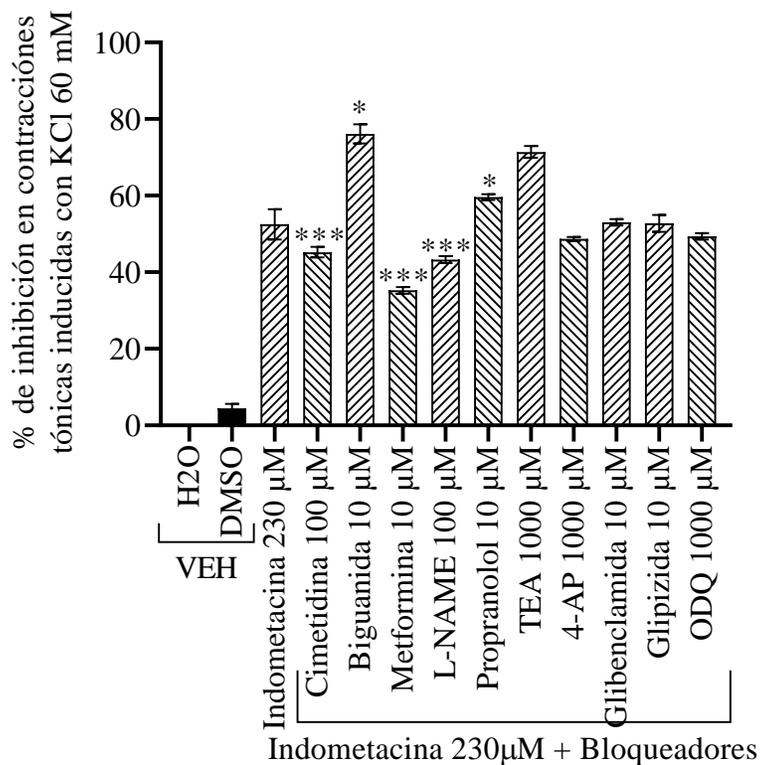


Figura 21. Efecto de los diferentes bloqueadores sobre el efecto relajante de la indometacina.

Se muestran los vehículos utilizados (VEH), el efecto individual del carvacrol y los bloqueadores cimetidina, biguanida, fenformina, L-NAME, propranolol, TEA, 4-P, glibenclamida, glipizida y ODQ. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $n = 6$, datos obtenidos mediante un análisis de varianza ANOVA, seguido de una prueba de comparación múltiple Dunnett, las líneas verticales indican el EEM.

VIII. DISCUSIÓN

El útero gestante y no gestante tiene una naturaleza contráctil cuya función es la expulsión de los anexos y, en caso de ser gestante, la expulsión del producto (47).

El parto pretérmino constituye una problemática mundial importante, puesto que los supervivientes suelen presentar secuelas que les impiden el óptimo desarrollo psicosocial (17) es por eso que la terapéutica para lograr la gestación completa se encuentra en constante investigación y desarrollo.

El tratamiento debe tener la capacidad de inhibir las contracciones efectivas del trabajo de parto, así como tener los menores efectos adversos posibles siendo seguro para la madre y para el producto. Los fármacos disponibles actualmente son los bloqueadores de receptores de oxitocina (atosiban) (48,49) y los AINEs (indometacina) (24) siendo éstos los más seguros para el binomio. La indometacina es un analgésico antiinflamatorio no esteroideo que inhibe la actividad de la COX-1 y COX-2, disminuyendo la producción de prostaglandinas con lo cual se regulan las contracciones uterinas. La indometacina prolonga el embarazo poco más de 48h, sin embargo, presenta complicaciones tales como como leucomalacia periventricular, enterocolitis necrotizante, displasia broncopulmonar, cierre prematuro del conducto arterioso y oligohidramnios. Los bloqueadores de canales de Ca^{2+} , como el nifedipino, actúan como tocolíticos mediante la inhibición de la entrada de calcio a la célula e inhibiendo el aumento de calcio intracelular proveniente del RSP; los efectos adversos de los bloqueadores de canales de calcio más comunes son hipotensión y taquicardia materna y al combinarlo con magnesio los efectos adversos se potencializan debido a la interacción que se manifiesta entre ambos medicamentos, tales como bloqueo neuromuscular y colapso cardiovascular (50,51).

VIII.1 De manera dependiente de concentración, el carvacrol inhibe las contracciones fásicas espontáneas en útero aislado de rata gestante.

El presente estudio mostró la inhibición de la contracción fásica espontánea del músculo uterino aislado de rata gestante de manera dependiente de concentración, siendo éste el primero en realizarse. Los resultados son consistentes con los obtenidos en diferentes músculos lisos, tales como anillos aórticos mesenterio e íleon de rata y tráquea de cobayo donde el efecto relajante es significativo y, de igual manera, dependiente de concentración sugiriendo que actúa directa o indirectamente para inhibir la entrada de Ca^{2+} a la célula y por lo tanto inhibiendo la contracción (52–56).

VIII.2 Indometacina y Carvacrol de manera individual inhiben la contracción tónica inducida con K^+ en forma dependiente de la concentración.

VIII.2.1 Carvacrol

Bajo las condiciones experimentales de este estudio, la contracción se indujo electro mecánicamente con estímulo de KCl mL con Ca^{2+} lo que provocó la despolarización de la membrana del miocito y, por lo tanto, la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L que participan en la contracción tónica sostenida (57). El carvacrol demostró la capacidad de inhibir la contracción inducida de manera dependiente de concentración ($3\mu\text{M}$ - $230\mu\text{M}$), se observó también que el carvacrol fue capaz de inhibir al 100% la contracción en su concentración más alta ($R_{\text{max}}= 100\%$) estos hallazgos concuerdan con el estudio realizado en tráquea aislada de cobayo y aorta de rata los cuales mostraron relajación del músculo liso de manera dependiente de la dosis administrada al tejido (28,29). En un estudio realizado por Peixoto-Neves se muestra una $\text{IC}_{50}= 78.80 \pm 11.91\mu\text{M}$ (55) muy parecida a la encontrada en este estudio $\text{IC}_{50}= 64.62$, se observa así que el carvacrol presenta efecto útero relajante mediante un mecanismo alternativo a la inhibición de COX-1 y COX-2 (28) ya que la contracción sostenida depende de la entrada de Ca^{2+} a la célula, se puede afirmar que la inhibición, en esta contracción, es compatible con el efecto bloqueante de la entrada de Ca^{2+} .

VIII.2.2 Indometacina

Antiinflamatorio no esteroideo, comúnmente usado como antipirético, antiinflamatorio y analgésico (33), la indometacina se utiliza como útero relajante de primera línea a partir de las 32 SDG con el objetivo de prolongar el embarazo al menos 48 h, sin embargo, dada su efectividad, la indometacina logra prolongarlo hasta 7 días (3,26). El mecanismo de acción descrito en la tocólisis consiste en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, las cuales participan en el incremento de Ca^{2+} intracelular (25).

Bajo las mismas condiciones experimentales descritas previamente, se observó que la indometacina tiene la capacidad de inhibir las contracciones de manera dependiente de concentración ($3 \mu\text{M} - 420 \mu\text{M}$) tal como lo describe Sawdy R. et al. en el estudio en el cual, en miometrio humano aislado se observa inhibición de la contracción dependiente de concentración, en este caso con significancia a partir de concentraciones altas ($100 \mu\text{M}$) (58), así mismo, Baumbach J. et al. demuestra una inhibición de la contracción de un 10 a 30% dependiente de concentración en útero humano aislado (59) en la presente investigación hubo resultados significativos desde concentraciones menores ($23 \mu\text{M}$) en comparación con un estudio que muestra resultados significativos a partir una concentración de $100 \mu\text{M}$ en útero humano (58), esto puede deberse al mantenimiento del tejido uterino in vitro.

VIII.3 Efecto útero relajante de la indometacina y el carvacrol sobre la contracción fásica inducida con oxitocina.

La oxitocina es una hormona neurohipofisaria que tiene un papel importante durante el parto induciendo las contracciones y posparto para excretar leche de las glándulas mamarias. En el músculo la oxitocina tiene un receptor específico en la membrana del miocito, este receptor es de la familia de las proteínas G transmembranales. La oxitocina activa la hidrólisis mediada por fosfolipasa C creando segundos mensajeros (IP_3), aumentando el Ca^{2+} intracelular e iniciando así la contracción uterina. (60)

VIII.2.3 Carvacrol

Se estimuló el tejido uterino aislado de rata gestante con oxitocina con el propósito de inducir contracciones fásicas, las cuales simularían el trabajo de parto. Se decidió utilizar el tejido con estas características puesto que se sabe que la expresión de los receptores de oxitocina aumentan conforme avanza la gestación (60), encontrándose activos para cuando se realizó el experimento.

El carvacrol mostró una inhibición de la contracción de manera dependiente de concentración, encontrando significancia a partir de 23 μM con un promedio de 15.4% de inhibición y el 100% de inhibición se alcanzó con una concentración de 230 μM , en comparación con el estudio realizado por Lorente et al. en el cual las contracciones fueron inhibidas dependientes de la concentración (61).

VIII.2.4 Indometacina

La inducción fármaco mecánica de las contracciones con oxitocina y su posterior administración de indometacina dio como resultado una inhibición de la contracción significativa con contracciones bajas de 30 μM hasta 560 μM , en tales casos alcanzaron una inhibición del 21.47% al 92.65% respectivamente, lo cual concuerda con el estudio realizado en útero humano donde se observa una inhibición dependiente de concentración, en este estudio se obtuvieron significancias con concentraciones que van de 8.06 a 45.08 μM alcanzando el 95% de inhibición (62). En otro estudio realizado por Engstrom, se probó la indometacina en tiras uterinas aisladas de rata estrogenizada, mostrando también la inhibición de la contracción dependiente de concentración (63), aunque en este caso la expresión de los receptores de oxitocina no fue la óptima puesto que el útero no era gestante.

VIII.4 El efecto útero relajante de la indometacina es más potente que el del carvacrol.

Al hacer una comparación entre los parámetros farmacológicos de la indometacina y el carvacrol y compararlos con el control (nifedipino) el cual fue utilizado porque es un bloqueador de canales de Ca^{2+} (45,46) y que permite inhibir la contracción con dosis

mínimas, es decir es muy potente y efectivo, pero no se utiliza de manera común en la terapéutica por los efectos adversos que presenta.

Se observa que la indometacina es más potente que el carvacrol puesto que con una concentración menor se obtienen resultados significativos, en comparación, el carvacrol mostró ser más efectivo puesto que con una concentración menor inhibe al 100% la contracción y su IC_{50} es menor a la de la indometacina.

La potencia y efectividad de la indometacina se ha comprobado ya al punto de ser ésta de las primeras líneas terapéuticas (3,39). Es importante mencionar que no se han realizado estudios que comparen la potencia y efectividad del carvacrol contra algún control como el nifedipino.

VIII.5 Mecanismo de acción del carvacrol e indometacina.

Para intentar dilucidar el mecanismo de acción del carvacrol e indometacina, además del ya descrito por la literatura como inhibidor de COX (29) se probaron ante diferentes bloqueadores los cuales deben actuar sobre receptores, canales o enzimas del tejido uterino aislado.

Se incubaron los diferentes bloqueadores hasta alcanzar un período de estabilización del tejido para la posterior adición del fármaco a evaluar lo cual permitió observar si se modificaba el efecto, con base en esto se puede afirmar si disminuye el efecto del bloqueador ante el fármaco entonces dicho fármaco está actuando por ese mecanismo de acción.

De acuerdo a los resultados, el efecto útero relajante del carvacrol se vio afectado por los bloqueadores biguanida, TEA y 4-AP, esto señala que el mecanismo de acción del carvacrol puede deberse en parte al bloqueo los canales de K dependientes de ATP y los dependientes de voltaje y bloqueador de canales de Ca^{2+} .

El tejido uterino aislado de rata gestante responde a la estimulación tónica sostenida cuando se incuba con ringer de KCL con Ca^{2+} y baja paulatinamente cuando se incuba con ringer de KCL sin Ca^{2+} , lo que sugiere que esta respuesta pueda deberse a la inhibición de los canales de Ca^{2+} (57). En otro estudio donde se utilizó músculo liso de rata (aorta) donde la membrana

era despolarizada con K^+ de forma dependiente de concentración se observó que el mecanismo de acción del carvacrol se debe también al bloqueo de canales de Ca^{2+} .

Al igual que el carvacrol, el efecto espasmolítico de la indometacina se vio afectado por los bloqueadores cimetidina, metformina, L-NAME, biguanida y propranolol. Ante cimetidina, metformina y L-NAME se observa una menor inhibición de la contracción, lo que propone un mecanismo de acción como bloqueador de receptores de histamina H_2 , bloqueador de canales de K^+ , bloqueador de la síntesis de óxido nítrico y bloqueador de canales de Ca^{2+} ; la inhibición de la contracción en mayor porcentaje fue por biguanida y propranolol, lo que sugiere un efecto sinérgico con el carvacrol.

Existe el antecedente donde Saadat expone a la indometacina ante los bloqueadores glibenclamida, L-NAME, y cimetidina, (64) donde en tráquea de rata, se observan modificaciones en el efecto inducido por indometacina, cabe mencionar que la contracción en este estudio fue inducida con KCL 60mM, demostrando que el mecanismo de acción adjunto al ya descrito por la literatura puede ser bloqueador de los receptores a histamina H_2 (65), bloqueador de canales de K^+ dependientes de ATP y de voltaje y como bloqueador de la síntesis de óxido nítrico (65,66). Huang (67) sugiere el mecanismo de bloqueo de canales de Ca^{2+} al exponer a la indometacina ante ODQ en anillos aórticos aislados de rata pero en la presente investigación no se observó modificación significativa del efecto, esto tal vez pueda deberse que, aunque ambos músculos son lisos, uno depende en su mayoría de los impulsos eléctricos que de los hormonales, como lo es el músculo liso uterino, sobre todo el gestante.

IX. CONCLUSIÓN

Tanto el carvacrol como la indometacina tienen un efecto útero relajante dependiente de concentración. De manera individual la biguanida, TEA y 4-AP modifican de manera estadísticamente significativa el efecto probado del carvacrol lo que sugiere un efecto sinérgico al inhibir en mayor porcentaje la contracción.

La indometacina, de manera individual presenta un efecto sinérgico con la biguanida y el propranolol y un menor porcentaje de inhibición de la contracción con cimetidina, metformina y L-NAME por lo que se encuentran los mecanismos de acción bloqueador de receptores de histamina H₂, canales de K dependientes de ATP y bloqueador de la síntesis de óxido nítrico, además del ya descrito para ambos por la literatura, la inhibición de la COX 1 y 2 y bloqueador de canales de Ca²⁺.

Se sabe que el carvacrol posee propiedades antibióticas, antivirales y antiinflamatorias, con lo cual el arresto del trabajo de parto puede ser más efectivo e incluso llevar a término el embarazo, también se sabe que tiene propiedades neuroprotectoras las cuales podrían prevenir las complicaciones del neonato pre término y para la madre ofreciendo menores efectos adversos. La presente investigación demostró el efecto útero relajante del carvacrol in vitro y comparado con la indometacina es tan potente como efectivo por lo que puede este perfilarse como fármaco tocolítico ofreciendo seguridad y efectividad al binomio.

X. PERSPECTIVAS

Para corroborar el efecto inhibitorio del carvacrol a través de los canales iónicos u otros mecanismos se requeriría realizar estudio utilizando técnica *patch clamp*. Para evaluar la seguridad de estos fármacos se necesitan realizar pruebas en modelos de útero humano gestante aislado, así como la combinación de ambos fármacos con el objetivo de determinar si existe sinergia o antagonismo y, posteriormente diseñar e implementar un modelo humano in vivo.

XI. REFERENCIAS

1. Kim SH, Pohl O, Chollet A, Gotteland JP, Fairhurst ADJ, Bennett PR, et al. Differential Effects of Oxytocin Receptor Antagonists, Atosiban and Nolasiban, on Oxytocin Receptor–Mediated Signaling in Human Amnion and Myometrium. *Mol. Pharmacol.* 2017; 91:403-415.
2. Daniel AB, Dañino M, Reyes DC, Vargas AX, Zenteno IE, Morales L. Atención de Parto. *DICim CECAM.* 2011; 1-24.
3. Dutta EH, Behnia F, Harirah H, Costantine M, Saade G. Perinatal Outcomes after Short versus Prolonged Indomethacin for Tocolysis in Women with Preterm Labor. *Am J Perinatol.* 2016;0587:1-5.
4. Tribe RM, Taylor PD, Kelly NM, Rees D, Sandall J, Kennedy HP. Parturition and the perinatal period: can mode of delivery impact on the future health of the neonate?. *J Physiol.* 2018; 596(23):5907-5722.
5. Quinn AJ, Munoz FM, Gonik B, Frau L, Cutland C, Mallet-Moore T, Kissou A, Wittke F, et al. Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine.* 2016; 34: 6047-6056.
6. The American College of Obstetricians and Gynecologists. Management of Preterm Labor. *Practice Bulletin of Obstetrics & Gynecology.* 2016; 128(4):155-164.
7. Franco-Coops P, García Baltazar J, Ochoa-Torres MA, Sánchez-Rodríguez O, Sánchez-Tovar H, Segura-Zavala JM. Diagnóstico y Manejo del Parto Pretérmino. *GPC CENETEC.* 2009; 1-37.
8. Ravanos K, Dagklis T, Petousis S, Margioulas-Siarkou C, Prapas Y, Prapas N. Factors implicated in the initiation of human parturition in term and preterm labor: a review. *Gynecol Endocrinol.* 2015; 1-5.
9. Barfield WD. Public Health Implications of Very Preterm Birth. *Clin Perinatol.* 2018;45(3):565-77.
10. Van Vilet EOG, Schuit E, Heida KY, Opmeer BC, Kok M, Gyselaers W, et al. Nifedipine versus atosiban in the treatment of threatened preterm labour (Assessment of Perinatal Outcome after Specific Tocolysis in Early Labour : APOSTEL III-Trial). *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014;14(1):1–6.

11. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm Labor: One Syndrome, Many Causes. *NIH-PA*. 2014; 345(6198):760-765.
12. Monangi NK, Brockway HM, House M, Zhang G, Muglia LJ. The genetics of preterm birth: Progress and promise. *Semin Perinatol*. 2015; 39: 574-583.
13. Pérez-Zamudio R, López-Terrones CR, Rodríguez-Barboza A. Morbilidad y mortalidad del recién nacido prematuro en el Hospital General de Irapuato. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2013;70(4):299-303.
14. Pařízek A, Koucký M, Dušková M. Progesterone, inflammation and preterm labor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 139:159-65.
15. Buxton ILO. Regulation of uterine function: A biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation. *Mol Pharmacol*. 2004;65(5):1051-9.
16. Muñoz-Pérez VM, Ortiz MI, Cariño-Cortés R, Fernández-Martínez E, Rocha-Zavaleta L, Bautista-Ávila M. Preterm Birth, Inflammation and Infection: New Alternative Strategies for their Prevention. *Curr Pharm Biotechnol*. 2019;20(5):354–65.
17. Hall JE, Guyton AC. Excitación y contracción del músculo liso. En: Hall JE, Guyton AC *Tratado de Fisiología médica*. Barcelona, España: Elsevier; 12 ed.: 91-98.
18. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advan. In Physiol. Edu*. 2003; 27: 201-206.
19. Parkington HC, Coleman HA. Excitability in Uterine Smooth Muscle. *The Endocrinology of Parturition. Basic Science and Clinical Application*. 2001; 27: 179-200.
20. Young RC. The Uterine Pacemaker of Labor. *Best Pract. Res. Cl. Ob*. 2018; 1-39.
21. Young RC. Myocytes, Myometrium and Uterine Contractions. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2007; 1101:72-84.
22. Haram K, Seglem-Mortensen JH, Morrison JC. Tocolysis for acute preterm labor: does anything work. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014; 1-8.
23. Paul JW, Smith R. Preventing Preterm Birth: New Approaches to Labour Therapeutics. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;1-28.

24. Van Vilet EOG, Boormans EM, De-Lange TS, Mol BW, Oudijk MA. Preterm labor: current pharmacotherapy options for tocolysis. *Expert Opin Pharmacother.* 2014; 15(6):787-797.
25. Younger JD, Reitman E, Gallos G. Tocolysis: Present and future treatment options. *Semin Perinatol.* 2017;41(8):493–504.
26. Rath W, Kehl S. Acute Tocolysis - A Critical Analysis of Evidence-Based Data. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2018; 78:1245-1255.
27. Meller CH, Carducci ME, Ceriani-Cernadas JM, Otaño L. Preterm premature rupture of membranes. *Arch Argent Pediatr* 2018;116(4): 575-581.
28. Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;55(3):304-18.
29. Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, Contreras M, et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phyther Res.* 2018;32(9):1-13.
30. Marchese A, Arciola CR, Coppo E, Barbieri R, Barreca D, Chebaibi S. The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling.* 2018; 1-28.
31. Cacciatore I, Di-Giulio M, Fornasari E, Di-Stefano A, Cerasa LS, Marianelli L. Carvacrol Codrugs: A New Approach in the Antimicrobial Plan. *PLoS ONE.* 2015; 10(4): 1-20.
32. Wagner H, Wierer M, Bauer R. In vitro-Hemmung der Prostaglandin-Biosynthese durch etherische Öle und phenolische Verbindungen. *Planta Med.* 1986; 184-187.
33. Lucas S. The Pharmacology of Indomethacin. *Headache.* 2016; 436-446.
34. Manuck TA. Refining Pharmacologic Research to Prevent and Treat Spontaneous Preterm Birth. *Front. Pharmacol.* 2017; 8(118): 1-5.
35. Klauser CK, Briery CM, Martin RW, Langston L, Magann EF, Morrison JC. A Comparison of Three Tocolytics for Preterm Labor: A Randomized Clinical Trial. *J Matern-Fetal Neo M.* 2013; 1-21.
36. Oniga I, Puscas C, Silaghi-Dumitrescu R, Olah NK, Sevastre B, Marica R, et al. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical Composition and Biological Studies. *Molecules.* 2018; 23(2077): 1-14.

37. Landa P, Kokoska L, Pribylova M, Vanek T, Marsik P. In vitro Anti-inflammatory Activity of Carvacrol: Inhibitory Effect on COX-2 Catalyzed Prostaglandin E2 Biosynthesis. Arch Pharm Res.2009;1(32):75-78.
38. Goze I, Alim A, Akkus-Cetinus S, Cetin A, Durmus N, Turan-Atas A, et al. *In Vitro* Antimicrobial, Antioxidant, and Antispasmodic Activities and the Composition of the Essential Oil of *Origanum acutidens*. J Med Food. 2010; 13(3):705-709.
39. Katz IM, Indomethacin. Ophthalmol. 1981; 88(5): 455-458.
40. Orueta R. Empleo de fármacos en embarazo y lactancia. Grupo de Utilización de Fármacos de la semFYC. 2007; 1-13.
41. Doni D, Paterlini G, Locatelli A, Arnoldi S, Magri MC, Bernasconi D, et al. Effects of antenatal indomethacin on ductus arteriosus early closure and on adverse outcomes in preterm neonates. J Matern Neonatal Med. 2020;33(4):645-50.
42. Jespersen B, Tykocki NR, Watts SW, Cobbett PJ. Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath-applications to pharmacology research. J Vis Exp. 2015;(95):1-9.
43. Ponce-Monter H, Campos MG, Pérez S, Pérez C, Zavala M, Macías A, et al. Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus. Fitoterapia. 2008;79(6):446–50.
44. Ponce-Monter H, Fernández-Martínez E, Ortiz MI, Ramírez-Montiel ML, Cruz-Elizalde D, Pérez-Hernández N, et al. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, in vitro and in vivo studies. J Smooth Muscle Res. 2010;46(6):309-319.
45. Muñoz-Pérez VM, Fernández-Martínez E, Ponce-Monter H, Ortiz MI. Relaxant and anti-inflammatory effect of two thalidomide analogs as PDE-4 inhibitors in pregnant rat uterus. Korean J Physiol Pharmacol. 2017;21(4):429-37
46. Muñoz-Pérez VM, Ortiz MI, Ponce-Monter HA, Monter-Perez V, Barragán-Ramírez G. Anti-inflammatory and utero-relaxant effect of α -bisabolol on the pregnant human uterus. Korean J Physiol Pharmacol. 2018;22(4):391-398.
47. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY. Trabajo de parto y parto. En: Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY. CDMX, México: Mc Graw Hill Educación: 24ed.: 374-409.

48. Nanetti L, Raffaelli F, Giuliotti A, Sforza G, Giannubilo SR, Ciavattini A, et al. Oxytocin, its antagonist Atosiban, and preterm labor: a role for placental nitric oxide. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014; 7058: 1-6.
49. López-Gómez L, Marín-Gabriel MA, Encinas B, De la Cruz-Troca JJ, Rodríguez-Marrodán B. Oxytocin Receptor Antagonist (Atosiban) in the Threat of Preterm Birth: Does It Have Any Effect on Breastfeeding in the Term Newborn? *Breastfeed Med.* 2018; 13(2): 1-5.
50. Hanley M, Sayres L, Reiff ES, Wood A, Grotegut CA, Kuller JA. Tocolysis: A review of the literature. *Obstet Gynecol Surv.* 2019; 74 (1):50-55.
51. Kashanian M, Shirvani S, Sheikhsari N, Javanmanesh F. A comparative study on the efficacy of nifedipine and indomethacin for prevention of preterm birth as monotherapy and combination therapy: a randomized clinical trial. *J Matern-Fetal Neo M.* 2019; 9:1-6.
52. Alotabi M. The effect of cinnamon extract on isolated rat uterine strips. *Rep Biol.* 2016; 16:27-33.
53. Pereira de Moraes L, Silva AA, Evaristo Rodrigues da Silva R, Sousa da Costa RH, Brito Monteiro A, Rodrigues do Santos C, et al. Tocolytic activity of the *Lippia alba* essential oil and its major constituents, citral and limonene, on the isolated uterus of rats. *Chem Biol Inter.* 2018; 1-24.
54. Ghanadian M, Sdraei H, Cheraghi Z. Spasmodic versus spasmolytic activities of *Euphorbia spinidens* extract on rat isolated uterus. *School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences.* 2016; 11(6): 491-496.
55. Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MDM, Lima FC, Lahlou S, Magalhaes PJC, et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fund Clin Pharmacol.* 2010; 24: 341-350.
56. Nascimento Menezes PM, Coelho Brito M, Olinda de la Paiva G, Oliveira dos Santos C, Munis de Oliveira L, et al. Relaxant effect of *Lippia origanoides* essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle involves potassium channels and soluble guanylyl cyclase. *J. Ethnopharmacol.* 2018; 1-30.

57. Granger SE, Hollingsworth M, Weston AH. Effects of calcium entry blockers on tension development and calcium influx in rat uterus. *Br J Pharmacol.* 1986;87(1):147-56.
58. Sawdy R, Knock GA, Bennett PR, Poston L, Aaronson PI. Effect of nimesulide and indomethacin on contractility and the Ca²⁺ channel current in myometrial smooth muscle from pregnant women. *Br J Pharmacol.* 1998; 125: 1212-1217.
59. Baumbach J, Shi SQ, Shi L, Balducci J, Coonrod DV, Garfield RE. Inhibition of uterine contractility with various tocolytics with and without progesterone: in vitro studies. *AJOG.* 2012; 206:254 E1-5.
60. Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Wada KI, Kusayama T, Ishii N, et al. Pharmacologic characterization of the oxytocin receptor in human uterine smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2000;129(1):131-139.
61. Lorente I, Ocete MA, Zarzuelo A, Cabo MM, Jimenez J. Bioactivity of the essential oil of *bupleurum fruticosum*. *J Nat Prod.* 1989;52(2):267–72.
62. Engstrøm T, Atke A, Vilhardt H. Oxytocin receptors and contractile response of the myometrium after long term infusion of prostaglandin F₂ α , indomethacin, oxytocin and an oxytocin antagonist in rats. *Regul Pept.* 1988;20(1):65–72.
63. Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015; 55(3): 304-318.
64. Saadat S, Naghdi F, Ghorani V, Rakhshandeh H, Boskabady MH. Histamine (H₁) receptors, cyclooxygenase pathway and nitric oxide formation involved in rat tracheal smooth muscle relaxant effect of berberine. *Iran J Allergy, Asthma Immunol.* 2019;18(3):320-31.
65. Fox JLR, Von der Weid PY. Effects of histamine on the contractile and electrical activity in isolated lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136 (8):1210-1218.
66. Yao QY, Chen DM, Ye, Diao YP, Lin Y. Modulatory effects of taurine on jejunal contractility. *Braz. J Med. Biol Res.* 2014; 47(12): 1068-1074.
67. Ying H, Liting K, Yanping W, Mingjie S, Haifeng C, Huaqiang Z, et al. Vasorelaxant effect of osthole on isolated thoracic aortic rings in rats. *J Tradit Chinese Med.* 2019;39(4):492-501.

XII. ANEXOS

Se mencionan a continuación los documentos que fueron requeridos para la realización de la presente tesis, así como el artículo producto.

XII.1 Artículo: Tocolytic effect of the monoterptenic phenol isomer, Carvacrol, on the pregnant rat uterus, en la revista Chinese Journal of Physiology, septiembre-octubre 2020.

Original Article

Tocolytic Effect of the Monoterptenic Phenol Isomer, Carvacrol, on the Pregnant Rat Uterus

Victor Manuel Muñoz-Pérez^{1*}, Mario I. Ortiz^{2*}, Lillian S. Gerardo-Muñoz¹, Raquel Carriño-Cortés¹, Andrés Salas-Casas²

¹Department of Pharmacology, Academic Area of Medicine, Institute of Health Sciences, Autonomous University of the State of Hidalgo, México, ²Department of Geriatrics, Academic Area of Gerontology, Institute of Health Sciences, Autonomous University of the State of Hidalgo, México

Abstract

Despite the wide application of carvacrol (CAR) in different biological and medical areas, there is still insufficient electrophysiological data on the mechanisms of action of CAR, particularly in the pregnant uterine function. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* tocolytic effect of CAR on the contractility of isolated pregnant rat uterus in the presence of a calcium channel antagonist (nifedipine) and a cyclooxygenase inhibitor (indomethacin). The uteri were isolated from pregnant Wistar rats at 16–18 days of pregnancy and suspended in an isolated organ bath chamber containing a Ringer's physiological solution and aerated with 95% O₂ and 5% CO₂. Samples were used in functional tests to evaluate the inhibitory effect of CAR at increasing concentrations on the rhythmic spontaneous, oxytocin-induced phasic, K⁺-induced tonic, and Ca²⁺-induced contractions. The differences in inhibitory concentration-50 and E_{max} among the compounds were determined using the one-way ANOVA followed by a *post hoc* Student-Newman-Keuls or Bonferroni test, in all cases $P < 0.05$ was considered statistically significant. Nifedipine was used as positive controls where required. CAR caused a significant concentration-dependent inhibition of the uterine contractions induced by the pharmacological and electro-mechanic stimuli. We showed that the inhibitory effects of CAR depends on the type of muscle contraction stimuli, and that it acts stronger in spontaneous rhythmic activity and in contractions of isolated rat uterus induced by Ca²⁺. Nifedipine was more potent than CAR and indomethacin on the uterine contractility ($P < 0.05$), but none of them was more effective than nifedipine. Therefore, the tocolytic effect induced by CAR was associated with the blockade of the calcium channels in the pregnant rat uterus. This property placed CAR as a potentially safe and effective adjuvant agent in cases of preterm labor, an area of pharmacological treatment that requires urgent improvement.

Keywords: Calcium channels, carvacrol, pregnancy, preterm labor, tocolytic

INTRODUCTION

Pre-term birth (PTB) is one of the main clinical problems in gynecological and obstetrical practice. The most common causes include infections and chronic conditions such as diabetes and high blood pressure, among others.^[1] Tocolytics are also known as anti-contraction medications or labor suppressants that are used to suppress or inhibit the premature labor; in fact, the tocolytic therapy is provided when delivery would result in premature birth.^[2] Currently, tocolytic drugs, such as calcium channel blockers, beta-adrenergic receptor agonists, and cyclooxygenase inhibitors are used for the treatment of PTB as a first-line therapy.^[3-5] These drugs have different mechanisms of actions, such as inhibiting calcium channels, reducing the number of some inflammatory mediators, and increasing the intracellular concentrations of some second messengers related to the uterine relaxation mechanisms.^[5,6] Despite the availability of several tocolytic drugs that can inhibit the premature uterine contractions, the

***Address for correspondence:** Dr. Victor Manuel Muñoz-Pérez, Department of Pharmacology, Academic Area of Medicine, Institute of Health Sciences, Autonomous University of the State of Hidalgo, Eliseo Ramírez Ulloa 400, Doctores Pachuca, 42090, Hidalgo, Mexico. E-mail: victor9783@hotmail.com
Dr. Mario I. Ortiz, Department of Pharmacology, Academic Area of Medicine, Institute of Health Sciences, Autonomous University of the State of Hidalgo, Eliseo Ramírez Ulloa 400, Doctores, 42090, Pachuca, Hidalgo, Mexico. E-mail: mario_i_ortiz@hotmail.com

Received: 19-Jul-2020 Revised: 18-Aug-2020 Accepted: 17-Sep-2020
Published: 27-Oct-2020

Access this article online	
Quick Response Code: 	Website: www.cjphysiology.org
	DOI: 10.4103/CJPC.P_56_20

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: WKHLRPMedknow_reprints@wolterskluwer.com

How to cite this article: Muñoz-Pérez VM, Ortiz MI, Gerardo-Muñoz LS, Carriño-Cortés R, Salas-Casas A. Tocolytic effect of the monoterptenic phenol isomer, carvacrol, on the pregnant rat uterus. Chin J Physiol 2020;63:204-10.

XII.2 Acta aprobación de CIECUAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
COORDINACIÓN ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS
DIRECCIÓN DEL BIOTERIO
COMITÉ INTERNO DE ÉTICA



DICTAMEN DE EVALUACIÓN

INSTITUCIÓN (Subdirección, Departamento o Área de trabajo): Instituto de Ciencias de la Salud, Área académica de Medicina		FOLIO: CIECUAL/004/2018	
		FECHA DE SOLICITUD: 11 de octubre de 2018	
PROYECTO: Efecto espasmolítico y mecanismo de acción del Carvacrol y su combinación con Indometacina y Atosiban en útero gestante asilado de rata Wistar.		RESPONSABLE DEL PROYECTO: Dr. Mario Isidoro Ortiz Ramírez.	
ASPECTOS A EVALUAR:	RESULTADO		
	ACEPTABLE	NO ACEPTABLE	SUGERENCIAS
JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES DE LABORATORIOS	X		
BIENESTAR Y ESTRÉS ANIMAL	X		
PROCEDIMIENTOS Y CUIDADOS APLICADOS EN EL ANIMAL	X		
ASPECTOS ÉTICOS DEL PROTOCOLO	X		
PUNTO FINAL Y EUTANASIA	X		
OBSERVACIONES GENERALES La alumna de maestría M. C. Lilian Scarlet Gerardo Muñoz deberá tomar el curso sobre manejo y cuidados de animales de laboratorio, con la intención de homologar criterios.			
FECHA DE REVISIÓN	RESULTADO	SI	NO
2 de noviembre del 2018	APROBADO	X	
FECHA DE APROBACIÓN:	NEGADO		
06 de diciembre del 2018	PROPUESTAS O CAMBIO		
CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES QUE SE PROPORCIONARÁN: 90 ratas Wistar hembras, de 17 a 19 semanas de gestación, peso de 180 a 200 gr. Se proporcionarán 2 ratas por semana.			
INVESTIGADOR PRINCIPAL Dr. Mario Isidoro Ortiz Ramírez	PRESIDENTE DEL CIECUAL Dr. Luis Delgado Olivares	DIRECTOR DEL BIOTERIO Ing. Daniel Ramírez Rico	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
COORDINACIÓN ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS
DIRECCIÓN DEL BIOTERIO
COMITÉ INTERNO DE ÉTICA



DICTAMEN DE EVALUACIÓN

San Agustín Tlaxiaca, Hgo. Aa06 de diciembre del 2018

Estimado Dr. Mario Isidoro Ortiz Ramírez.

Por medio de la presente, le informamos que después de haber evaluado el protocolo intitulado “Efecto espasmolítico y mecanismo de acción del Carvacrol y su combinación con Indometacina y Atosiban en útero gestante asilado de rata Wistar”, éste ha sido **Aprobado**, por lo que queda registrado con el Folio **CIEQUAL/005/2018**.

Sin más otro particular, aprovechamos la ocasión deseándole el mejor de los éxitos en su proyecto.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN y PROGRESO”

Dr. Luis Delgado Olivares
PRESIDENTE DEL CIEQUAL

Ing. Daniel Ramírez Rico
DIRECTOR DEL BIOTERIO

XII.3 Constancia de curso “Manejo de animales de Bioterio”, enero 2019.



UAEH[®]
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Coordinación Académica
Dirección de Servicios Académicos
Dirección del Bioterio

Otorgan la presente

Constancia

A

M.C. LILIAN SCARLET GERARDO MUÑOZ

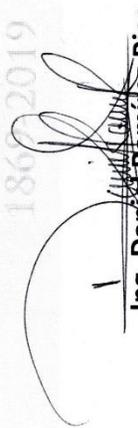
Por su participación en la capacitación: “Manejo de animales de laboratorio”
en el Bioterio-UAEH

Con una duración de una hora

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

San Agustín Tlaxiaca 09 de Enero del 2019.

1868-2019


Ing. Daniel Ramírez Rico

Director

BIOTERIO

DGSA. UAEH