



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FÁRMACO – BIOLÓGICA
DEL TIMOL EN MÚSCULO LISO UTERINO DE RATA
GESTANTE**

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

Lic. Aurora Pérez Sánchez

Director (a)

Dr. Víctor Manuel Muñoz Pérez

Codirector (a)

Dr. Mario Isidoro Ortiz Ramírez

Comité tutorial

Dra. Raquel Cariño Cortes

Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

Dr. Luis Enrique Soria Jasso



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
 Instituto de Ciencias de la Salud
 School of Medical Sciences
 Área Académica de Medicina
 Department of Medicine

01/08/2024
 Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
 Directora de Administración Escolar
 Presente.

El Comité Tutorial de la TESIS del programa educativo de posgrado titulada "Estudio de la actividad fármaco- biológica del timol en músculo liso uterino de rata gestante", realizado por la sustentante **Aurora Pérez Sánchez** con número de cuenta 326306 perteneciente al programa de **Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"
 Pachuca, Hidalgo a 01 de agosto de 2024

El Comité Tutorial

 Victor Manuel Muñoz Pérez Director		 Mario Isidoro Ortiz Ramírez Codirector
 Raquel Cariño Cortés Miembro del comité		 Tomás Eduardo Fernández Martínez Miembro del comité
 Luis Enrique Soria Jasso Miembro del comité		

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n
 Carretera Pachuca Actopan, San Agustín
 Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 41557 y
 41556
 medicina@uah.edu.mx



Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), número de beca 822783 y número de CVU1233073.

Agradecimientos Institucionales

Extiendo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado del 1 agosto del 2022 al 31 julio del 2024 para realizar mis estudios de posgrado en la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud.

Agradezco al director Dr. Héctor Hernández Domínguez y subdirectora Mtra. Fernanda Navarrete Uribe del Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por su apoyo y facilidades para la obtención de los recursos biológicos utilizados en el proyecto de investigación.

A mi director de tesis, Dr. Víctor Manuel Muñoz Pérez le agradezco por la responsabilidad, tiempo, guía moral e intelectual, recursos materiales y acompañamiento constante otorgados durante agosto 2022 hasta la obtención del grado, sin su apoyo este logro no hubiera sido posible, así mismo, agradezco a mi codirector de tesis, Dr. Mario Ortiz Ramírez por el apoyo moral, intelectual y económico para la realización de mi tesis.

Gracias a mi comité tutorial por la responsabilidad y disposición para ayudarme a resolver dudas en la parte experimental y en las bases teóricas del proyecto.

Al Dr. Carlos Enrique Cuevas Suárez por el tiempo dedicado en enseñarme el uso del programa estadístico GraphPad Prism 8 y poder así, realizar el análisis estadístico en este proyecto.

Agradecimientos

Este peldaño en mi vida profesional y emocional que consistió en un reto personal de dedicación, organización, responsabilidad y esfuerzo fue también gracias al apoyo, aliento y responsabilidad afectiva, económica y espiritual de mi madre Concepción Pérez Sánchez, sin eso me hubiera sido muy difícil caminar por este reto personal pues su fuerza y presencia fue indispensable en los momentos cruciales.

Por último, quiero agradecer todo el apoyo emocional y espiritual de mi grupo de autoayuda “Volver a empezar Pachuca” por motivarme en continuar con responsabilidad, sobriedad emocional y amor a este objetivo de mi vida, en especial a mi gran compañero Juan Bruno Ramos Reyes por su apoyo incondicional y guía en esta etapa específica de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS	9
Figura 1. Mecanismos de contracción y relajación del músculo liso	9
Figura 2. Estructura química del timol	9
Figura 3. Diseño experimental.....	9
ÍNDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
I. GENERALIDADES.....	15
1.1 Generalidades	15
1.2 Definición de parto.....	16
1.3 Definición de parto prematuro.....	16
1.4 Factores de riesgo del parto prematuro	16
1.5 Fisiopatología del parto prematuro	17
1.6 Epidemiología	18
1.7 Diagnóstico del parto prematuro.....	18
1.8 Músculo liso	19
1.9 Mecanismo de contracción y relajación del músculo liso.....	19
1.10 Tratamiento actual	23
1.11 Timol.....	23
1.11.1 Estructura y naturaleza del timol	23

1.11.2 Toxicidad.....	24
1.11.3 Mecanismo de acción.....	24
1.11.4 Farmacocinética	25
II. ANTECEDENTES	25
2.1 Propiedades terapéuticas del timol.....	25
2.2 Efecto espasmolítico del timol	26
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
IV. JUSTIFICACIÓN.....	28
V. HIPÓTESIS.....	28
VI. OBJETIVO	29
6.1 Objetivo general.....	29
6.2 Objetivos específicos	29
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
7.1 Contexto de la investigación	29
7.2 Tipo de estudio	30
7.3 Selección de la población	30
7.3.1 Criterios de inclusión	30
7.3.2 Criterios de exclusión	30
7.3.3 Criterios de eliminación.....	30
7.3.4 Animales de experimentación.....	31
7.3.5 Fármacos.....	31
7.3.6 Reactantes.....	31
7.3.7 Diagrama de diseño experimental	32
7.3.8 Pruebas experimentales (Principio y procedimiento).....	32

Registro isométrico de tejidos aislados	32
Determinación de AMPc en músculo liso uterino.....	35
Análisis estadístico	36
VIII. RESULTADOS.....	36
8.1 Efecto útero-relajante del timol en contracciones espontáneas	36
8.2 Efecto inhibitorio del timol en contracciones fásicas inducidas con PGF _{2α} ..	38
8.3 Efecto útero-relajante del timol en contracciones tónicas inducidas con KCl 40 mM.....	39
8.4 Curvas concentración – respuesta del timol y carvacrol con nifedipino en contracciones inducidas con PGF _{2α}	40
8.5 Curva concentración – respuesta del timol, carvacrol y nifedipino en contracciones tónicas inducidas con KCl.....	42
8.6 Curva concentración – respuesta del timol, carvacrol y nifepino en contracciones tónicas con KCl sin Ca ²⁺	44
8.7 Cuantificación de AMPc.....	46
IX. DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONES	52
REFERENCIAS	55

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de contracción y relajación del músculo liso

Figura 2. Estructura química del timol

Figura 3. Diseño experimental

Figura 4. Efecto útero relajante del timol sobre contracciones espontáneas

Figura 5. Trazo típico de la contracción espontánea

Figura 6. Efecto útero relajante del timol en contracciones fásicas inducidas con $\text{PGF}_{2\alpha}$

Figura 7. Trazo típico de la contracción espontánea

Figura 8. Efecto útero relajante del timol en contracciones tónicas inducidas con KCl

Figura 9. Trazo típico de la contracción tónica inducida con KCl

Figura 10. Curva concentración – respuesta del timol, carvacrol y nifedipino (control) en contracciones fásicas inducidas con $\text{PGF}_{2\alpha}$

Figura 11. Curva concentración – respuesta del timol, carvacrol y nifedipino (control) en contracciones tónicas inducidas con KCl

Figura 12. Curva concentración – respuesta del timol, carvacrol y nifedipino (control) en contracciones tónicas inducidas con KCl sin Ca^{2+}

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) y respuesta máxima ($\text{R}_{\text{máx.}}$) de timol, carvacrol y nifedipino.

ABREVIATURAS

OMS Organización Mundial de la Salud

SDG Semanas de Gestación

PP Parto prematuro
TNF α Factor de Necrosis Tumoral-alfa
IL-1 β Interleucina 1beta
IL-6 Interleucina 6
IL-8 Interleucina 8
OTR Receptor de oxitocina
COX1 Ciclooxygenasa 1
COX2 Ciclooxygenasa 2
CX-43 Conexina 43
AMPc Monofosfato de adenosina cíclico
ACOG Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos
NO Óxido nítrico
LD₅₀ Dosis letal 50
PR Receptor de progesterona
Ca²⁺ Ion calcio
GDP Difosfato de guanosina
GTP Trifosfato de guanosina
PLC Fosfolipasa C
DAG Diacilglicerol
IP₃ Trifosfato de inositol
RS Retículo Sarcoplásmico
MLCK Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLC Cadena ligera de la miosina
PKA Cinasa de proteínas dependiente de AMPc

GMPc Monofosfato de guanosina cíclico

PKG Cinasa de proteínas dependientes de GMPc

KCl Cloruro de potasio

PGF₂α: Prostaglandina F2alfa

Ach: Acetilcolina

CI₅₀: Concentración Inhibitoria 50

R_{máx}: Respuesta máxima

SRL: Solución Ringer

EEM: Error estándar de la media

AC: Adenilato ciclasa

RESUMEN

El parto prematuro (PP) es un grave problema de salud que genera altos costos y desencadena enfermedades físicas y mentales colaterales graves para el neonato y madre. Actualmente, los tocolíticos usados en clínica para el PP están asociados a reacciones secundarias que podrían causar hasta la muerte. Este proyecto fue una investigación experimental y transversal con el objetivo de estudiar el efecto tocolítico del timol en útero aislado de ratas Wistar gestantes obteniendo los parámetros farmacológicos de CI_{50} y R_{max} en diferentes tipos de contracciones y cuantificando la concentración de AMPc para descubrir si el timol es un estimulador de la adenilato ciclasa con el fin de estudiar su posible mecanismo de acción. El timol sí tiene efecto útero relajante de manera dependiente a la concentración. En las contracciones fásicas inducidas ($PGF_{2\alpha}$ 10 μM) se obtuvo un $E_{m\acute{a}x}$ de 84.5% ($p < 0.05$) a 230 μM y un CI_{50} de 87.4 μM , en ambas contracciones tónicas (KCl y Ca^{2+} acumulativo) se obtuvo un 100% de inhibición en la concentración de 230 μM ($p < 0.05$), con un CI_{50} de 79.9 μM y 76.7 μM , respectivamente. Se observó que el timol no estimula la formación de AMPc, ($p < 0.05$) por el contrario, cuando se combina con Forskolina, disminuye los niveles del segundo mensajero. En conclusión, el timol es un fármaco eficiente y potente comparado con el nifedipino el carvacrol.

Palabras claves

Espasmolítico, timol, AMPc, útero, mio regulador, tocolítico

ABSTRACT

Preterm labor (PP) is a severe health problem that generates high costs and triggers serious collateral physical and mental illnesses for the neonate and mother. Currently, tocolytics used in the clinic for PP are associated with secondary reactions that could even cause death. This project was an experimental and cross-sectional investigation to study the tocolytic effect of thymol in the isolated uterus of pregnant Wistar rats, obtaining the pharmacological parameters of IC₅₀ and E_{max} in different contractions and quantifying the concentration of cAMP. Thymol does have a concentration-dependent uterine relaxant effect. In induced phasic contractions (PGF_{2α}) 10 μM and E_{max} of 84% (p < 0.05) was obtained at 230 μM, and an IC₅₀ of 87.4 μM, in both tonic contraction (KCL and cumulative Ca²⁺) 100% inhibition was obtained at the 230 μM concentration (p < 0.05) with an IC₅₀ of 79.9 μM and 76.7 μM respectively. It was observed that thymol does not stimulate cAMP formation (p < 0.05); on the contrary, when combined with Forskolin, it decreases the levels of the second messenger. In conclusion, thymol is an efficient and potent drug that could be used as an alternative treatment for PP, suggesting its mechanism of action through calcium channel blockade.

KEYWORDS

Spasmolytic, thymol, AMPc, uterus, Myo regulator, tocolytic

INTRODUCCIÓN

El parto prematuro (PP) actualmente es la primera causa de muerte en niños menores de 5 años a nivel mundial, los bebés nacidos por este padecimiento llegan a padecer displasia pulmonar, hemorragias cerebrales, retinopatías, sepsis, retraso mental o muerte prematura, además a la madre le genera graves problemas de salud mental como depresión y desorden del estrés postraumático. De igual manera, el periodo de internamiento del neonato por día es costoso para las familias promedios a nivel nacional, sumado a esto, el tratamiento con tocolíticos usados actualmente en la clínica presentan efectos adversos que ponen en riesgo la salud del neonato y de la madre (1,2). Debido a esto, la investigación de nuevos compuestos naturales que sean efectivos, potentes y con pocas o nulas reacciones adversas son necesarios.

Se ha reportado que el timol presenta propiedades espasmolíticas en diferentes tipos de tejido de músculo liso: tráquea, ileón, colón y vesícula biliar en rata, cuyo, conejo, sin embargo, su mecanismo de acción no está bien estudiado. Este proyecto de investigación responde las siguientes preguntas de investigación: ¿El timol tiene efecto útero-relajante en tejido uterino de ratas gestantes? ¿Elevará el timol los niveles de AMPc sería uno de sus mecanismos de acción de la relajación del músculo liso uterino? A continuación, se describe cada una de las secciones que se presenta en esta tesis de investigación.

En la primera sección de generalidades y antecedentes se describen la base teórica del músculo liso y su mecanismo de contracción y relajación, se define el parto prematuro y la descripción de su fisiopatología, el tratamiento actual, información epidemiológica de este padecimiento. Además, se describen las características fisicoquímicas y la farmacología del timol, así como sus propiedades terapéuticas conocidas actualmente. En esta sección incluye también el planteamiento del problema y la justificación del proyecto.

En una segunda sección se describen los métodos utilizados utilizada en este proyecto y se muestran los resultados clasificados por tipo de contracción e indicando sus parámetros farmacológicos correspondientes y el análisis estadístico de cada variable.

Finamente en la sección de discusión, se explican los resultados y contrastan con la información científica publicada actualmente. En esta sección se incluye también la conclusión y referencias actualizadas en este proyecto.

I. GENERALIDADES

1.1 Generalidades

El embarazo es el proceso fisiológico natural de la reproducción humana donde el feto se desarrolla en el vientre de la madre; comprende desde el momento de la implantación del óvulo hasta el nacimiento y dura aproximadamente entre 37 y 42 semanas de gestación.(2)

1.2 Definición de parto

El parto, del latín “*partus*”, es el evento final del embarazo y este se define como “conjunto de fenómenos activos y pasivos que permiten la expulsión por vía vaginal del feto de 22 semanas o más, incluyendo la placenta y sus anexos”.(2)

1.3 Definición de parto prematuro

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al parto prematuro (PP) como “el nacimiento del producto antes de las 37 semanas de gestación (SDG) completas o menos de 259 días de gestación, contados a partir del primer día de la fecha del último día de menstruación con un peso menor a 2500 g”.(3) Se puede clasificar de acuerdo con su causa o de acuerdo con el periodo de gestación en que se produce. Cuando se clasifica por su causa se divide en dos tipos: iatrogénico o espontáneo; el PP iatrogénico es indicado por orden médica cuando se presente una complicación en el embarazo que pone en riesgo de la vida del binomio (madre y bebé) y el PP espontáneo es la expulsión del bebé derivado de infecciones genitourinarias, estrés, *abruptio placentae*, isquemia uteroplacentaria, etc.(4) Cuando el PP es clasificado por el tiempo de gestación en el que ocurre se divide en: extremadamente prematuro (menor a 28 SDG), muy prematuro (28 a 32 SDG), y moderado (32 a 34 SDG) y prematuro tardío (34 a 37 SDG).(5)

1.4 Factores de riesgo del parto prematuro

Los factores de riesgo asociados al PP pueden ser divididos de la siguiente manera:

- Factores asociados a las condiciones socioeconómicas como la pobreza, falta de vivienda, ausencia de cuidado prenatal durante el embarazo.
- Factores asociados a la edad de la madre, influye si es una adolescente o tiene una edad muy avanzada para embarazarse
- Factores asociados al estilo de vida de la madre, como tabaquismo, alcoholismo, consumo de drogas ilícitas, obesidad.

- Factores asociados a la salud de la madre como la diabetes gestacional, preclamsia, desnutrición, hipertensión, etc.
- Factores psicosociales implicados como el estrés, ansiedad, depresión, violencia intrafamiliar, etc.
- Factores asociados a los antecedentes gineco - obstétricos como gesta múltiple, antecedentes del PP, etc.
- Factores asociados a la gesta, como infecciones, ruptura de membranas, etc.(6)

1.5 Fisiopatología del parto prematuro

La hormona responsable de la quiescencia y mantenimiento del embarazo es la progesterona, evitando la descomposición de la colágena a través de la inhibición del gen hialuronano sintasa 2, bloquea la síntesis de la proteína: conexina 43 (CX-43) asociada a la contracción muscular, disminuye la expresión de la oxitocina y del receptor de prostaglandinas (PG) $F_{2\alpha}$, por medio de inhibición del receptor de progesterona (PR) combinado con el decrecimiento de la expresión de ZEB1 y ZEB2, y la inhibición del gen miR-200s inhibiendo la cascada de señalización necesaria para el parto.(7,8)

Cuando por diversos factores (estrés, infección, etc.) se activa una reacción inflamatoria y se activan los receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) o patrones moleculares asociados a daños (DAMPS), activan los receptores Toll-Like (TLR s) los cuales estimulan la producción de citocinas y quimiocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, CCL2 y IL-8) que servirán de señales proinflamatorias en los tejidos del útero, desencadenando la activación de las proteínas receptor de oxitocina (OXTR), Ciclooxygenasa 2 (COX-2) y conexina 43 (CX-43).(69,10)

Al disminuir la progesterona, los niveles de estrógeno aumentan y estimulan la producción de oxitocina en el hipotálamo, 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 CRHmRNA para producir estrógeno placentario, que se une a sus receptores que se encuentran acoplados a proteína $G_{q/11}$, que activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza al 4,5 bifosfato de inositol generando IP_3 y DAG. IP_3 se une a sus receptores en retículo sarcoplásmico produciendo la liberación de Ca^{2+} . El Ca^{2+} se une a la calmodulina desencadenando la contracción uterina.(10)

1.6 Epidemiología

Actualmente, se estima que 13.4 a 15.2 millones de infantes son nacidos por parto prematuro a nivel mundial siendo esta cifra un 9.9% de los nacimientos a nivel global. Sin embargo, la tasa del PP es variante dependiendo a las regiones mostrando un incremento en los países industrializados. En Latinoamérica la tasa de natalidad de prematuros por cada 100 nacimientos es de 9 traduciéndose a una cifra de 870,000 de recién nacidos prematuramente.(1) La secretaria de Salud en México reporta que aproximadamente 200,000 bebés nacen prematuramente, el Instituto de Perinatología de México reporta una incidencia del 19.7% de recién nacidos prematuros, mientras que el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) describe incidencias de entre 2.8 al 16.6% de los prematuros a nivel nacional.(11) Hidalgo registró el lugar número 12 a nivel nacional con una tasa del 18.5% de nacimientos prematuros.(12)

1.7 Diagnóstico del parto prematuro

En la guía de práctica clínica mexicana se establece que el diagnóstico del PP debe considerar los siguientes aspectos clínicos: por la presencia de contracciones uterinas (4 en 20 minutos o >8 en 1 hora), la dilatación (>3 cm) y/o borramiento (>80%), con o sin membranas amnióticas íntegras. Estos síntomas acompañados de una prueba de fibronectina positiva y un examen físico con espéculo para

evaluar: sangrado uterino, estado de membranas fetales (intactas o rotas) siendo estas necesarias para la toma de decisiones sobre el binomio. El Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG) para el diagnóstico del PP sugiere realizar la prueba del espéculo y una prueba de papel Nitrazina para pH para confirmar rompimiento de membranas, prueba de fibronectina positiva.(13)

Se ha llegado a un consenso general a través de revisiones sistemáticas que la detección de la longitud del cuello uterino es muy efectiva para prevención y diagnóstico del PP en mujeres que se encuentran con alto riesgo, un cuello uterino largo >40 mm en el segundo semestre se asocia al PP, al igual que el aumento de la densidad del líquido amniótico en la ecografía es un predictor independiente del PP espontáneo.(14)

1.8 Músculo liso

El músculo liso, también como conocido como visceral, está compuesto por células fusiformes uninucleadas careciendo del patrón estriado observado en los músculos esquelético y cardíaco. Está inervado por el sistema nervioso autónomo. El músculo liso está compuesto de fibras musculares más pequeñas dispuestas en dos tipos:

Multi unitario: Las fibras musculares separadas que actúan por separado aun cuando su inervación sea única.

2.Unitario o visceral: Las fibras musculares actúan como unidad cuando recibe un estímulo contráctil, la señal se propaga por todas las fibras a través de uniones de hendiduras que permiten el paso de iones provocando un cambio en el potencial de acción generando una contracción.(15)

1.9 Mecanismo de contracción y relajación del músculo liso

Las proteínas principales del mecanismo de contracción son la actina y la miosina y ambas pueden ser reguladas por estímulos electro-mecánico y fármaco-mecánico; el primer estímulo depende de un cambio de potencial de la membrana

lo cual estimula los canales iónicos operados por voltaje, especialmente los canales de Ca^{2+} tipo L lo que permite la entrada del ion al espacio intracelular obteniendo como resultado la contracción tónica; por otro lado, el estímulo fármaco-mecánico se produce cuando un agonista, hormona, neurotransmisor, etc. Se une a su receptor específico en la membrana desencadenando un mecanismo en cascada que resulta en la contracción fásica. Ambos tipos de contracción depende del ion Ca^{2+} para activar los segundos mensajeros y las proteínas contráctiles.(15,16)

Las proteínas G juegan un rol importante en la traducción de un estímulo externo a una cascada de señales intracelulares que tienen diferentes moléculas objetivo; están constituidas con 3 subunidades (α , β , γ) en su estado inactivo. En el mecanismo de contracción del músculo liso, cuando el receptor acoplado a proteína G recibe el estímulo, la proteína G sufre un cambio conformacional y la subunidad α que se encuentra asociada a Difosfato de guanosina (GDP) se unirá a Trifosfato de guanosina (GTP) para terminar de activar a la proteína G y liberar el complejo de subunidades β , γ . La proteína $G_{\alpha q}$, activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza a fosfatidil inositol 4,5, bifosfato liberando diacilglicerol (DAG) y 1,4,5-inositol trifosfato (IP_3). DAG activa las isoformas de las cinasas dependientes de las proteínas C (PKC) y el IP_3 estimula los receptores de IP_3 en el retículo sarcoplásmico (RS) en los canales de calcio unidos al receptor promoviendo la salida de Ca^{2+} de este organelo hacia el citosol. El aumento del Ca^{2+} en el espacio intracelular, produce la formación del complejo calcio – calmodulina, el mismo que activa la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) permitiendo fosforilar a la cadena ligera de la miosina (MLC). A través de esta actividad, la miosina se une con la actina por medio de puentes cruzados resultando en la contracción.(15,16)

El estado de contracción y relajación depende de los estados de fosforilación y desfosforilación; para producirse el estado de relajación el músculo liso, la enzima fosfatasa de la MLC des fosforila a la MLC en estado activo resultado en la relajación del músculo. La proteína G acoplada a RhoA y la cinasa de RhoA juegan un rol

importante en la activación e intensidad de la fosfatasa de MLC regulando así la contracción (Figura 1).(16)

Por otro lado, para la relajación del músculo liso se necesita la disminución de la concentración de Ca^{2+} y el óptimo funcionamiento de la fosfatasa de MLC. Respecto al retículo sarcoplásmico, en su membrana se encuentran ATPasas de Ca^{2+} - Mg^{+2} que al ser fosforiladas se une a 2 iones de Ca^{2+} y lo ingresa dentro del RS. Estas ATPasas también se encuentran en la membrana plasmática ayudando a reducir los niveles de calcio. También se encuentran las bombas intercambiadoras de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que ayudan a decrecer las concentraciones de calcio así mismo bloquear los canales de Ca^{2+} operados por voltaje reducirá los niveles.(15) Por otro lado, la activación de la proteína $\text{G}\alpha_s$ estimula a la adenilato ciclasa catalizando la hidrólisis de ATP en un segundo mensajero: adenosina monofosfato cíclico (AMPc) provocando la activación de la cinasa dependiente de AMPc (PRKA); cuando esta última enzima se activa, desfosforila a la MLCK y a PLC inhibiendo su actividad.(17)

Otro mecanismo de relajación es a través del NO, a través de él se activa la proteína G que estimula al receptor de la guanilil ciclasa (GC) obteniendo un segundo mensajero: Monofosfato de guanilil cíclico (GMPc) a través de la conversión de GTP a GMPc. Los efectos de este segundo mensajero están mediados por la proteína cinasa G (PKG). Cuando se activa PKG en el músculo liso produce la activación de la fosfatasa de MLC provocando la relajación del músculo liso vascular. (Figura 1).(18)

MECANISMOS DE CONTRACCIÓN Y RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO

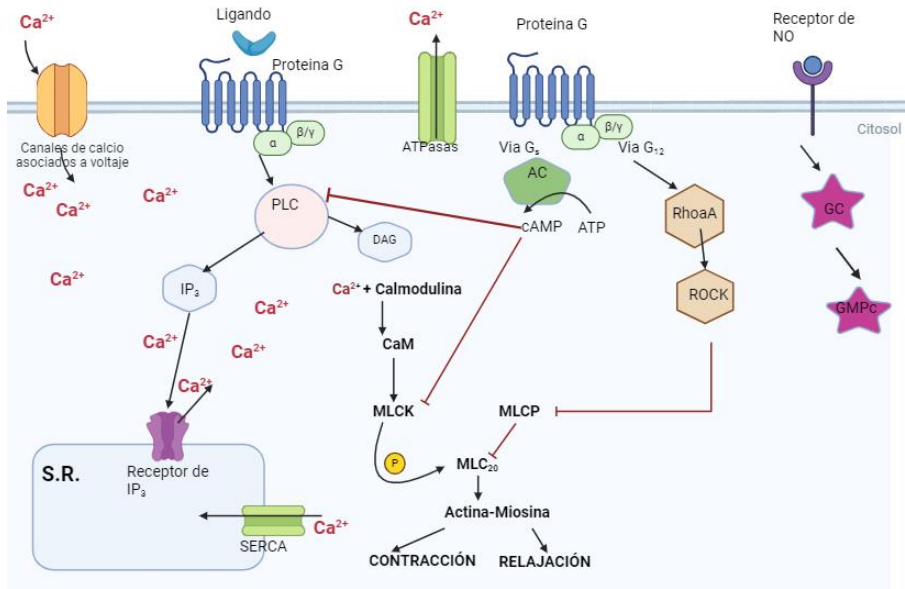


Figura 1. Mecanismo de contracción y relajación del músculo liso. Las flechas negras se interpretan como la dirección de la activación de la molécula. Las líneas rojas se interpretan como la dirección de la inhibición de la molécula. (16,17)

1.9.1 Mecanismo de relajación por AMPc

El aumento de la concentración de AMPc es iniciado con la interacción de un ligando al receptor unido a una proteína G_s; esta unión cataliza el intercambio entre GDP a GTP en la subunidad α de la proteína G terminando por activarla y produciendo la separación del dímero $\beta\gamma$. La subunidad α activa a AC, enzima responsable de catalizar AMPc a partir de ATP por medio de la hidrólisis de los grupos fosfato. El AMPc activa a la enzima efectora PKA, la cual fosforila e inhibe la MLCK evitando

que se lleve a cabo la contracción, bloquea la salida de Ca^{2+} del S.R y de los SOCC y VOCCs.(19)

La hidrólisis del AMPc está regulada por la super familia de enzimas: las fosfodiesterasas (PDE); 11 familias de están clasificadas por su secuencia de aminoácidos, la especificidad del sustrato, sus propiedades farmacológicas y su sitio alostérico. Las PDE 4,7 y 8 son altamente específicas por el AMPc; y en el útero, la PDE4 es la de mayor abundancia, incrementando en el embarazo tardío.(19,20)

1.10 Tratamiento actual

El término tocólisis se puede definir como la administración de fármacos para prevenir el nacimiento del bebé por medio de la inhibición o supresión de las contracciones uterinas por un lapso de 48 h para poder administrar al feto los fármacos necesarios para su maduración pulmonar y trasladar a la madre en caso de requerirlo a un hospital que cuente con el equipo necesario para su tratamiento y mantenimiento.(21,22) Los tocolíticos utilizados hoy en día tienen diferentes mecanismo de acción para cumplir su función como lo son: bloqueadores de los canales de Ca^{2+} (nifedipino), agonistas de los receptores β -adrenérgicos (terbutalina), inhibidores de la ciclooxigenasas (indometacina), antagonista a la oxitocina (atosiban), etc.(23) Sin embargo se ha reportado reacciones secundarias del uso de tocolíticos para el binomio incluyendo: preeclampsia severa, hemorragias, taquicardia y las contraindicaciones fetales: anomalías fetales letales, muerte fetal intrauterina, corioamnionitis, hiperglucemia fetal, hemorragias intraventriculares, etc.(24,25)

1.11 Timol

1.11.1 Estructura y naturaleza del timol

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un monoterpeno de apariencia cristalina con sabor picante de fórmula química $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$, por siglos se ha usado en la medicina tradicional al ser uno de los compuestos presente en los aceites esenciales en

especies de la familia *Lamiaceae* principalmente en el tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*) y la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), bergamota silvestre (*Monarda fistulosa*).^(26,27) La molécula del timol se deriva al igual que su isómero carvacrol del p-cimeno y se caracteriza por un grupo hidroxilo (-OH) unido a un anillo de benceno(Figura 2).⁽²⁸⁾

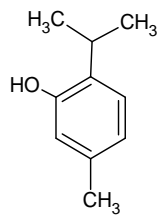


Figura 2. Estructura química del timol, 2-isopropil-5-metilfenol (C₁₀H₁₄O).⁽²³⁾ (1)

Imagen realizada en ChemSketch.

1.11.2 Toxicidad

La dosis letal 50 (LD₅₀) en ratas está reportada en 980 mg/kg, en cobayos es de 88 mg/kg, en ratones macho es de 1200 mg/kg y en ratones hembra se reporta de 1050 mg/kg, como suplemento alimenticio el timol se reporta como seguro.^(29,30)

1.11.3 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del timol no se encuentra bien estudiado sin embargo algunos autores plantean que el timol en micro concentraciones reduce la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ e incrementa la permeabilidad del ion en el retículo sarcoplásmico⁽³¹⁾ y bloqueo de los canales de canales de calcio en la membrana plasmática⁽³²⁾; otros autores refieren que su mecanismo de acción puede estar relacionado con el bloqueo de los canales de sodio⁽³³⁾ y la activación de los canales Receptor potencial transitorio humano 1 (hTRPA1).⁽³⁴⁾

1.11.4 Farmacocinética

Es insoluble en agua, soluble en etanol. Es de rápida absorción después de la administración oral y su degradación tiene lugar en el estómago o intestinos. No hay evidencia de timol libre en el plasma u orina después de la administración oral, sin embargo, en el plasma se encuentra presente como sulfato de timol alcanzando su concentración máxima a las 2 h después de la administración con una biodisponibilidad del 16%. Su metabolismo inicia con la con la glucuronidación a través de la enzima uridinadifosfato glucuronil transferasa (UGT) y por enzimas sulfotransferasas para posteriormente ser secretada al túbulo proximal; la ausencia de timol glucurónico se puede deber a la baja actividad de la UGT hepática en comparación con la sulfotransferasas. La eliminación ha sido registrada en la orina 24 h después de su aplicación, aunque en su mayoría es eliminado a las 6h.(30)

II. ANTECEDENTES

2.1 Propiedades terapéuticas del timol

El tomillo (*Thymus vulgaris*) ha sido usado tradicionalmente desde hace ya mucho tiempo como sazónador en la industria culinaria a través del mundo, y también se ha aplicado como remedio terapéutico tradicional donde su principal aplicación es como expectorante y broncodilatador.(35) Actualmente, se ha demostrado que el timol, principal compuesto activo de *T. vulgaris*, tiene propiedades antimicrobiana, (36), fungicida (37), espasmolítico (38), gastroprotector (39), antioxidante, (40), anti-mutagénico (41), antiinflamatorio (42), siendo de todas estas propiedades la actividad antimicrobiana la más estudiada porque tiene un amplio espectro en bacterias Gram negativas y Gram positivas incluidas especies transmitidas por alimentos de los géneros *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Listeria* y *Bacillus* y de infecciones respiratorias de los especies *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*. El mecanismo de acción reportado para esta propiedad consiste en inducir la permeabilización y de la membrana citoplasmática.(43)

2.2 Efecto espasmolítico del timol

El efecto espasmolítico fue descrito por primera vez en 1980 por Van den Broucke y Lemli en un estudio hecho en músculo liso gastrointestinal de rata y de cobayo. Ambos autores propusieron que el timol en dosis bajas (1×10^{-4} M) suponen un doble mecanismo de acción (antagonismo competitivo y no competitivo) y en dosis altas (2×10^{-4} M) apuntaban a un antagonismo no competitivo.(44) Se tiene registro de la propiedad espasmolíticas del timol en diferentes tejidos de músculo liso. En tráquea de cuyo el timol demostró tener una inhibición de 89% en contracciones estimuladas con $\text{PGF}_{2\alpha}$, 73% de inhibición en contracciones estimulados con histamina y con BaCl, (43% de inhibición).(45,46) Por otro lado, autores identificaron en aorta de rata que el timol en concentraciones bajas (10^{-8} y 10^{-7}) produce 15% de actividad contráctil en consecuencia a la conexión de los receptores α_1 y α_2 sin embargo cuando se aumenta la concentración de timol (10^{-4}) se produce una inhibición del 100% de la contracción espontánea por la activación de los receptores β .(47) Así mismo, en tráquea de rata se demostró que timol contrae en un 37% las contracciones con KCl.(45) (2) Así mismo, en tejido gastrointestinal, timol en concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ obtiene inhibición de contracciones del 44% en íleon y 50% en colon, sin embargo, en vesícula biliar solo obtiene un 5% de contracción.(38)

En 1962 se registra por primera vez que el extracto de *T. vulgaris* inhibe las contracciones uterinas inducidas con Ach, no fue hasta el 2022, donde se realiza un estudio por investigadores eslovenos en el que comprueban que el timol a la dosis de 0.2 mM inhibe las contracciones inducidas con Ach en útero de rata no gestante de manera dependiente a la contracción.(49,50) En la actualidad, no existen más estudios que hablen del efecto espasmolítico del timol en útero de rata gestante en diferentes tipos de contracciones.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El PP constituye un problema de salud pública a nivel mundial constituyendo 13.5 – 15.2 millones de niños nacidos por este síndrome además es la primera causa de muerte en infantes de 5 años.(9)El infante es altamente propenso a desarrollar consecuencias físicas en su desarrollo como por ejemplo: displasia broncopulmonar, retinopatía de prematuridad, hemorragia intracerebral, retraso en el desarrollo del habla y conducta, aumento de probabilidad de tener problemas cardiovasculares, tromboembolismo venoso, sepsis y enterocolitis necrosante, en especial estos últimos dos padecimientos con un porcentaje del 51% en la población nacida por PP.(51,52) Por otra parte, la tasa de morbilidad es más alta en México que en los países con alto ingreso, la expectativa de vida de los recién nacidos que no tienen cuidados intensivos neonatales es de 4, 8 y 28 años de vida para los infantes nacidos en las semanas 24-26, 27-29, y 30-33 respectivamente, sin embargo, cuando los infantes tienen cuidados intensivos su expectativa de vida aumenta 32, 51 y 63 años respectivamente y evitó 9, 15 y 12 años de vida ajustados por discapacidad(AVAD), con costos incrementales por año infantil de 11.400, 9.500 y 3.000 dólares aproximadamente, respectivamente, en comparación con una alternativa sin cuidados intensivos. Los ICER de Los cuidados intensivos neonatales en las semanas 24 a 26, 27 a 29 y 30 a 33 fueron de 1200, 650 y 240 dólares por AVAD evitado respectivamente.(53)

No obstante, la intervención farmacéutica inmediata con tocolíticos para retrasar por un lapso de 48 h el nacimiento prematuro del producto, generan graves riesgos para la madre y el feto (preclamsia severa, hemorragias, retraso mental, muerte para madre y feto, etc.), además, que algunos de ellos no han sido aprobados por algunas instituciones farmacéuticas a través del mundo.(54) Por consiguiente, es necesario la búsqueda de nuevos fármacos que puedan ayudar a disminuir los casos del PP a través de la exploración de los compuestos herbales.(55) Al respecto, en el timol se ha encontrado tener un efecto espasmolítico y antiinflamatorio en diversos estudios, por lo mismo, se realizarán las siguientes

preguntas ¿Cuál será el efecto útero- relajante del timol en útero de rata gestante?
Y ¿Cuál sería su posible mecanismo de acción?

IV. JUSTIFICACIÓN

El nacimiento prematuro de un bebé representa un horizonte adverso y áspero para el recién nacido, para la familia y para el sector salud porque se enfrentan a consecuencias como ceguera, hemorragias intracerebrales, convulsiones, lento aprendizaje, retraso mental y otros problemas en su neurodesarrollo esto sin considerar el gran desgaste mental y emocional para la madre y familia; así mismo el PP implica un alto costo para el sector salud y la familia.

Si bien es cierto que los tocolíticos de primera línea son eficaces en la amenaza del PP presentan efectos secundarios que ponen en riesgo al binomio, es por eso la búsqueda de nuevos fármacos que tengan efectividad, potencia y sobre todo con mayor seguridad en su uso.

La presente investigación desarrolla y describe el efecto útero relajante del timol, el cual inhibe las contracciones uterinas comparándolo con el nifedipino (tocolítico de primera línea) y su isómero carvacrol mostrando eficiencia y potencia; es probable que compartan un mecanismo de acción al inhibir las contracciones uterinas, actualmente, poco se sabe del mecanismo de acción del timol en su efecto espasmolítico, es así como se abre una oportunidad de investigaciones futuras para proponer al timol como un fármaco ideal como un posible tocolítico.

V. HIPÓTESIS

El timol inhibe las contracciones uterinas de rata gestante, entonces el timol tendrá propiedades útero-relajante en tejido uterino de rata gestante y posiblemente su mecanismo de acción sea a través del aumento de AMPc.

VI. OBJETIVO

6.1 Objetivo general

Determinar el efecto tocolítico del timol, así como su posible mecanismo de acción en útero aislado de rata Wistar gestante.

6.2 Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto útero relajante del timol a concentraciones crecientes en contracciones fásicas espontáneas de útero gestante aislado de rata para determinar los parámetros farmacológicos CI_{50} y R_{max} .
2. Determinar el efecto útero relajante del timol a concentraciones crecientes sobre las contracciones fásicas inducidas con $PGF_{2\alpha}$ para determinar los parámetros farmacológicos CI_{50} y R_{max} .
3. Evaluar el efecto útero relajante del timol a concentraciones crecientes sobre contracciones tónicas inducidas con KCl en tiras uterinas de rata gestante para determinar los parámetros farmacológicos CI_{50} y R_{max} .
4. Evaluar el efecto útero relajante del timol en contracciones tónicas en curvas acumulativas de calcio para determinar los parámetros farmacológicos CI_{50} y R_{max} .
5. Estudiar el posible mecanismo de acción del timol a través de las concentraciones de AMPc en útero de rata gestante.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Contexto de la investigación

La parte experimental del efecto tocolítico del timol se llevó a cabo en el centro de investigación en biología de la reproducción, ubicado en el área académica de Medicina Dr. Eliseo Ramírez Ulloa no. 400 Col. Doctores de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto, Hidalgo en el período del 1 de

marzo al 30 de septiembre del 2023 a la par de la recolección y organización de resultados, posteriormente, la parte experimental del mecanismo de acción del timol a través del AMPc se llevará a cabo en el laboratorio de inmunología ubicado en cuarta etapa del Instituto de Ciencias de la Salud, carretera Pachuca-Actopan, camino a Tilcuautla s/n, pueblo San Juan Tilcuautla, Hidalgo en el periodo de 20 de febrero al 8 de marzo del 2024, posteriormente se realizó la descripción de los resultados, análisis estadístico y escritura de tesis.

7.2 Tipo de estudio

El estudio presente fue biomédica básica, de tipo experimental y transversal, de alcance analítico.

7.3 Selección de la población

7.3.1 Criterios de inclusión

Ratas gestantes de la línea Wistar

Ratas gestantes entre los días 15 y 19 de gestación

Ratas gestantes con un peso entre 200 g y 250 g

Buen estado de salud

7.3.2 Criterios de exclusión

Ratas gestantes que se les haya suministrado algún fármaco antes de la eutanasia

Ratas con labor de parto antes del día 14

Reporte enfermedad o infección en la rata

7.3.3 Criterios de eliminación

Tejidos que no tenga respuesta contráctil

7.3.4 Animales de experimentación

Se usaron 22 ratas hembra gestantes de la línea Wistar cuya edad gestacional oscilaba entre los días 15 a 19 días de gestación, contados a partir del día en que se presentó tapón espermático en introito vaginal; se mantuvieron de acuerdo con los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999 (56), ciclos de 12/12 luz / oscuridad, comida y agua *ad libitum*. La eutanasia realizada fue por dislocación cervical para las ratas y las crías obtenidas de los úteros; para su posterior desecho como “Residuo Peligroso Biológico Infeccioso” (RPBI).

7.3.5 Fármacos

Los compuestos utilizados fueron: timol 98.5%, carvacrol $\geq 98\%$, nifedipino $\geq 98\%$, Prostaglandina $F_{2\alpha}$, dimetil sulfónico $\geq 99.9\%$, Forskolina, etanol 99%, fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich^{MR}. Antibióticos, penicilina-estreptomina (10000 U/ml) fue adquirido en ThermoFischer Scientific.

7.3.6 Reactantes

Se utilizaron los siguientes reactantes: cloruro de Sodio (NaCl), bicarbonato (NaHCO_3), cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl_2), glucosa, los cuales se disolvieron en agua bidestilada. También se usaron medio Eagle modificado de Dulbecco, tampón fosfato salino PBS 10x para la cuantificación de AMPc, los cuales fueron comprados en ThermoFischer Scientific.

7.3.7 Diagrama de diseño experimental

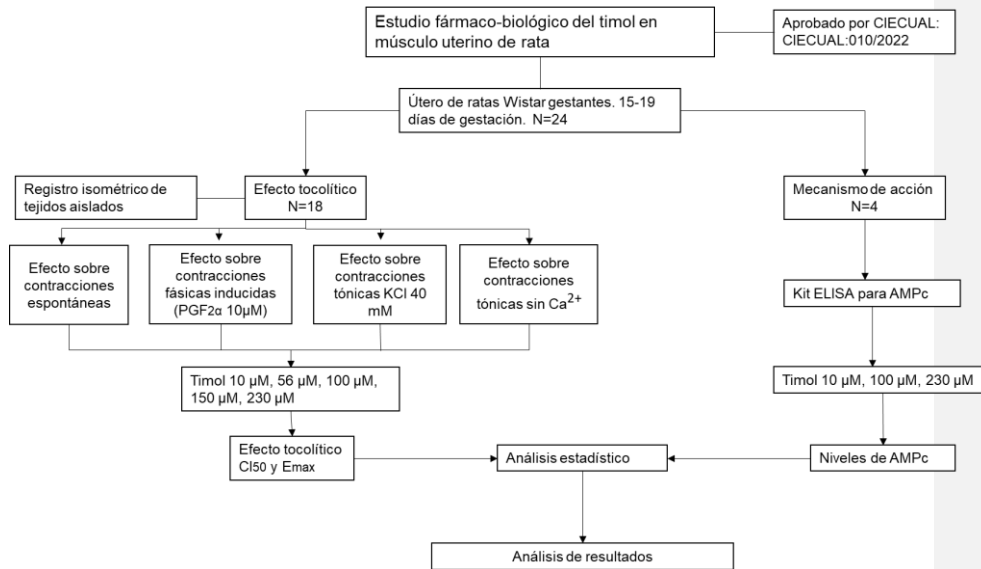


Figura 3. Diseño experimental

7.3.8 Pruebas experimentales (Principio y procedimiento)

Registro isométrico de tejidos aislados

Principio

Para evaluar el efecto útero relajante del timol sobre los diferentes tipos de contracciones del tejido uterino aislado de rata gestante 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 a través de un transductor de tensión y un programa que digitaliza la información; con los datos obtenidos de las mediciones de los trazos se pueden cuantificar los parámetros farmacológicos concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) y la respuesta máxima ($R_{máx}$) utilizando estímulos electromecánicos y fármaco-mecánicos.(57)

Procedimiento

Las ratas fueron sacrificadas entre los días 15 – 19 de gestación en cámaras de CO₂ seguido de dislocación cervical. A continuación, se realizó un corte horizontal de ángulo costal a ángulo costal y un corte en la línea media del abdomen con tijera quirúrgica y pinzas de disección para poder extraer el útero y colocarla en solución Ringer Locke (SRL glucosa: 2.77 mM, NaCl: 1.54 mM, NaHCO₃: 5.95 mM, KCl 5.63 mM, CaCl₂: 1.2 mM) para la extracción de las crías de cada cuerno uterino. Se procedió con la limpieza del tejido retirando la línea de cotiledones, adherencias placentarias y tejido graso. El tejido se recolocó en SRL limpio y se lavó para retirar restos de sangre permitiendo obtener 10 tiras uterinas de 6mm x 10 mm; en cada extremo de la tira uterina se colocó hilo de seda para anclar un extremo en la base de las cámaras y el otro extremo al transductor de tensión FT03. Cada cámara fue llenada con SRL con un volumen de 3 ml y se mantuvo a 37° C hasta finalizar el experimento.

Los tejidos fueron mantenidos en las cámaras con SRL de manera constante, a una tensión de 1 g y con burbujeo invariable de gas carbógeno al 95% O₂ y 5% de CO₂ y 5% de CO₂. Las muestras tisulares fueron sujetas a un periodo de estabilización (30 min – 1 h) durante los cuales se hizo recambio de SRL cada 15 min.

Las concentraciones de timol y carvacrol utilizadas fueron: 10, 56, 100, 150 y 230 μM; para nifedipino fueron: 1, 7, 18, 34, 56, 83 y 100 nM.

A partir que el tejido se estabilizó, se inició el modelo experimental:

Evaluación del efecto útero relajante del timol en contracciones fásicas inducidas con PGF_{2α} 10 μM.

Comentado [AP1]: 10 micro molar

Tras la estabilización del tejido uterino, se estimuló fármaco-mecánicamente con PGF_{2α} y se dejó incubar por 15 min para su posterior administración del timol a

diferentes concentraciones (n=6) para evaluar el efecto útero relajante y la interpretación de los resultados.

Evaluación del efecto útero relajante del timol en contracciones tónicas con KCl

El tejido fue estimulado electromecánicamente con KCl (40 mM) y se dejó incubar por 15 min, se colocó timol en diferentes concentraciones (n=6) para estudiar el efecto útero relajante y la interpretación de los resultados.

Evaluación del efecto útero relajante del timol en contracciones tónicas con KCl sin Ca^{2+} en curvas acumulativas.

Después de la estimulación electro-mecánica de las tiras uterinas con KCl sin Ca^{2+} , se expuso el tejido al timol a diferentes concentraciones (n=6) y se dejó incubar por 15 min, posteriormente se realizó exposiciones de Ca^{2+} (0.5 mM) cada 10 min hasta llegar a una concentración de 1.5 mM para estudiar un posible mecanismo de acción y la interpretación de resultados.

Las respuestas contráctiles de cada tipo de contracción 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 Muñoz-Pérez et al.(58,59)

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

$$\% \text{ inhibición} = 100\% - (\text{ABCr}/\text{ABCi}) * 100.(58)$$

Donde ABCr es el área bajo la curva medido en cm^2 previo a la exposición al fármaco y ABCi es el área bajo la curva medido en cm^2 posterior a la exposición al fármaco.(56)(3).

Determinación de AMPc en músculo liso uterino

Principio

Para determinar un posible mecanismo de acción a través de la producción de los niveles de AMPc del timol en su efecto útero – relajante en tejido muscular uterino se utilizó un ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA) de AMPc basado en la competitividad del AMPc de las muestras biológicas y el conjugado de AMPc con fosfatasa alcalina (AMPc – AP) para unirse con el anticuerpo monoclonal de AMPc ligado a un IgG de anti conejo que se encuentra pre revestido en la placa 96 pocillos; con los datos obtenidos por densitometría óptica se pueden cuantificar los niveles de AMPc generados por el timol utilizando estímulos fármaco-mecánicos.(60)

Procedimiento

Las ratas fueron sacrificadas entre los días 15 – 19 de gestación en cámaras de CO₂ seguido de dislocación cervical. A continuación, se realizó un corte horizontal de ángulo costal a ángulo costal y un corte en la línea media del abdomen con tijera quirúrgica y pinzas de disección para poder extraer el útero y colocarla en solución PBS 1x para la extracción de las crías para su posterior lavado. El tejido se colocó en PBS 1x limpio permitiendo realizar cortes de tiras uterinas con un peso aproximado a 100 mg para su posterior colocación en placas de cultivo de 24 pozos que contenían un 1 mL de medio de cultivo DMEM alto en glucosa adicionado con 5 ml de suero fetal bovino y 500 µl penicilina y estreptomina.

Las placas con el tejido tisular se mantuvieron en incubación a temperatura constante de 37° C con 5% de CO₂ en un ambiente húmedo por 2 h para la estabilización de las tiras uterinas.

Subsecuente al periodo estabilización del tejido, se le agregó a cada pocillo 10 µg/mL de LPS y las concentraciones crecientes de timol y carvacrol (10 µM, 100 µM, 230 µM), ambas con y sin 10 µL de Forskolina (10 µM) en duplicados (n=4) para su posterior incubación por 24 h en las condiciones anteriormente

mencionadas. Al concluir este lapso, se colectaron las tiras uterinas en tubos Eppendorf que contenían 150 μ L de PBS 1x y 200 μ L de HCl 0.01 M para su congelación y almacenamiento por 72 h.

Las muestras congeladas fueron homogenizadas con un homogeneizador BioSpec tissue – tearor. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del protocolo del kit ELISA y las concentraciones de AMPc fueron determinadas a 405 nm usando un espectrofotómetro MultiSkan EX (Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia).(58)

Análisis estadístico

Los datos obtenidos del efecto tocolítico fueron procesados en el software GraphPad Prism 8 por medio de un análisis de regresión para determinar los valores del parámetro IC_{50} , concentración que alcanza el 50% del efecto inhibitor máximo, (potencia) y el $E_{m\acute{a}x}$, valor máximo de respuesta inhibitoria por la concentración más alta (eficacia), posteriormente se aplicó una prueba ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* Dunnet. Todos los datos son expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) siendo $p < 0.05$ considerado como estadísticamente significativo.

VIII. RESULTADOS

8.1 Efecto útero – relajante del timol en contracciones espontáneas

Se calculó el efecto espasmolítico del timol en contracciones espontáneas, para esto, las muestras de tejido estuvieron tensadas a 1 g en Ringer Locke a 37° C irrigado con gas carbógeno de manera constante. En la figura 4 los resultados arrojaron que el timol en su mínima concentración 10 μ M el porcentaje de inhibición es de 11.3% y en su máxima concentración 230 μ M tiene una inhibición del 82.3% de manera dependiente a la concentración. Con respecto a las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$ y $p < 0.001$) se pueden observar entre las

concentraciones 56, 100, 150 y 230 μM ; sin embargo, entre la 10 y 56 μM no se registró una diferencia significativa. En la figura 5 se representa el trazo típico de la inhibición de la contracción uterina espontánea.

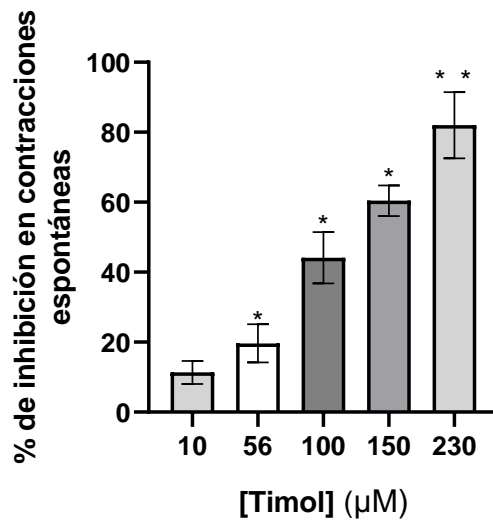


Figura 4. Efecto útero relajante del timol sobre contracciones espontáneas. Cada columna representa la media de 6 experimentos ($n=6$) con su respectivo EEM en forma de barras verticales, los asteriscos (*) representan la diferencia estadísticamente significativa entre cada concentración, $p<0.05$, ** $p<0.001$. Prueba ANOVA seguida de una prueba de comparación múltiple Bonferroni. La inhibición de la contracción fue dependiente a la concentración del fármaco.

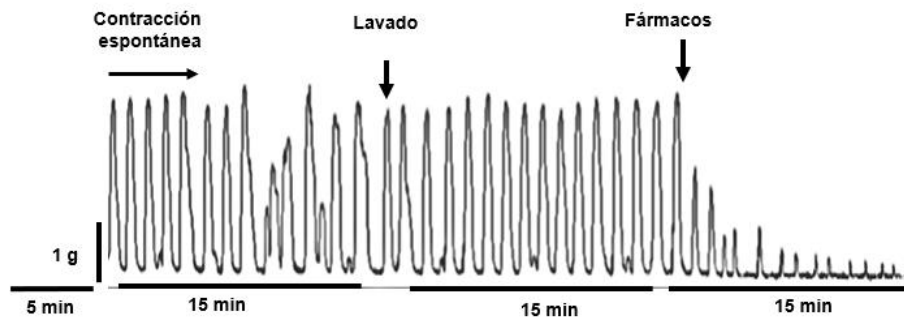


Figura 5. Trazo típico de la contracción espontánea. Trazo típico de la contracción espontánea; este tipo de contracción fue inhibida por los fármacos timol, carvacrol y nifedipino. La barra vertical en el borde inferior izquierdo representa la fuerza de tensión que fue estabilizado el tejido antes de iniciar el experimento. La barra horizontal indica el tiempo transcurrido.

8.2 Efecto inhibitorio del timol en contracciones fásicas inducidas con $\text{PGF}_{2\alpha}$

El efecto máximo útero relajante del timol en contracciones fásicas inducidas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ 10 μM en la concentración de 230 μM es de 84.50% de inhibición y un porcentaje mínimo en la concentración más baja de 10 μM de 11.53% de inhibición, se puede observar que la respuesta de relajación del fármaco es de manera dependiente a la concentración (figura 6).

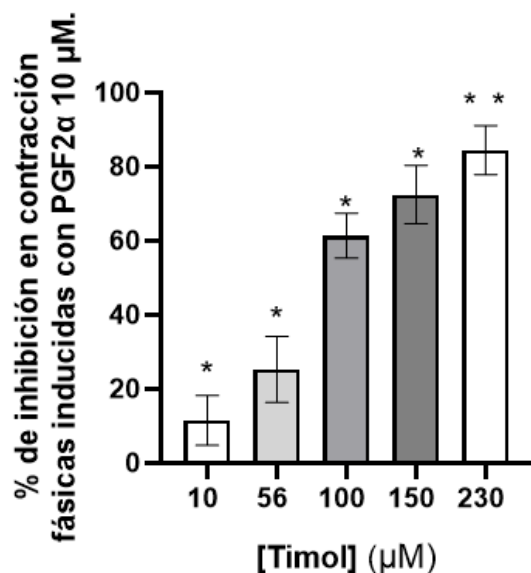


Figura 6. Efecto útero-relajante del timol en contracciones fásicas inducidas con PGF_{2α}. Cada columna representa la media de 6 experimentos (n=6) con su respectivo EEM en forma de barras verticales, los asteriscos (*) representan la diferencia estadísticamente significativa entre cada concentración, * p<0.05, ** p<0.001. Prueba ANOVA seguida de una prueba de comparación múltiple Bonferroni. La inhibición de la contracción fue dependiente a la concentración del fármaco.

8.3 Efecto útero relajante del timol en contracciones tónicas inducidas con KCl 40 mM

Los resultados del efecto relajante del timol en contracciones tónicas con KCl se observan en la figura 7, el porcentaje máximo de la inhibición es de 100% en su concentración máxima (230 μM) y un porcentaje mínimo de inhibición de 15.99% en la concentración de 10 μM de manera dependiente a la concentración.

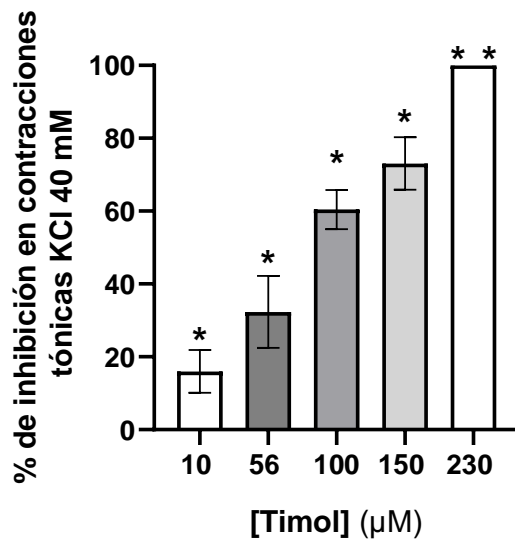


Figura 7. Efecto útero-relajante del timol en contracciones tónicas inducidas con KCl 40 mM Cada columna representa la media de 6 experimentos (n=6) con su respectivo EEM en forma de barras verticales, los asteriscos (*) representan la diferencia estadísticamente significativa entre cada concentración, * p<0.05, ** p<0.001. Prueba ANOVA seguida de una prueba de comparación múltiple Bonferroni. La inhibición de la contracción fue dependiente a la concentración del fármaco K⁺ 40 mM + Ca²⁺

8.4 Curvas concentración – respuesta del timol y carvacrol con nifedipino en contracciones inducidas con PGF_{2α}.

Se hizo la comparación de las curvas sigmoideas dependientes de concentración del efecto relajante en las tiras uterinas sobre contracciones fásicas inducidas con PGF_{2α} 10 μM de los fármacos timol y carvacrol y se compararon con el bloqueador

de canales de Ca^{2+} nifedipino (control) (figura8). La curva de nifedipino se encuentra desplazada totalmente alcanzó un 96.8% de inhibición en el orden de 10^{-7} M (concentraciones nano molares) a comparación de las curvas de timol y carvacrol se encuentran en la misma posición en el orden 10^{-4} (concentraciones micro molares). Se determinaron los parámetros farmacológicos del timol $\text{CI}_{50} = 87.4$, $\text{R}_{\text{max}} = 84.5$ (230 μM) y del carvacrol $\text{CI}_{50} = 144.9$ y $\text{R}_{\text{max}} = 95.5$ en su concentración máxima (230 μM), demostrando así que el fármaco más potente es el nifedipino seguido de timol y por último carvacrol. En relación con la eficacia solamente hubo diferencias significativas entre nifedipino y timol.

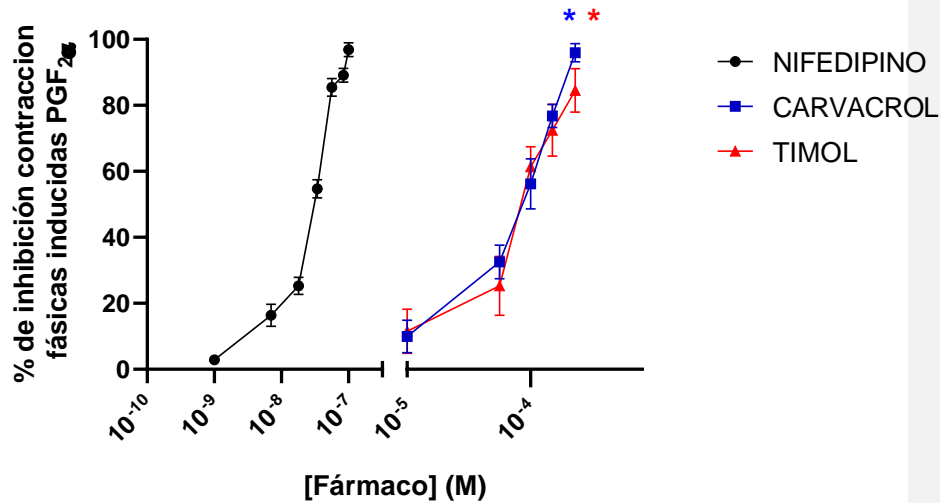


Figura 8. Curva concentración - respuesta del efecto del timol, carvacrol y nifedipino (control) en contracciones fásicas inducidas con $\text{PGF}_{2\alpha}$. Datos obtenidos a través de una prueba de regresión lineal. Se observa un desplazamiento a la izquierda del nifedipino lo cual demuestra que el más potente. Posteriormente en potencia está el timol y por último el carvacrol. Respecto a la efectividad, solamente hubo diferencia significativa entre timol y nifedipino. Cada punto en la gráfica se indica el promedio de cada concentración utilizada para el nifedipino, carvacrol y timol; las

barras verticales representan el EEM; los (*) representan la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparado con el control. La inhibición fue dependiente a la concentración.

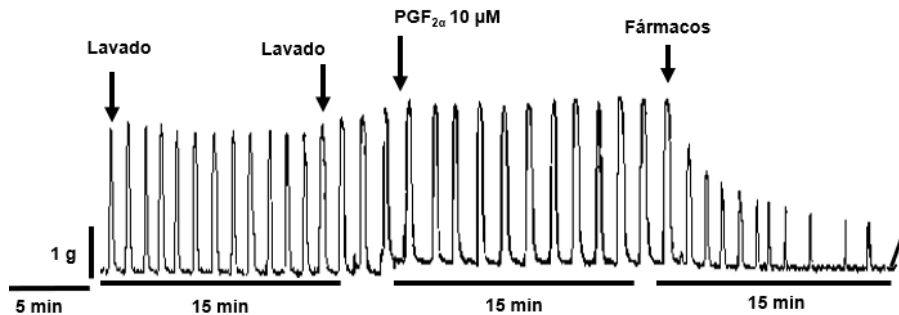


Figura 9. Trazo típico de la contracción fásica inducida con $\text{PGF}_{2\alpha}$ $10 \mu\text{M}$. Trazo típico de la contracción fásica inducida con $\text{PGF}_{2\alpha}$; este tipo de contracción fue inhibida por los fármacos timol, carvacrol y nifedipino. La barra vertical en el borde inferior izquierdo representa la fuerza de tensión que fue estabilizado el tejido antes de iniciar el experimento. La barra horizontal representa el tiempo transcurrido.

8.5 Curva concentración – respuesta del timol, carvacrol y nifedipino en contracciones tónicas inducidas con KCl.

Se comparó el efecto útero – relajante del timol, carvacrol y nifedipino (control) sobre contracciones tónicas inducidas con KCl en una curva logarítmica que muestran las curvas sigmoideas dependientes de la concentración (figura10). Se puede observar que el nifedipino está desplazado en el orden 10^{-7} tiene una mayor potencia y eficacia en comparación del timol y carvacrol. El timol y carvacrol son equieficentes con un 100% de inhibición sin embargo el timol (CI_{50} 79.98 ± 1.98) muestra tener más potencia que el carvacrol (CI_{50} 99.98 ± 3.6). No hubo diferencia significativa entre timol y carvacrol; solamente comparados con nifedipino.

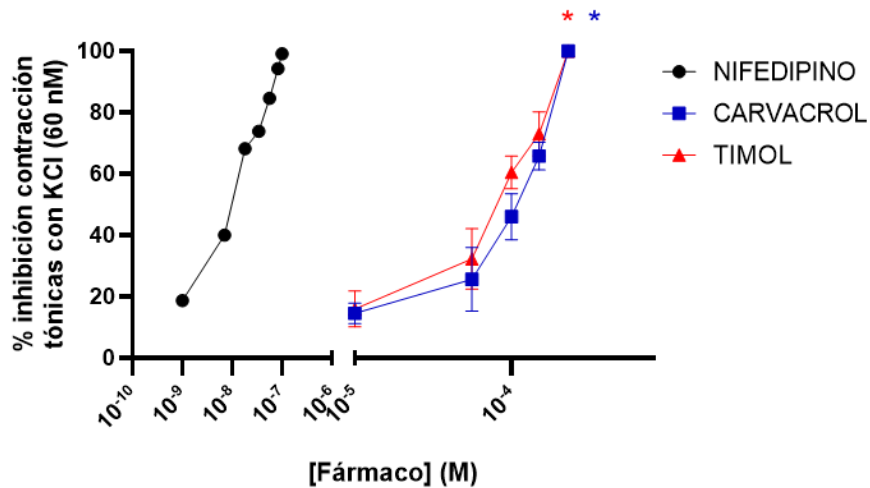


Figura 10. Curva concentración – respuesta del timol, carvacrol y nifedipino (control) en contracciones tónicas inducidas con KCl. Datos obtenidos por medio de una prueba de regresión lineal. Se observa un desplazamiento total hacia la izquierda de la curva sigmoidea del nifedipino lo cual indica una mayor potencia y eficacia. El timol y carvacrol son equivalentes en eficacia mientras que en potencia seguido del nifedipino es el timol y en último lugar el carvacrol; Cada punto en la gráfica se indica el promedio de cada concentración utilizada para el nifedipino, carvacrol y timol; las barras verticales representan el EEM; los (*) representan la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparado con el control.

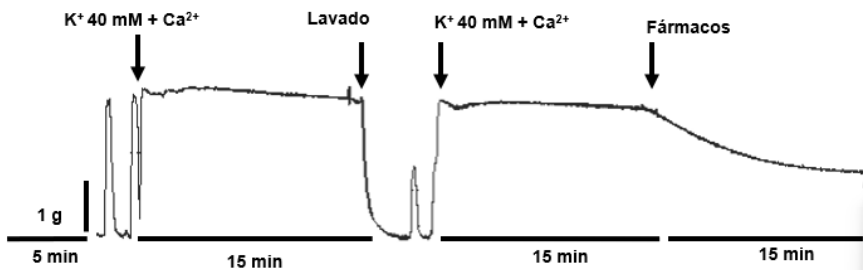


Figura 11. Trazo típico de la contracción tónica inducida con KCl 40 mM Trazo típico de la contracción tónica inducida con KCL 40 mM; este tipo de contracción fue inhibida por los fármacos timol, carvacrol y nifedipino. La barra vertical en el borde inferior izquierdo representa la fuerza de tensión que fue estabilizado el tejido antes de iniciar el experimento. Las barras horizontales indican el tiempo transcurrido.

8.6 Curva concentración – respuesta del timol, carvacrol y nifedipino en contracciones tónicas con KCl sin Ca^{2+} .

Se realizó la comparación de las curvas sigmoideas dependientes de concentración del efecto relajante en útero de ratas gestantes sobre contracciones tónicas inducidas con KCl sin Ca^{2+} de los fármacos timol y carvacrol y se compararon con el bloqueador de canales de Ca^{2+} se observa en la figura 11. La curva sigmoidea del nifedipino se desplazada drásticamente hacia la izquierda en el orden 10^{-7} resultando que este fármaco tiene mayor potencia y eficacia, el timol tiene mayor potencia que el carvacrol con un IC_{50} de 76.75 ± 8.64 y un 100% de inhibición en comparación al carvacrol con un 98.3% de inhibición. El trazo típico de la inhibición de la contracción tónica inducida con KCl sin Ca^{2+} se observa en la figura 12.

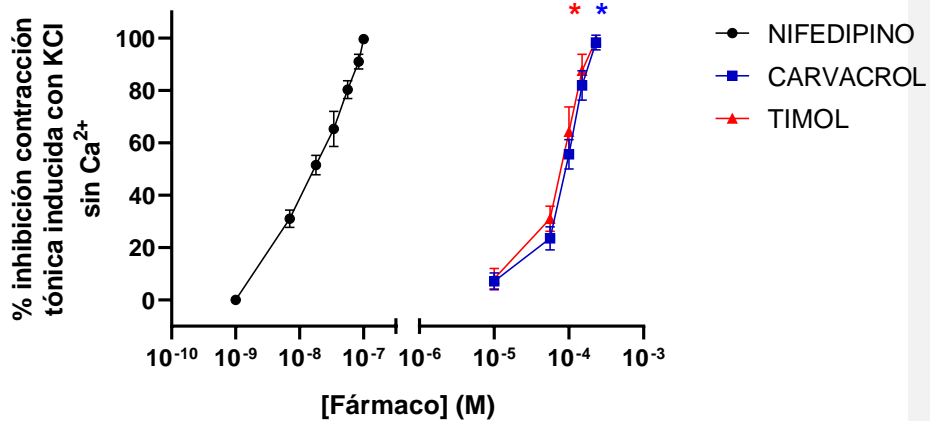


Figura 11. Curva concentración – respuesta del efecto del timol, carvacrol y nifedipino (control) en contracciones tónicas inducidas con KCl sin Ca^{2+} . Datos obtenidos por medio de una prueba de regresión lineal. Se observa un total desplazamiento de la curva sigmoide del nifedipino indica mayor potencia y efectividad comparado con el timol y carvacrol, seguido en potencia y efectividad por el timol y al último el carvacrol. Cada punto en la gráfica indica el promedio de cada concentración utilizada para timol, carvacrol y nifedipino; las barras verticales representan el error estándar de la médica (EEM); los (*) representan la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparado con el control. La inhibición fue dependiente a la concentración.

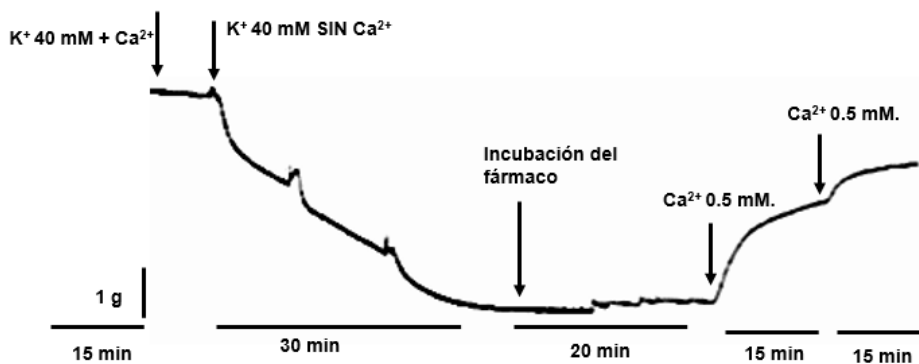


Figura 12. Trazo típico de la contracción tónica inducida con KCl sin Ca^{2+} . Trazo típico de la contracción tónica inducida con KCl sin Ca^{2+} ; este tipo de contracción fue inhibida por los fármacos timol, carvacrol y nifedipino. Las barras horizontales representan el tiempo transcurrido en la condición experimental. La barra vertical en el borde inferior izquierdo representa la fuerza de tensión que fue estabilizado el tejido antes de iniciar el experimento.

Tabla. 1. IC_{50} y R_{max} de timol, carvacrol y nifedipino

Contracción	Fásicas inducidas con $PGF_{2\alpha}$		Tónicas inducidas con KCl		Tónicas inducidas con KCl sin Ca^{2+}	
	IC_{50} (μM)	R_{max} (%)	IC_{50} (μM)	R_{max} (%)	IC_{50} (μM)	R_{max} (%)
Timol	87.4±2.48*	84.5 ± 2.71	79.98±1.98 *	100 ± 0	76.75*±8.64	100 ± 0
Carvacrol	144.9±7.56*	95.5 ± 2.5	99.98±3.6*	100 ± 0	88.59±9.3*	98.6 ± 3.3
Nifedipino	2.86e-8 ± 0125	99.6	8.71e-9 ± 0.0051	100 ± 0	1.6 e-8 ± 0.236	100 ± 0

Los resultados son expresados en la media \pm EEM de los fármacos. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre timol y carvacrol fueron comparados con la IC_{50} de nifedipino (control). EEM: Error estándar de la media, IC_{50} : Concentración inhibitoria 50; R_{max} : respuesta máxima; * diferencia estadísticamente significativa comparado con nifedipino.

8.7 Cuantificación de AMPc

La figura 13, muestra las concentraciones de AMPc inducidas por los compuestos timol, carvacrol y Forskolina. El activador de la enzima AC, Forskolina, aumento a 124 pmol/ ml de AMPc en el útero de rata gestante comparado con el valor basal ($p < 0.001$), que no se modifica por el DMSO (Control, +), disolvente de los compuestos. Se observa que timol y carvacrol en 10, 100 y 230 μM no estimulan los niveles de AMPc. Aunado a esto, ambos compuestos en combinación con forskolina disminuyen los niveles de AMPc en comparación con el control Forskolina solo de manera dependiente a la concentración ($p < 0.05$), siendo carvacrol en la concentración de 230 μM el que más disminución de este segundo mensajero presenta.

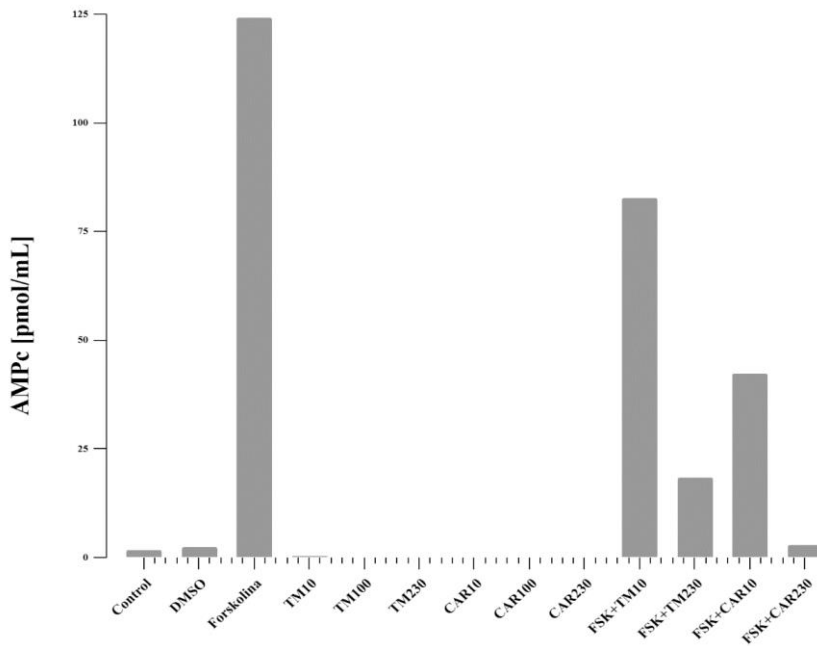


Figura 13. Concentraciones de AMPc por timol, carvacrol y forskolina en muestras uterinas de rata gestante. La acumulación de AMPc por solo (6 μ M) y combinado con timol y carvacrol se obtuvieron a concentraciones crecientes (10, 100 y 230 μ M). Cada columna representa la media de cuatro experimentos (n=4) para timol, carvacrol y forskolina; las barras verticales representan el error estándar de la media (\pm EEM). TM = Timol; Car= Carvacrol; FSK = forskolina. † = Diferente de la basal; * = diferente de forskolina ($p < 0.05$); ** = diferente de forskolina ($p < 0.001$).

IX. DISCUSIÓN

El parto prematuro es el nacimiento del producto antes de la semana 37 de embarazo siendo de etiología multifactorial. Las cifras de bebés nacidos por PP son aproximadamente 15 millones de infantes a nivel global convirtiéndolo en el 9.9% de los nacimientos mundiales. Este síndrome trae consigo en muchos sobrevivientes problemas de salud y de desarrollo incluyendo la muerte prematura en infantes.(1,25) El tratamiento con tocolíticos usados actualmente generan efectos secundarios que ponen en riesgo la vida del producto y de la madre; siendo esta la razón de buscar nuevos compuestos que disminuyan el impacto de reacciones adversas y sean efectivos en la prevención del PP.(55)

De manera dependiente a la concentración, el timol inhibe las contracciones fásicas espontáneas en tiras uterinas de rata gestante siendo este estudio el primero en realizarse en este tipo de contracción además de contracciones inducidas con $\text{PGF}_{2\alpha}$, KCl y Ca^{2+} acumulativo. Nuestros resultados son congruentes con estudios realizados en otros músculos lisos de rata y cobayo donde muestra una inhibición de la contracción de manera dependiente a la concentración.(50,61-63)

El tejido muscular uterino está compuesto de células llamadas miocitos uterinos, las cuales están especializadas en la contracción y quiescencia del útero; estas se encuentran recubiertas de diferentes receptores que intervienen en la labor de parto.(64) La comunicación de estas células a través de uniones estrechas (gap en inglés) permiten el constante intercambio de iones responsables de producir los potenciales de acción necesarios para las contracciones.(65) Al inducir un cambio electroquímico con una solución alta en potasio (K^+) provocan una despolarización de la membrana causando un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular.(66)

Respecto a las contracción tónicas; el presente estudio mostró la inhibición de la contracción tónica inducida con KCl con Ca^{2+} de manera dependiente a la concentración (10 μM a 230 μM), así mismo, se observó que fue capaz de inhibir al

100% la contracción en su concentración más alta ($R_{m\acute{a}x}=100\%$) estos descubrimientos concuerdan con estudios realizados en íleon y yeyuno de cobayo y tráquea de rata en el cual el timol inhibe las contracciones inducidas con KCl de manera dependiente a la concentración, al igual que mostró tener un efecto broncodilatador en tráquea de cuyo en altas concentraciones (10^{-4} M).(61,62) En nuestro estudio la CI_{50} del timol y carvacrol de las contracciones inducidas con KCl 40 mM fue de 79.98 ± 1.98 y 99.98 ± 3.6 respectivamente, similar a un estudio de Peixoto – Neves que muestra una CI_{50} de 64.40 ± 4.41 para timol y 78.8 ± 11.91 en una concentración de KCl 60mM(63), lo cual sugiere que el posible mecanismo de relajación del timol podría interferir en el acoplamiento electromecánico, ya que esta contracción está relacionada con el cambio electroquímico de los iones a la célula a través de los diferentes canales que están en la membrana celular.

La apertura de los canales de Ca^{2+} permite que ingrese el Ca^{2+} a la célula, provocando un aumento de las concentraciones del mismo; esto es el factor principal del inicio de la cascada de señalización que permite la contracción del músculo(15), los resultados de este estudio evidenciaron una inhibición del 100% de la contracción en su concentración más alta (230 μ M) de manera dependiente a la concentración en contracciones inducidas con Ca^{2+} de forma acumulativa, estos hallazgos son consistentes con estudios realizados en músculo liso de cuyo, miocardio de perro y músculo esquelético de perro, rana y rata.(67-70)

De hecho, para estudiar si el posible mecanismo de acción del timol en la inhibición de la contracción del miometrio es debido al bloqueo de los canales de Ca^{2+} se comparó con el tocolítico nifedipino y con su isómero carvacrol. El nifedipino es un efectivo y potente antagonista de los canales de calcio tipo L, bloqueando la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula lo cual impide la contracción del músculo liso uterino.(71) Debido a la evidencia encontrada en los estudios mencionados, se puede sugerir que el timol es un posible bloqueador parcial de los canales de calcio.

Timol y carvacrol muestran un comportamiento similar en las curvas sigmoideas sugiriendo que pueden compartir el mismo mecanismo de acción; de hecho, el carvacrol bloquea la entrada de calcio en miocardiomiocitos ventriculares de humano y perros, así como también induce la inhibición de las contracciones del músculo liso arterial y uterino de rata gestante a través del mismo mecanismo. Con respecto a la potencia entre timol y carvacrol mostró el primero ser más potente a menor concentración. Sin embargo, ambos son equiefectivos pues obtienen el 100% de la inhibición en su concentración más alta en las contracciones tónicas con Ca^{2+} acumulativo.(59,72,73) Se necesita hacer estudios moleculares más específicos para poder discernir que característica hace al timol más potente que el carvacrol.

Las prostaglandinas (PG) son ácidos lipídicos derivados enzimáticamente del ácido araquidónico (AA) a través de enzimas llamadas ciclooxigenasas (COX-1, COX-2). El AA se libera de las membranas plasmáticas a través de la acción enzimática de la fosfolipasa A o por medio del segundo mensajero DAG derivado de la fosfolipasa C (PLC).

En la naturaleza se originan 4 tipos de prostaglandinas: Prostaglandina E2 (PGE2), prostaciclina (PGI), prostaglandina D2 y prostaglandina F_{2α}; esta última juega un rol importante en la reproducción femenina como ovulación, lútea lisis, contracción del músculo liso y siendo un inductor del parto. En las células del músculo uterino se encuentran receptores específicos de la prostaglandina perteneciente a la familia de proteínas Gq transmembranales. Cuando la PGF_{2α} se une a su receptor sufrirá un cambio conformacional cambiando el GDP al GTP y la subunidad α de la proteína se separará del complejo y estimulará a fosfolipasa C generando segundos mensajeros: DAG e IP₃, siendo este el que estimula los receptores de este mensajero presentes en el retículo sarcoplásmico provocando la liberación de Ca^{2+} de este reservorio provocando como consecuencia la contracción.(74) Las concentraciones de PGF_{2α} en el momento del parto son máximas provocando la

estimulación de la contracción del miometrio, ablandamiento cervical e inducción de las conexiones GAP, es por ello que elegimos en este proyecto usar a $PGF_{2\alpha}$ como inductor de la contracción.(75)

Esta investigación presentó una inhibición máxima de la contracción inducida con $PGF_{2\alpha}$ de 84.5 % en la concentración máxima de 230 μM de timol siendo estos resultados consistentes con Meister y cols en el cual el extracto de *Thymus vulgaris* en tiene una inhibición de la contracción de 89%.(31) El mecanismo de relajación no está bien estudiado, sin embargo, Pourya en su estudio descubrió que el timol reduce significativamente $p < 0.05$ los niveles COX-2, incluso fue más potente que la indometacina (tocolítico de primera línea; inhibidor de la producción de prostaglandina).(76) Así mismo, otros investigadores comprobaron la inhibición de COX-2 con timol a través de la reducción de los niveles PGE_2 (77), debido a esto se sugiere que el posible mecanismo de acción del timol en la inhibición de la contracción inducida por esta prostaglandina pueda ser a través del bloqueo de esta enzima, empero es necesario realizar más estudios para la comprobación de esta hipótesis.

El timol no incrementa los niveles de AMPc intracelular en útero de rata gestante

El monofosfato de adenosina cíclico AMPc, es un segundo mensajero importante en respuesta a diferentes hormonas y/o neurotransmisores en varios procesos fisiológicos celulares. Es generado a través de la estimulación de receptor acoplado a proteína Gs efectuando la activación de AC que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP. El proceso de relajación del músculo liso uterino es debido a la fosforilación de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) que se encarga de desactivar a MLCK produciendo la pérdida de afinidad del complejo calcio-calmodulina, la activación de MLCP depende del aumento del AMPc. En consecuencia, la PKA induce la relajación el músculo a través de la fosforilación de diferentes sustratos celulares, incluyendo factores de transcripción, canales iónicos, entre otros. En este trabajo, para confirmar que el efecto útero relajante del timol es

inducido por un aumento en los niveles de AMPc, se midió la producción de este segundo mensajero, utilizando la forskolina un activador del AC como control positivo.

El músculo liso uterino está inervado por el sistema nervioso autónomo, irrigando los vasos sanguíneos, glándulas y participando en la fisiología de los miocitos. La acetilcolina (ACh), sintetizada por la enzima colina-acetiltransferasa, es uno de los principales neurotransmisores distribuidos en el útero, teniendo diferentes respuestas fisiológicas a través de la estimulación de los diferentes receptores (M1-M5) que se encuentran acoplados a proteínas G. Los receptores M2 y M3 presentes en el útero de rata están asociados a la contractilidad del músculo.(76,77) El timol no estimula la producción de AMPc, al contrario, disminuye la concentración de este segundo mensajero. Pemrov y cols., en su estudio realizado con útero de rata no gestante, evidenciaron que el timol inhibe las contracciones inducidas con acetilcolina sugiriendo su mecanismo de acción como antagonista de los receptores muscarínicos.(77)La activación del receptor M2, acoplado a la proteína Gi produce la disminución del AMPc.(78) Al día de hoy, respecto al carvacrol este es el primer estudio que muestra esta actividad molecular a nivel de útero gestante.

CONCLUSIONES

El timol inhibe las contracciones fásicas espontáneas, inducidas con $\text{PGF}_{2\alpha}$, tónicas con KCl y Ca^{2+} acumulativo de manera dependiente a la concentración, además, que no estimula la producción la AMPc, es más inhibe su producción nasal y estimulada con forskolina. Se sugiere que el mecanismo de acción es a través de un bloqueo parcial de los canales de Ca^{2+} . Los resultados de este estudio sugieren al timol como un coadyuvante en el tratamiento para el parto prematuro.

RECOMENDACIONES PARA FUTURO

Para dar continuación a este proyecto se deberán realizar los siguientes estudios.

- Aumentar las concentraciones de timol para obtener una estandarización de la dosis necesaria en las contracciones fásicas.
- Realizar pruebas de fluorescencia con FURA2 con el Ca^{2+} para comprobar que el mecanismo de acción del timol es a través del bloqueo de los canales de calcio.
- Hacer pruebas en tejido uterino humano para extrapolar estos resultados.
- Realizar pruebas de inhibición en contracciones estimuladas con oxitocina y otros precursores del PP.
- Realizar pruebas de su acción antiinflamatoria e inmunoreguladora con kits ELISA IL-1 β , TNF- α y IL-10

ANEXOS



COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO

DICTÁMEN DE EVALUACIÓN

INSTITUTO: Área Académica de Medicina, Instituto de Ciencias de la Salud		FOLIO: CICAL/010/2022	
		FECHA DE SOLICITUD: 01-10-2022	
PROYECTO: Estudio de la actividad fármaco-biológica del timol en músculo liso uterino de rata		RESPONSABLE DEL PROYECTO: Dr. Víctor Manuel Muñoz Pérez victor_munoz9783@uaeh.edu.mx Tel: 7712380661	
INVESTIGADORES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO: Dr. Mario I. Ortiz Ramírez, Dr. Víctor Manuel Muñoz Pérez			
ALUMNOS O PASANTES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO: Aurora Pérez Sánchez			
ASPECTOS A EVALUAR	ACEPTABLE	NO ACEPTABLE	SUGERENCIAS
JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	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			
FECHA DE REVISIÓN	NEGADO		FECHA DE APROBACIÓN
06/10/2022	APROBADO	x	18/10/2022
Fecha de inicio: 18 /Octubre / 2022 Fecha de término: 15 /diciembre/ 2024			
CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES QUE SE PROPORCIONARÁN: 30 Ratas Wistar / hembras/ 13 – 17 días de gestación / 200 ± 280 g			

INVESTIGADOR PRINCIPAL 	PRESIDENTE CICAL Carlos Alberto Gómez Aldapa	DIRECTOR BIOTERIO Héctor Hernández Domínguez
----------------------------	---	---

REFERENCIAS

1. Ohuma EO, Moller AB, Bradley E, Chakwera S, Hussain-Alkhateeb L, Lewin A, et al. National, regional, and global estimates of preterm birth in 2020, with trends from 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2023; 402(10409):1261–1271.
2. Organización Panamericana de la Salud. Recomendaciones de la OMS sobre atención prenatal para una experiencia positiva del embarazo. 2018.
3. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health*. 2019; 7(1):e37–46.
4. Huertas Tacchino E. Parto pretérmino: causas y medidas de prevención. *Rev Peru Ginecol Obstet*. 2018; 64(3):399–404.
5. Walani SR. Global burden of preterm birth. *Int J Gynaecol Obstet*. 2020; 150(1):31–33.
6. Barfield WD. Public Health Implications of Very Preterm Birth *Clin Perinatol* 2018; 45(3):565–77.
7. Fernando F, Veenboer GJM, Oudijk MA, Kampman MAM, Heida KY, Lagendijk LJM, et al. TBX2, a Novel Regulator of Labour. *Medicina (Kaunas)*. 2021; 57(6):7–27.
8. Green ES, Arck PC. Pathogenesis of preterm birth: bidirectional inflammation in mother and fetus. *Semin Immunopathol*. 2020; 42(4):413–429.
9. Leimert KB, Xu W, Princ MM, Chemtob S, Olson DM. Inflammatory Amplification: A Central Tenet of Uterine Transition for Labor. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11:660983.

10. 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(4):403–415.
11. López-García B, Ávalos Antonio N, Díaz Gómez NB, López-García B, Ávalos Antonio N, Díaz Gómez NB. Incidencia de prematuros en el Hospital General Naval de Alta Especialidad 2015-2017. *Rev Sanid Milit* 2018; 72(1):19–23.
12. Lestrade ODT, Pacheco IH, Nuñez CM, Ledezma JCR. Infección urinaria como factor de riesgo para parto pretérmino. *JONNPR*. 2020; 5(11):1426–1443.
13. Ronzoni S, Boucoiran I, Yudin MH, Coolen J, Pylypjuk C, Melamed N, et al. Guideline No. 430: Diagnosis and management of preterm prelabour rupture of membranes. *J Obstet Gynaecol Con*. 2022; 44(11):1193-1208.e1.
14. Suff N, Story L, Shennan A. The prediction of preterm delivery: What is new? *Semin Fetal Neonatal Med*. 2019; 24(1):27–32.
15. Feher J. Smooth Muscle. *Quantitative Human Physiology*. 2012;283–93.
16. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*. 2003; 27(1–4):201–6.
17. Pérez-Sánchez A. Relaxant effect of thymol on smooth muscle. *Mexican Journal of Medical Research ICOSA*. 2023;11(22):23–29.
18. Li JKH, Lau PF, Tribe RM, Johnson MR. Transcription factors regulated by cAMP in smooth muscle of the myometrium at human parturition. *Biochem Soc Trans*-2021; 49(2):997-1011.
19. Varley A, Koschinski A, Johnson MR, Zaccolo M. cAMP compartmentalization in human myometrial cells. *Cells*. 2023; 12(5):718.

20. Lehnert M, Dobrowinski H, Feil S, Feil R. cGMP Signaling and Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity. *J Cardiovas Dev Dis.* 2018; 5(2):20.
21. Renzo GC Di, Roura LC, Facchinetti F, Helmer H, Hubinont C, Jacobsson B, et al. Preterm Labor and Birth Management: Recommendations from the European Association of Perinatal Medicine. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017; 30(17):1–21.
22. Paul JW, Smith R. Preventing preterm birth: New approaches to labour therapeutics using Nanoparticles. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018; 52:48–59.
23. Patel SS, Ludmir J. Drugs for the Treatment and Prevention of Preterm Labor. *Clin Perinatol.* 2019; 46(2):159–72.
24. Rundell K, Panchal B. Preterm Labor: Prevention and Management. *Am Fam Physician.* 2017; 95(6):366–372.
25. Wilson A, Hodgetts-Morton VA, Marson EJ, Markland AD, Larkai E, Papadopoulou A, et al. Tocolytics for delaying preterm birth: a network meta-analysis (0924). *Cochrane Database Syst Rev.* 2022; 8(8):CD014978.
26. Gholami-Ahangaran M, Ahmadi-Dastgerdi A, Azizi S, Basiratpour A, Zokaei M, Derakhshan M. Thymol and carvacrol supplementation in poultry health and performance. *Vet Med Sci.* 2022; 8(1):267–88.
27. Gao T, Zhou H, Zhou W, Hu L, Chen J, Shi Z. The Fungicidal Activity of Thymol against *Fusarium graminearum* via Inducing Lipid Peroxidation and Disrupting Ergosterol Biosynthesis. *Molecules.* 2016; 21(6):770.
28. Walczak M, Michalska-Sionkowska M, Olkiewicz D, Tarnawska P, Warzyńska O. Potential of Carvacrol and Thymol in Reducing Biofilm Formation on Technical Surfaces. *Molecules.* 2021; 26(9):2723.

29. Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras M del M, Segura-Carretero A, et al. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytother Res*. 2018; 32(9):1688–1706.
30. Nagoor Meeran MF, Javed H, Tae H AI, Azimullah S, Ojha SK. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front Pharmacol*. 2017; 8:1–34.
31. Meister A, Bernhardt G, Christoffel V, Buschauer A. Antispasmodic Activity of *Thymus vulgaris*, Extract on the Isolated Guinea-Pig Trachea: Discrimination Between Drug and Ethanol Effects. *Planta Med*. 1999; 65(6):512–516.
32. Magyar J, Szentandrassy N, Bányász T, Fülöp L, Varró A, Nánási PP. Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Br J Pharmacol*. 2002; 136(2):330–338.
33. Haeseler G, Maue D, Grosskreutz J, Bufler J, Nentwig B, Piepenbrock S, et al. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. *Eur J Anaesthesiol*. 2002; 19(8):571.
34. Lee SP, Buber MT, Yang Q, Cerne R, Cortés RY, Sprou DG, et al. Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *Br J Pharmacol*. 2008; 153(8):1739.
35. Schönknecht K, Krauss H, Jambor J, Fal AM. Treatment of cough in respiratory tract infections - the effect of combining the natural active compounds with thymol. *Wiad Lek*. 2016; 69(6):791–8.
36. Borugă O, Jianu C, Mișcă C, Goleț I, Gruia AT, Horhat FG. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *J Med Life*. 2014; 7(Spec Iss 3):56.

37. Teixeira AP, Nóbrega R, Lima E , Araújo W, Lima I. Antifungal activity study of the monoterpene thymol against *Cryptococcus neoformans*. Nat Prod Res. 2020; 34(18):2630–2633.
38. Micucci M, Protti M, Aldini R, Frosini M, Corazza I, Marzetti C, et al. *Thymus vulgaris* L. Essential Oil Solid Formulation: Chemical Profile and Spasmolytic and Antimicrobial Effects. Biomolecules. 2020; 10(6):860.
39. Ribeiro ARS, Diniz PBF, Pinheiro MS, Albuquerque-Júnior RLC, Thomazzi SM. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K (+) channels, and gastric mucus secretion. Chem Biol Interact. 2016; 244:121–128.
40. Rúa J, del Valle P, de Arriaga D, Fernández-Álvarez L, García-Armesto MR. Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. Foodborne Pathog Dis. 2019; 16(9):622–629.
41. Islam MT, Khalipha ABR, Bagchi R, Mondal M, Smrity SZ, Uddin SJ, et al. Anticancer activity of thymol: A literature-based review and docking study with Emphasis on its anticancer mechanisms. IUBMB Life. 2019; 71(1):9–19.
42. Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevão-Silva CF, Carvalho MDDB, Cunha JM, Grespan R, et al. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. Evid Based Complement Alternat Med. 2012; 2012:657026.
43. Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. Food Chem. 2016; 210:402–14.

44. Van den Broucke CO, Lemli JA. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. Part 2: Antagonistic effect of thymol and carvacrol. *Planta Med.* 1982; 45(3):188–190.
45. Meister A, Bernhardt G, Christoffel V, Buschauer A. Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. *Planta Med.* 1999; 65(6):512–516.
46. Boskabady MH, Aslani MR, Kiani S. Relaxant effect of *Thymus vulgaris* on guinea-pig tracheal chains and its mechanism(s). *Phytother Res.* 2006; 20(1):28–33.
47. Beer AM, Lukanov J, Sagorchev P. Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine.* 2007; 14(1):65–69.
48. Engelbertz J, Lechtenberg M, Studt L, Hensel A, Verspohl EJ. Bioassay-guided fractionation of a thymol-deprived hydrophilic thyme extract and its antispasmodic effect. *J Ethnopharmacol.* 2012; 141(3):848–853.
49. Briseid Jensen K, Dyrud OK.. The smooth muscle relaxing effect of thyme (*Thymus vulgaris* L). *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1962; 19:345–355.
50. Premrov Bajuk B, Prem L, Vake T, Žnidaršič N, Snoj T. The effect of thymol on acetylcholine-induced contractions of the rat ileum and uterus under ex vivo conditions. *Front Pharmacol.* 2022; 13:990654.
51. Humberg A, Fortmann I, Siller B, Kopp MV, Herting E, Göpel W, et al. Preterm birth, and sustained inflammation: consequences for the neonate. *Semin Immunopathol.* 2020 42(4):451–68.
52. Quenby S, Gallos ID, Dhillon-Smith RK, Podesek M, Stephenson MD, Fisher J, et al. Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss. *Lancet.* 2021; 397(10285):1658–1667.

53. Profit J, Lee D, Zupancic JA, Papile L, Gutierrez C, Goldie SJ, et al. Clinical benefits, costs, and cost-effectiveness of neonatal intensive care in Mexico. *PLoS med.* 2010; 7(12):e1000379.
54. Chackowicz A, Czuzoj-Shulman N, Abenhaim HA. The effects of tocolysis on neonatal septic death in women with PPRM: a retrospective cohort study. *Arch Gynecol Obstet.* 2018; 298(5):897–902.
55. 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):354–365.
56. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación.* 1999; 107–64.
57. 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):52324.
58. 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.
59. Muñoz-Pérez VM, Ortiz MI, Gerardo-Munoz LS, Cariño-Cortés R, Salas-Casas A. Tocolytic effect of the monoterpene phenol isomer, carvacrol, on the pregnant rat uterus. *Chin J Physiol.* 2020; 63(5):204–210.
60. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methinds Mol Biol.* 2022; 2508:115–34.
61. Astudillo A, Hong E, Bye R, Navarrete A. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *PhytotherRes.* 2004; 18(2):102–106.

62. Begrow F, Engelbertz J, Feistel B, Lehnfeld R, Bauer K, Verspohl EJ. Impact of thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance. *Planta Med.* 2010; 76(4):311–318.
63. Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MDM, Lima FC, Lahlou S, Magalhães PJC, et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010; 24(3):341–50.
64. Young RC. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1101:72–84
65. Garfield RE, Maner WL. Physiology and Electrical Activity of Uterine Contractions. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18(3):289-295.
66. Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005; 288:C769-783.
67. Szentandrassy N, Szigeti G, Szegedi C, Sárközi S, Magyar J, Bányász T, et al. Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. *Life Sci.* 2004 ;74(7):909–21.
68. Szentandrassy N, Szentesi P, Magyar J, Nánási PP, Csernoch L. Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. *BMC Pharmacol.* 2003; 3(1):9.
69. Takishama K, Shimizu H, Setaka M, Kwan T. A Spin-Label Study of the Effects of Drugs on Calcium Release from Isolated Sarcoplasmic Reticulum Vesicles. *J Biochem.* 1980; 87(1):305–312.
70. Koshita M, Oba T. Caffeine treatment inhibits drug-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum and caffeine contracture but not tetanus in frog skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol.* 1989; 67(8):890–895.

71. Magyar J, Szentandrásy N, Bányász T, Fülöp L, Varró A, Nánási PP. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol.* 2004; 487(1–3):29–36.
72. Dantas BPV, Alves QL, de Assis KS, Ribeiro TP, de Almeida MM, de Vasconcelos AP, et al. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. *Vascul Pharmacol.* 2015; 67-69:48–58
73. Xu C, You X, Liu W, Sun Q, Ding X, Huang Y, et al. Prostaglandin F₂α regulates the expression of uterine activation proteins via multiple signalling pathways. *REPRODUCTION.* 2015;149(1):139–46.
74. Husslein P. The importance of oxytocin and prostaglandins to the mechanism of labor in humans. *Wien Klin Wochenschr Suppl.* 1984; 155:1–32.
75. Tahmasebi P, Abtahi Froushani SM, Afzale Ahangaran N. Thymol has beneficial effects on the experimental model of ulcerative colitis. *Avicenna J Phytomed.* 2019; 9(6):538–550.
76. Marsik P, Kokoska L, Landa P, Nepovim A, Soudek P, Vanek T. *In vitro* Inhibitory Effects of Thymol and Quinones of *Nigella sativa* Seeds on Cyclooxygenase-1- and -2-Catalyzed Prostaglandin E₂ Biosyntheses. *Planta Med.* 2005; 71(8):739–42.
77. Abdalla FMF, Maróstica E, Picarelli ZP, Abreu LC, Avellar MCW, Porto CS. Effect of estrogen on muscarinic acetylcholine receptor expression in rat myometrium. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;213(2):139–148.
78. Jana B, Całka J, Bulc M, Piotrowska-Tomala KK. Participation of acetylcholine and its receptors in the contractility of inflamed porcine uterus. *Theriogenology.* 2020; 143:123–32.