



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis isoblográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

JENIFER NAYELLI CASTRO DUPLAN



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. RACHEL MATA ESSAYAG
VOCAL: MVZ. ATONATIU EDMUNDO GÓMEZ MARTÍNEZ
SECRETARIO: Dr. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
1er. SUPLENTE: M. en C. ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO
2° SUPLENTE: M. en C. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 126, Conjunto E del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO

SUSTENTANTE:

JENIFER NAYELLI CASTRO DUPLAN

Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos de Personal Académico a través del proyecto DGAPA IN 210910, Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado a través del proyecto PAIP 6390-18 y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 82 613.

ÍNDICE TEMÁTICO

ABREVIATURAS Y NOTACIONES UTILIZADAS	V
Resumen.....	1
I. INTRODUCCIÓN	3
a. Broncoconstricción y broncorrelajación	5
b. Afecciones del músculo liso de vías aéreas	5
i. Timol.....	9
ii. Salbutamol.....	11
iii. Bromuro de ipratropio.....	11
a. Modelo farmacológico de tráquea aislada de cobayo	12
b. Interacciones farmacológicas	13
c. Análisis isobolográfico	13
i. Isobolograma.....	13
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	19
a. Objetivo general	19
b. Objetivos particulares	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
a. Fármacos	20
b. Preparación de la suspensión de timol	20
c. Preparación de la solución de bromuro de ipratropio y de salbutamol	20
d. Animales	20
e. Disección de tráquea y montaje de preparación	20
f. Evaluación del efecto relajante de timol, salbutamol e ipratropio	21
h. Determinación de las curvas concentración - respuesta	22
i. Análisis estadístico	22
VI. RESULTADOS	24
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. PERSPECTIVAS	43
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras del timol y de algunos fármacos utilizados para el tratamiento del asma.....	4
Figura 2. Representación e interpretación de isoblograma.....	16
Figura 3. Curva concentración - respuesta del efecto relajante de timol.....	25
Figura 4. Curva concentración - respuesta del efecto relajante de salbutamol.....	25
Figura 5. Curva concentración - respuesta del efecto relajante de ipratropio.....	26
Figura 6. Comparación de las curvas concentración - respuesta experimental y teórica del efecto relajante de la interacción de la combinación 1:1 entre timol y bromuro de ipratropio.....	30
Figura 7. Comparación de las respuestas teórica y experimental inducida por las concentraciones de la combinación 1:3 entre timol y bromuro de ipratropio.....	30
Figura 8. Curva concentración - respuesta del efecto relajante de la interacción de la combinación 3:1 entre timol y bromuro de ipratropio y representación de la repuesta teórica que debió ser inducida.....	31
Figura 9. Isoblograma de la interacción de timol y bromuro de ipratropio en tráquea aislada de cobayo.....	32
Figura 10. Curvas concentración - respuesta teórica y experimental del efecto relajante de la interacción de la combinación 1:1 de timol con salbutamol.....	33
Figura 11. Comparación de las respuestas teórica y experimental inducida por las concentraciones de la combinación 1:3 entre timol y salbutamol.....	33
Figura 12. Curva concentración - respuesta del efecto relajante de la interacción de la combinación 3:1 entre timol y salbutamol.....	34
Figura 13. Isoblograma de la interacción de timol y salbutamol.....	35

Figura 14. Isoblograma para diferentes concentraciones efectivas (30%, 40%, 50%, 60% y 70% de relajación) para la combinación timol: ipratropio.....	39
Figura 15. Isoblograma para diferentes concentraciones efectivas (30%, 40%, 50%, 60% y 70% de relajación) para la combinación timol: salbutamol.....	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fármacos utilizados en el tratamiento del asma.....	7
Cuadro 2. Tratamiento sintomático de la EPOC.....	8
Cuadro 3. Interacciones farmacológicas.....	14
Cuadro 4. Valores de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) y de los número de Hill para timol, ipratropio y salbutamol.....	24
Cuadro 5. Concentraciones utilizadas en la evaluación de la interacción entre timol y bromuro de ipratropio.....	27
Cuadro 6. Concentraciones utilizadas para la evaluación del efecto relajante de la interacción entre timol y salbutamol.....	28
Cuadro 7. Comparación de Z_{ad} y Z_{exp} de las combinaciones de la interacción de timol con bromuro de ipratropio.....	31
Cuadro 8. Comparación de Z_{ad} y Z_{exp} de las combinaciones de la interacción de timol con salbutamol.....	34

ABREVIATURAS Y NOTACIONES UTILIZADAS

AMP _c	Adenosín monofosfato cíclico
GMP _c	Guanosín monofosfato cíclico
ANP	Péptido natriurético auricular
NO	Óxido nítrico
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
SO ₂	Dióxido de azufre
RAM	Reacción adversa asociada a medicamentos
PKA	Proteína cinasa A
iCa ²⁺	Calcio ²⁺ intracelular
Ach	Acetilcolina
IP ₃	Inositol trifosfato
CysLT	Cisteinil leucotrienos
PDE _{III}	Fosfodiesterasa isoenzima III
PDE _{IV}	Fosfodiesterasa isoenzima IV
GR _α	Receptor de glucocorticosteroides alfa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
TNS	Terapia sustitutiva de nicotina
KHS	Disolución de Krebs-Henseleit
mM	Subunidad mili molar
g	Unidad gramo

μg	Subunidad microgramo
mL	Subunidad mililitro
Cch	Carbacol o carbamilcolina
$\text{DE}_{50}/\text{CE}_{50}$	Concentración efectiva 50
M	Magnitud de la interacción
ρ_A	Proporción de fármaco A
ρ_B	Proporción de fármaco B
Z_{ad}	Concentración efectiva 50 teórica
Z_{exp}	Concentración efectiva 50 experimental
DE_x/CE_x	Concentración efectiva a X nivel de efecto
EE	Error estándar estimado
V	Varianza
EEM	Error estándar medio
B_{50}	Concentración efectiva 50 de fármaco B
A_{50}	Concentración efectiva 50 de fármaco A
B_i	Concentración efectiva a un determinado nivel de fármaco B
A_i	Concentración efectiva a un nivel específico de fármaco A
q	Valor de número de Hill para el fármaco menos potente
p	Valor de número de Hill para el fármaco más potente
*Ipratropio	Se maneja de manera indiferente refiriéndose a la sal de bromuro.

**La mayoría de las siglas son dadas en el idioma inglés.

Resumen

El timol es uno de los constituyentes mayoritarios del tomillo (*Thymus vulgaris*), a este monoterpeno se le han demostrado efectos relajantes de la musculatura lisa vascular, intestinal, del conducto deferente y de vías aéreas. Si bien es conocido el efecto relajante de la tráquea aislada de cobayo para timol, no se conoce la interacción que puede existir cuando se administra simultáneamente timol con los fármacos antiasmáticos de amplio uso en la clínica como el bromuro de ipratropio y el salbutamol. Por lo que el propósito de este estudio fue conocer las interacciones que existen entre timol e ipratropio, un antagonista muscarínico y entre timol y salbutamol, un agonista β - adrenérgico sobre el efecto relajante de la musculatura lisa de vías aéreas. Para este estudio se utilizó el modelo de tráquea aislada de cobayo. El efecto relajante se midió en la tráquea aislada de cobayo precontraída con carbacol (1mM). Se construyeron las curvas concentración- respuesta para timol y los dos fármacos antiasmáticos y se determinaron las CE_{50} por regresión no lineal utilizando la Ecuación de Hill. La CE_{50} para timol fue de $141.8 \pm 6.42 \mu\text{g/ mL}$ con número de Hill de 2.221; la CE_{50} para ipratropio fue de $8.05 \times 10^{-4} \pm 7.17 \times 10^{-5} \mu\text{g/ mL}$ con número de Hill de 3.211 y para salbutamol la CE_{50} fue de $9.60 \times 10^{-3} \pm 3.03 \times 10^{-3} \mu\text{g/ mL}$ con número de Hill de 1.098. Timol provocó un efecto superaditivo del efecto relajante de ipratropio en la tráquea aislada de cobayo en las proporciones timol: ipratropio 1:1 ($Z_{\text{exp}} = 32.740 \pm 3.315 \mu\text{g/ mL}$ vs $Z_{\text{ad}} = 62.330 \pm 0.039 \mu\text{g/ mL}$) y 3:1 ($Z_{\text{exp}} = 65.830 \pm 1.350 \mu\text{g/ mL}$ vs $Z_{\text{ad}} = 99.260 \pm 0.029 \mu\text{g/ mL}$), en tanto que para la proporción 1:3 se presentó una relación aditiva ($Z_{\text{exp}} = 25.980 \pm 1.434 \mu\text{g/ mL}$ vs $Z_{\text{ad}} = 30.771 \pm 0.049 \mu\text{g/ mL}$). Para el caso de la combinación timol: salbutamol, se presentó un efecto superaditivo en la proporción fija 3:1 ($Z_{\text{exp}} = 56.000 \pm 5.367 \mu\text{g/ mL}$ vs $Z_{\text{ad}} = 80.002 \pm 0.101 \mu\text{g/ mL}$) y una relación aditiva para las proporciones 1:1 ($Z_{\text{exp}} = 53.100 \pm 5.376 \mu\text{g/ mL}$ vs $Z_{\text{ad}} = 53.684 \pm 0.183 \mu\text{g/ mL}$) y 1:3 ($Z_{\text{exp}} = 43.61 \pm 2.696 \mu\text{g/ mL}$ vs $Z_{\text{ad}} = 42.549 \pm 0.250 \mu\text{g/ mL}$). Debido a que las curvas concentración respuesta de los fármacos de prueba no fueron paralelas, el análisis isobolográfico se realizó construyendo isobogramas curvilíneos cóncavos y convexos, de acuerdo a los valores distintos de los números de Hill de cada uno de los fármacos utilizados para la combinación. La relación aditiva establecida entre timol y salbutamol se puede relacionar con el mecanismo de acción común sobre los receptores β - adrenérgicos y el efecto superaditivo entre timol e ipratropio se puede explicar por la actividad conjunta

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo del efecto β - adrenérgico de timol y el efecto antagonista colinérgico provocado por el bromuro de ipratropio. Estos resultados resaltan la importancia de la combinación de un compuesto de origen natural de baja potencia que potencia la actividad relajante en la tráquea aislada de cobayo de dos fármacos de uso clínico.

I. INTRODUCCIÓN.

La mayoría de los pacientes diagnosticados con asma son tratados eficazmente con los fármacos actuales, sin embargo existen pacientes que toleran muy bien el tratamiento y otros que presentan efectos adversos considerables. El salbutamol (Figura 1a), la aminofilina (Figura 1b), el ipratropio (Figura 1c) y los glucocorticosteroides son algunos de los fármacos que ayudan a disminuir los síntomas del asma bronquial y de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Se ha reportado que diferentes grupos étnicos han utilizado desde hace mucho tiempo las plantas medicinales como alternativa de tratamiento para curar afecciones de vías respiratorias; el tomillo (*Thymus vulgaris*) es una de las plantas usadas para este fin, es por ello que los científicos se han dado a la tarea de investigar los componentes responsables de la actividad terapéutica de esta planta, llegándose a atribuir al timol (Figura 1d) tal propiedad.

En el presente trabajo se realizó el análisis isobolográfico de las interacciones entre timol y salbutamol y entre timol y bromuro de ipratropio en las proporciones fijas 1:1, 1:3 y 3:1 correspondientes a las concentraciones efectivas 50 (CE_{50}).

Análisis isoblográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

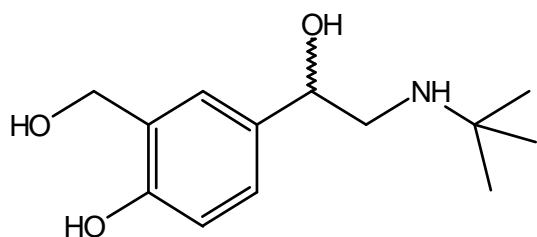


Figura 1a. Estructura de salbutamol

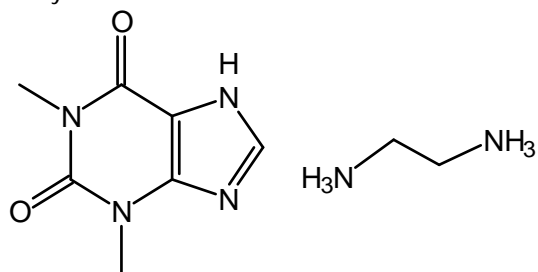


Figura 1b. Estructura de aminofilina

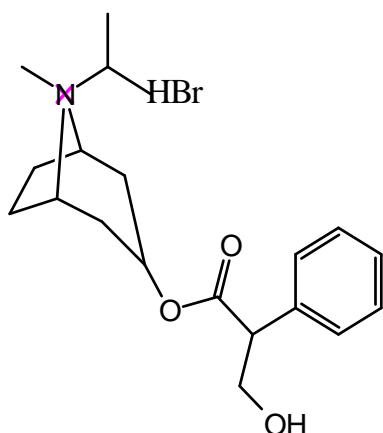


Figura 1c. Estructura de bromuro de ipratropio

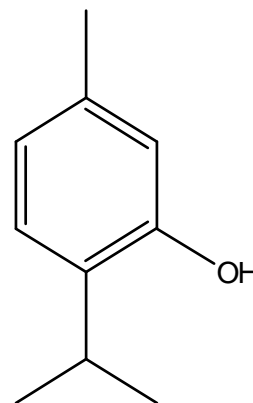


Figura 1d. Estructura de timol

Figura 1. Estructuras del timol y de algunos fármacos utilizados para el tratamiento del asma.

FUNDAMENTO TEÓRICO

a. Broncoconstricción y broncorrelajación

La contracción del músculo liso puede darse por una despolarización o por una estimulación con agonistas contráctiles que están íntimamente relacionados con un incremento de calcio intracelular (iCa^{2+}). El calcio forma un complejo con la calmodulina que activa a la enzima cinasa de las cadenas ligeras de miosina, la cual a su vez fosforila a la miosina. Esta fosforilación activa a la miosina ATPasa, la cual genera los entrecruzamientos entre actina y miosina desencadenando la contracción del músculo. El músculo liso también puede ser contraído por agentes que estimulen directamente a receptores acoplados a proteínas G, o por la liberación y/ o síntesis de mediadores como acetilcolina, histamina, leucotrienos, prostaglandinas, alérgenos, entre otros (Barnes, 1998).

La broncodilatación o broncorrelajación es producida por varias sustancias endógenas que actúan ya sea activando receptores o liberando broncodilatadores endógenos (Barnes, 1998). El proceso de relajación tiende a reducir los niveles de calcio libre intracelular y/ o afectan la sensibilidad al calcio de las proteínas contráctiles. Existen cuatro mecanismos celulares principales mediante los cuales actúan los relajantes del músculo liso de vías respiratorias: a) incremento de adenosín monofosfato cíclico (AMP_c), b) aumento de guanosín monofosfato cíclico (GMP_c), c) inhibición de la degradación de nucleótidos cíclicos y d) modulando la actividad de los canales iónicos de membrana. Los principales agentes relajantes del músculo liso de vías aéreas son la adrenalina, péptido intestinal vasoactivo, prostaglandina E_2 , prostaciclina, péptido natriurético auricular (ANP) y el óxido nítrico (NO) (Barnes, 1998).

b. Afecciones del músculo liso de vías aéreas

La broncoconstricción ocasionada por las sustancias endógenas y exógenas son causantes de afecciones respiratorias tales como asma bronquial, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística y enfisema (Amrani & Panietteri, 2003; Panietteri et al, 2008).

El asma bronquial y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica son problemas de salud de importancia nacional y mundial, afectan a un alto índice de la población, el asma afecta

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

principalmente a niños; la estimación nacional es del 12 - 13% en población infantil con mayor predominio masculino (Baeza & Albertos, 1997). En tanto que en adultos, la estimación se haya con mayor predominio de la enfermedad en el género femenino (0.6%) que en el masculino (0.4%) (Moorman et al., 2011), aunque se desconoce con precisión cuál es la causa por la que se presenta, se ha reportado que tiene cierta predisposición genética a agentes inflamatorios y cuya interacción con diferentes factores ambientales hace que la enfermedad se exprese de diferentes formas clínicas (Soto- Quirós, 2008). Por otra parte, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica afecta de manera importante a adultos al ser su principal causa el tabaquismo (Mannino, 2002), aunque otros factores de riesgo también pueden ser las partículas asociadas a la cocina en espacios reducidos, la contaminación ambiental producida por dióxido de azufre (SO₂) y por sustancias químicas (como el cadmio) y el tabaquismo pasivo (Barnes, 2000). La EPOC ocupa la cuarta causa de muerte en Estados Unidos (Mannino, 2002), es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial además de causar una gran repercusión económica (Montemayor, 1997). La enfermedad pulmonar obstructiva crónica se caracteriza por el desarrollo progresivo de la limitación de flujo aéreo que no es totalmente reversible. El término EPOC engloba la bronquitis crónica obstructiva, con obstrucción de las vías aéreas pequeñas, enfisema con la ampliación de los espacios de aire y la destrucción del parénquima pulmonar, la pérdida de la elasticidad pulmonar y el cierre de las vías pequeñas, es decir, la mayoría de los pacientes que padecen EPOC presentan tres condiciones patológicas; bronquitis obstructiva crónica, enfisema y taponamiento mucoso, variando el grado clínico para cada paciente (Barnes, 2000). El asma bronquial esta definido en términos fisiológicos como la contracción reversible del músculo liso que obstruye las vías respiratorias dando como resultado síntomas como silbidos, tos y dificultad para respirar, estos síntomas se pueden tratar con fármacos broncodilatadores inhalados (Mannino, 2002), los tratamientos para el asma se muestra en el Cuadro 1 y para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Fármacos usados en el tratamiento del asma

Tipo de fármacos	Descripción	Ejemplo de fármacos
Agonistas β adrenérgicos	Activan receptores β_2 - adrenérgicos de vías respiratorias. La estimulación de estos receptores favorece la relajación aumentando la producción de AMP _c y proteína cinasa A (PKA); reduciendo la concentración de iCa^{2+} y activando canales de potasio (K^+) y la inhibición de la hidrólisis de polifosfoinositoles membranales (Mendoza, 2008).	Agentes de corta duración: el salbutamol, la terbutalina y el fenoterol. Agentes de larga duración: el salmeterol y el formoterol (Rang et al., 2007).
Agentes anticolinérgicos	Las vías aéreas tienen inervación parasimpática, su neurotransmisor, acetilcolina (ACh), actúa sobre los receptores muscarínicos M_2 y M_3 . Su activación aumenta la producción de inositol trifosfato (IP ₃) y libera iCa^{2+} (Mendoza, 2008).	Los compuestos usados como broncodilatadores son el ipratropio y el tiotropio (Rang et al., 2007).
Metilxantinas	Inhiben fosfodiesterasas (PDE _{III} y PDE _{IV}), incrementando el AMP _c y/o GMP _c , provocando relajación del músculo liso de vías aéreas, (Mendoza, 2008).	Teofilina, teobromina y cafeína (Rang et al., 2007).
Glucocorticoides	Atraviesan la membrana celular, inactivan al receptor de glucocorticosteroides α (GR $_{\alpha}$) y penetran al núcleo, su asociación con ácido desoxirribonucléico	La beclometasona, bunedisona, fluticasona y triamcinolona (Rang et al., 2007).

Análisis isoblográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

	(DNA) activa o reprime la transcripción de ciertos genes, también disminuyen la cantidad de células inflamatorias (Mendoza, 2008).	
Agentes anti- leucotrienos	Existen dos tipos de receptores para los cisteinil leucotrienos (CysLT), el CysLT ₁ y el CysLT ₂ , el primero al ser estimulado contrae el músculo liso traqueal provocando aumento en la secreción de moco, en producción de IP ₃ y liberación de iCa ²⁺ . Los antileucotrienos inhiben a CysLT ₁ , por lo que produce relajación (Mendoza, 2008).	Los fármacos de este tipo usados en la clínica para el tratamiento del asma son antagonistas de CysLT ₁ : montelukast y zafirlukast (Rang et al., 2007).

Cuadro 2. Tratamiento sintomático de la EPOC. (Montemayor, 1997)

Tipo de fármaco/ acción	Fármacos	Mejora
Abandonar hábito tabáquico	TNS	Reducción de tos y de producción de esputo
Agonistas β_2 - adrenérgicos	Salbutamol, terbutalina, fenoterol, procaterol	Tratamiento sintomático
Anticolinérgicos	Bromuro de ipratropio	Tratamiento sintomático

TNS: Terapia Sustitutiva de Nicotina

La mayoría de los pacientes diagnosticados con asma son tratados eficazmente con los fármacos actuales y sufren de pocos efectos secundarios, sin embargo existen pacientes tolerantes al tratamiento o que presentan efectos adversos a éste, por ejemplo, para algunos fármacos β_2 - adrenérgicos como el salbutamol la relación riesgo/ beneficio es alta,

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

los efectos adversos son muchos y en ocasiones superan los efectos terapéuticos (Cireset al., 2010), por lo que se limita el uso de este fármaco a pacientes asmáticos. La aminofilina es una xantina utilizada para disminuir los síntomas del asma bronquial pero provoca muchas reacciones adversas asociadas al medicamento (RAM) como son problemas del sistema digestivo, trastornos del sistema nervioso y circulatorio, además incrementa la toxicidad al administrarlo conjuntamente con agonistas β - adrenérgicos (Bermúdez et al., 1999; Siegel et al., 1985).

En algunos estudios se ha mostrado la utilidad del bromuro de ipratropio asociado con β_2 -agonistas de acción corta en crisis moderadas a graves, sin embargo el ipratropio provoca RAM que suelen incomodar al paciente, entre los que se encuentran la disminución de la motilidad intestinal, visión borrosa, sedación y confusión mental, entre otras (Landi, et al., 2007). Los glucocorticosteroides han mostrado su beneficio cuando se usan precozmente por vía oral y en esporádicas ocasiones por inhalación en crisis agudas (Busquets, 2006) sin embargo, los pacientes a los que se les han administrado padecen de efectos secundarios locales como candidiasis orofaríngea, disfonía por miopatía de las cuerdas vocales e irritación faríngea en el momento de la inhalación, de aquí la necesidad de investigar otros fármacos o compuestos útiles para el asma.

i. Timol

Los antiguos griegos conocían el poder expectorante del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*), Dioscórides lo usaba para tratar el asma y descongestionar la garganta (Heilmeyer, 2007), los pueblos indígenas latinoamericanos lo han utilizado para curar el dolor estomacal, tratar úlceras, como terapia para la tos y como condimento (Rodríguez - Echeverry, 2010). El tomillo se administra por “compresas calientes”, las cuales permiten la absorción de los componentes de las plantas en el organismo, siendo un buen modo de administrar plantas que son demasiado “fuertes” para ingerirlas (McLain, 1997). El aceite de tomillo ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento del asma por sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antiespasmódicas (Wright, 2002).

En la composición del tomillo destacan los flavonoides y el aceite esencial (1- 2.5%) (López, 2006), este último se obtiene por arrastre en corriente de vapor de agua de las sumidades floridas. Su composición varía conforme a la especie y época de recolección.

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

Contiene los isómeros timol (Figura 1d) (30 - 70%) y carvacrol (3 - 15%), una pequeña proporción de los fenoles está presente como glucósidos o galactósidos, además otros monoterpenos; entre ellos *p* - cimeno, β - pineno, linalol, borneol, geraniol y sus ésteres, sesquiterpenos (Encarna et al., 2007), además de diversos flavonoides como apigenina, luteolina, luteolina-7-glucósido y 7-diglucósidoluteolina, cirsilineol, 8-metoxicirsileneol y timonina (Von den Broucke, 1982). También existen otros componentes del extracto de tomillo no identificados que al parecer contribuyen en el efecto relajante en íleon de rata (Begrow et al., 2010). La actividad expectorante y broncoespasmodolítica, produce una mayor eficiencia en el transporte de la secreción de moco bronquial por parte de los movimientos ciliares en los bronquios, este efecto deriva de una actividad directa sobre la mucosa bronquial, dado que el aceite es eliminado también a través de los pulmones (Encarna et al., 2007). El timol actúa sobre receptores α_1 , α_2 y β del músculo liso del tracto digestivo y de la vena porta de cobayos (Beer et al., 2007). El efecto relajante de timol en músculo liso es reversible, este efecto se ha relacionado también con la inhibición de canales de sodio en tráquea (Haeseler et al., 2002) y la activación de canales de hTRPA1 (human transient receptor potential channel A1) (Lee et al., 2008). Es también conocido que el timol afecta a los músculos esqueléticos, lisos y cardíacos en su actividad contráctil por medio del retículo sarcoplásmico actuando igualmente en canales membranales (Tamura & Iwamoto, 2004). El timol relaja los anillos de tráquea aislada de cobayo precontraídos con carbacol de manera dosis dependiente (Astudillo et al., 2004). También relaja los anillos de tráquea de rata contraídos con acetilcolina, K^+ y Ba^{++} . El conducto deferente de rata es relajado por el timol de manera competitiva a concentraciones bajas, mientras que a concentraciones altas se observa un comportamiento no competitivo (Begrow et al., 2010).

El timol y sustancias derivadas de éste producen el incremento de las propiedades del sistema nervioso simpático, inclusive la fenoxibenzamina con derivados del timol genera estos cambios inclusive administrados por vía oral, sin embargo muchos de los derivados del timol son altamente tóxicos (Credner & Graebner, 1967).

Otros autores aseguran que el timol no es el compuesto responsable del efecto relajante de *Thymus vulgaris* ya que comprobaron el efecto relajante de éste en el sistema endotelial de rata en aceites con bajas concentraciones de timol (Engelbertz et al., 2008).

ii. Salbutamol

El uso regular de broncodilatadores agonistas β_2 - adrenérgicos de corta duración ha sido motivo de controversia, porque inducen tolerancia, empeoran el asma y aumentan el riesgo de las exacerbaciones asmáticas (Orriols & Vallano, 2007). En la actualidad, los agonistas β_2 - adrenérgicos de acción prolongada en combinación con un corticosteroide tienen un lugar importante, es considerado el tratamiento más eficaz ya que ejercen acciones complementarias (Barnes, 2006). Sin embargo, el tratamiento con agonistas β_2 - adrenérgicos de acción prolongada es una cuestión controvertida también ya que su uso se ha asociado a un aumento del riesgo de exacerbaciones graves y muerte en los pacientes asmáticos tratados (Orriols & Vallano, 2007). Por esta razón que para el tratamiento de los pacientes con asma sigue prefiriéndose el salbutamol sobre los fármacos β_2 - adrenérgicos de acción prolongada, además de que es un broncodilatador rápido y efectivo (Soto- Quirós, 2008).

El salbutamol ayuda a disminuir considerablemente el broncoespasmo causado por broncoconstrictores naturales y la disnea. El perfil farmacológico del salbutamol es diferente del de otros fármacos β - adrenérgicos (Britton et al., 1992).

Los fármacos β - adrenérgicos de corta duración son administrados con ayuda de un nebulizador, destacando de manera importante el salbutamol, sin embargo, éste fármaco tiene muchos efectos adversos debido a los receptores β_1 que se encuentran en el músculo cardíaco ya que no es específico para alguno de los dos subtipos de β - receptores (Israel et al., 2000), por esta razón es primordial la búsqueda e investigación de nuevos fármacos que ayuden a disminuir los efectos adversos de los fármacos β_2 - adrenérgicos.

iii. Bromuro de ipratropio

En el asma como en otros padecimientos del sistema respiratorio existe una hiperreactividad de los bronquios a estímulos diversos como inhalación de partículas, gases, aerosoles, aire frío, que puede deberse a un estado de hiperexcitabilidad a cualquier nivel del arco reflejo vagal (Abad et al., 2003).

Análisis isoblográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

Los fármacos anticolinérgicos son especialmente útiles en el tratamiento de la EPOC ya que el tono colinérgico vagal parece ser el único componente reversible del estrechamiento de la vía aérea en esta enfermedad (Abad et al., 2003).

Las fibras eferentes vagales preganglionares entran en el pulmón a través de los hilios, viajan a lo largo de las vías aéreas y terminan en los ganglios parasimpáticos de las paredes de los bronquios, principalmente en los bronquios grandes y medianos (Abad et al., 2003).

Los receptores M_3 del músculo liso de las vías aéreas y de las glándulas median la broncoconstricción y la secreción de moco. Los fármacos anticolinérgicos bloquean de forma competitiva el efecto de la acetilcolina sobre los receptores de la musculatura lisa del árbol bronquial.

El bromuro de ipratropio es un antagonista muscarínico no selectivo que bloquea los receptores M_1 , M_2 y M_3 (Abad et al., 2003), es un derivado de amonio cuaternario de tipo tropano. La literatura reporta que es posible que el bloqueo que produce de los receptores M_2 en los nervios colinérgicos incremente la liberación de acetilcolina (ACh) y reduzca la eficacia de su antagonismo en los receptores M_3 del músculo liso (Abad et al., 2003; Barnes, 2006).

a. Modelo farmacológico de tráquea aislada de cobayo

La contracción del músculo liso bronquial es inducida por agonistas colinérgicos como carbacol. El efecto del carbacol puede ser antagonizado por agonistas β adrenérgicos, por tanto; un compuesto con actividad simpatorlítica que inhibe la acción espasmódica puede ser evaluado en modelo in vitro. Los modelos in vitro mayormente utilizados para evaluar esta actividad son los pulmones y la tráquea aislada de cobayo (Vogel, 2002). Se prefirió el modelo aislado de tráquea de cobayo ya que la extirpación de la tráquea es más sencilla que la del árbol bronquial y los pulmones, además de ser igualmente adecuado para probar fármacos broncodilatadores por el cercano parecido fisiológico y anatómico a la musculatura bronquial, ya que ambos exhiben respuesta (sin mostrar diferencia estadísticamente significativa) a fármacos espasmódicos en músculo liso (Castillo & Beer, 1947).

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

El modelo de tráquea aislada de cobayo es útil en la detección de bloqueadores de receptores H_1 , del efecto relajante de β - simpaticomiméticos, para conocer la capacidad de anticolinérgicos, antiserotonérgicos, al igual que para estudiar los efectos producidos por fármacos en los canales de potasio y calcio (Vogel, 2002). Se utilizan anillos cartilagosos que contienen músculo liso que está involucrado en la regulación del tono broncomotor en el que se mide la respuesta relajante y contráctil (Amrani & Panietteri, 2003). El sistema nervioso autónomo regula la relajación y contracción del músculo liso de vías aéreas, así como también por hormonas y otros agentes autócrinos y parácrinos (Webb, 2003).

b. Interacciones farmacológicas

La administración de fármacos de forma simultánea es una situación frecuente en la terapéutica dado que las enfermedades a menudo involucran politerapia o porque los pacientes sufren diversas afecciones que deben tratarse con varios medicamentos. Las interacciones que pueden producirse son incontables, se han descrito centenares de ellas (Baños & Farré, 2002).

Con el término interacciones farmacológicas definimos clásicamente aquellas situaciones en que los efectos de un fármaco están influenciados por la administración conjunta de otro, en un sentido más amplio, son cualquier modificación del efecto de un fármaco por la administración conjunta de cualquier sustancia química, ya sea alimento, plantas medicinales, fármaco o sustancia de abuso (Baños & Farré, 2002).

Se considera *fármaco precipitante* a aquel que genera el cambio de efecto de otro, llamado por este motivo *fármaco objeto*. Tradicionalmente, las interacciones farmacológicas se clasifican en farmacéuticas, farmacocinéticas y farmacodinámicas, estas interacciones se describen en la el Cuadro 3 (Baños & Farré, 2002).

c. Análisis isobolográfico

i. Isobolograma

Dos o más fármacos que producen efectos similares o iguales, a menudo se administran conjuntamente para reducir las dosis individuales y/ o para reducir los efectos adversos de cada uno. Las combinaciones de fármacos también se emplean en experimentos para descubrir y explorar su mecanismo de acción (Tallarida et al., 1997a).

Análisis isoblográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

Cuando dos sustancias con efecto similar se administran juntas, el efecto combinado puede ser una simple adición de los efectos individuales e independientes, a lo cual se le nombra *aditividad*. En contraste, el efecto de la combinación puede ser exagerado o incluso atenuado. El efecto exagerado es nombrado *superaditividad* o sinergismo, en tanto que el efecto atenuado se nombra *subaditividad* (Tallarida, 2000).

Tipo	Descripción
Farmacéutica	Este tipo de interacciones resultan de las interacciones fisicoquímicas entre los fármacos involucrados o entre fármacos y excipientes, éstas suelen ocurrir fuera del organismo. Las interacciones de tipo farmacéutico denominan <i>incompatibilidades</i> .
Farmacocinética	Las interacciones farmacocinéticas ocurren cuando los procesos de absorción, distribución, biotransformación o eliminación de un fármaco son alterados por otro administrado de forma concurrente. La consecuencia es el aumento o la disminución de los niveles plasmáticos o tisulares del fármaco objeto.
Farmacodinámica	Existen dos tipos de interacciones farmacodinámicas, directas e indirectas. Las interacciones farmacodinámicas directas aparecen entre fármacos que actúan en los mismos lugares de acción, en cambio, cuando los fármacos interactúan por diferentes mecanismos de acción, afectando el mismo efecto se dice que se presentan interacciones farmacodinámicas indirectas. El resultado de este tipo de interacciones puede ser sinérgico (potenciación del efecto el fármaco objeto), aditivo (adición de los efectos individuales de cada fármaco), atenuación del efecto e inclusive antagonismo.

Cuadro 3. Tipos de interacciones farmacológicas (Baños & Farré, 2002)

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

El estudio de interacción entre sustancias activas se puede realizar utilizando el análisis isobolográfico, el cual permite realizar una evaluación rigurosa de la interacción entre dos sustancias activas. El isoblograma proporciona una representación visual de las dosis teóricas aditivas y de los pares experimentales, además es adecuado para mostrar los resultados (Tallarida et al., 1997 a; Tallarida, 2000).

Un isoblograma (Figura 2) es una gráfica en coordenadas rectangulares de las dosis o concentraciones (a , b), de las sustancias respectivas que producen un nivel de efecto específico (por ejemplo DE_{50} , DE_{70} , DE_{30} , etc.) cuando se aplican en forma conjunta. En el isoblograma se muestra la línea de aditividad, la cual representa todas las posibles combinaciones equivalentes para producir el efecto deseado (Tallarida et al., 1997a; Tallarida, 2000). La línea de aditividad está definida por los puntos $(Z_1^*, 0)$ y $(0, Z_2^*)$, donde Z_1^* corresponde a la concentración del compuesto menos activo y Z_2^* a la del compuesto más activo, hablando de los efectos que individualmente producen. En este método el valor de Z_1^* y Z_2^* , se calculan de la región de la curva dosis- respuesta en donde existe una relación lineal, aunque también puede existir una relación no lineal y entonces se puede utilizar el análisis no lineal de Z^* (Tallarida, 2000). Se calcula Z^* para cada fármaco de la regresión lineal del efecto en función del logaritmo de la dosis, de donde se obtienen el $\log Z^*$ y el error estándar del estimado $EE(\log Z^*)$ para cada fármaco, que posteriormente se utilizará para realizar el análisis estadístico (Tallarida et al., 1997 b).

Los pares de dosis equiefectivas son denominadas *isobolas*, de tal forma que $(A, 0)$, $(0, B)$ y los pares (a, b) son isobolas. Cuando la combinación de la dosis a del fármaco A y la dosis b del fármaco B cumplen con la relación $a/A + b/B = 1$ se dice que los fármacos A y B presentan una relación aditiva. La relación $a/A + b/B < 1$ indica la relación superaditiva entre los fármacos A y B , en tanto que la relación $a/A + b/B > 1$, indica la relación subaditiva entre los fármacos A y B (Tallarida, 2000).

La Z^* del fármaco A se denotará como A y la Z^* del fármaco B , se denotará B . Las cantidades en la combinación aditiva son fracciones de la dosis de cada compuesto tal que la suma de las fracciones sea igual a la unidad; así entonces $a = fA$ del fármaco A y $b = (1 - f) B$ del fármaco B . Es decir, para que sea una combinación aditiva se debe cumplir con la relación $a/A + b/B = 1$. Cuando estas cantidades son expresadas en unidades de masa

Análisis isoblográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo
 comunes (mg o µg) o dosis (mg/kg) la cantidad total en la mezcla es la suma denominada Z_{ad} :

$$Z_{ad} = fA + (1 - f) B$$

Esta relación representa la cantidad teórica de la combinación que dará una interacción aditiva. Las proporciones de cada fármaco en la mezcla estará dado por: $\rho_A = fA / Z_{ad}$ y $\rho_B = (1-f) B / Z_{ad}$ respectivamente (Tallarida, 2000).

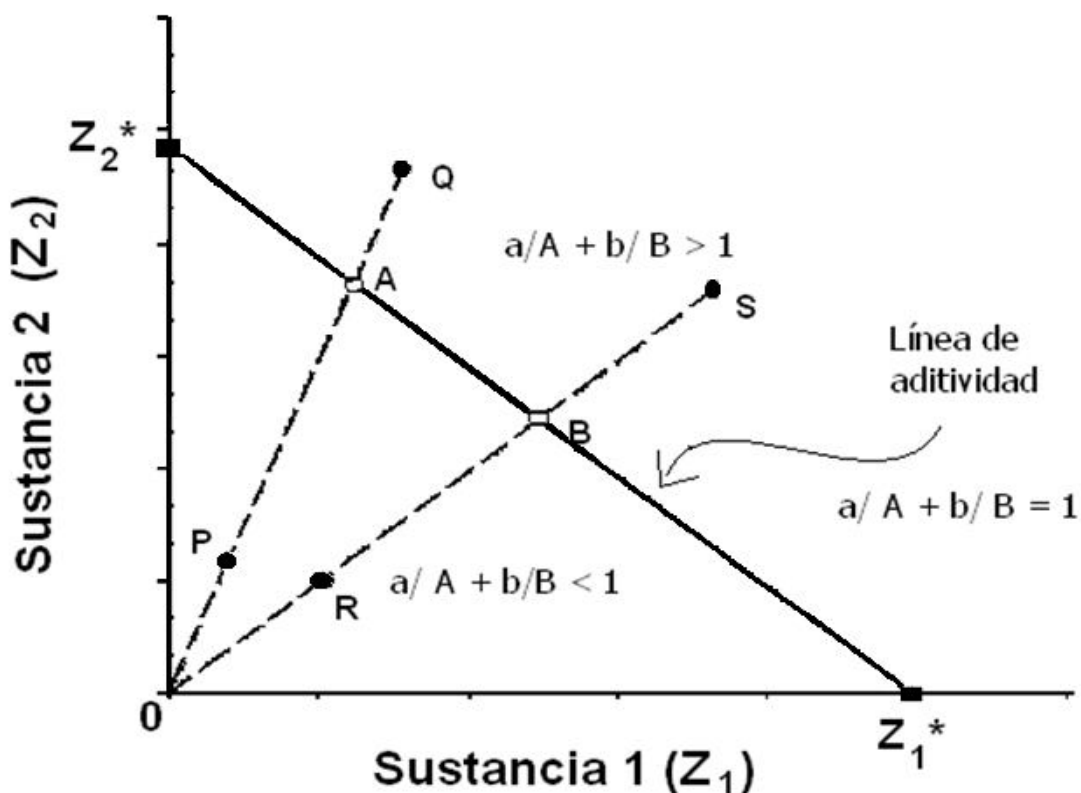


Figura 2. Isoblograma en donde la línea continua es la línea de aditividad; Z_1^* y Z_2^* son las dosis equiefectivas individuales. Los puntos A y B representan las concentraciones teóricas aditivas (Z_{ad}). P y R son puntos que representan las cantidades experimentales (Z_{exp}) con un efecto superaditivo, en tanto que Q y S son puntos que representan las cantidades experimentales (Z_{exp}) con un efecto subaditivo.

La combinación que resulte con estas proporciones se administra experimentalmente al sistema biológico, en diferentes dosis o concentraciones conservando la misma proporción (ρ). Se determina la dosis o concentración que proporciona el mismo nivel de efecto que los fármacos individuales (por ejemplo DE_{50} , DE_{70} , DE_{30} , etc.) y a este valor se le denomina Z_{exp}

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo (cantidad experimental que provoca el mismo nivel del efecto). Se calcula también el intervalo de confianza al 95%, que posteriormente se transforma en el error estándar de la media (EEM).

Se realiza el análisis estadístico a la diferencia $M = \log Z_{ad} - \log Z_{exp}$. Si la diferencia es significativa indicará una relación no aditiva entre los dos fármacos, estableciendo una relación de superaditividad o sinergista si $Z_{exp} < Z_{ad}$ ($M > 0$) y una relación de subaditividad si $Z_{exp} > Z_{ad}$ ($M < 0$). Se aplica un análisis estadístico basado en la prueba t de Student con algunas modificaciones para aplicarse al análisis isobolográfico (Tallarida et al., 1997 a; Tallarida, 2000).

La prueba de significancia de la diferencia $M = \log Z_{ad} - \log Z_{exp}$, brevemente consiste en determinar el valor de t' dado por:

$$t' = M / [EE (Z_{ad}^*)^2 + EE (Z_{exp}^*)^2]^{1/2}$$

En la ecuación anterior Z_{ad} se refieren a los valores teóricos aditivos y Z_{exp} a los valores experimentales. Los errores estándar estimados se calculan con la relación:

$$EE (Z^*) = 2.3 \times Z^* \times EE (\log Z^*)$$

Con lo que se calculan las varianzas respectivas:

$$V (Z^*) = [EE (Z^*)]^2.$$

La varianza de Z_{ad}^* está dada por $V (Z_{ad}^*) = f^2 V (Z_1^*) + (1 - f)^2 V (Z_2^*)$, de esta relación se obtiene el error estándar de Z_{ad} :

$$EE (Z_{ad}^*) = [V (Z_{ad}^*)]^{1/2}$$

Conociendo el valor de Z_{ad} y Z_{exp} con sus respectivos errores estándar, se calcula el valor de t' y se compara con el valor de T dado por:

$$T = [t_{ad} (EE (Z_{ad}^*))^2 + t_{exp} (EE (Z_{exp}^*))^2] / [EE (Z_{ad}^*)^2 + EE (Z_{exp}^*)^2]$$

El valor de t_{ad} es el valor en la tabla de distribución t con $(n_1 + n_2) - 2$ grados de libertad, en donde n_1 y n_2 son el número de dosis del fármaco 1 y fármaco 2 respectivamente que se utilizaron en el cálculo y t_{exp} es el valor en la tabla de distribución t para $n_{exp} - 2$ grados de libertad, en donde n_{exp} es el número de dosis de la combinación. Si el valor absoluto de t' es mayor al valor de T ($|t'| > T$) la diferencia es significativa (Tallarida, 2000).

II. **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El timol es un producto natural obtenido del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) al cual se le ha demostrado efecto relajante del músculo liso intestinal, vascular y traqueal (Beer et al., 2007; Lee et al., 2008; Astudillo et al., 2010; Tamura & Iwamoto, 2004; Begrow et al., 2010). Sin embargo, no se conoce el efecto que puede tener la combinación de este monoterpeno con fármacos utilizados en clínica para el tratamiento de enfermedades obstructivas de las vías respiratorias. Dado que la terapia farmacológica de las enfermedades que obstruyen las vías respiratorias es combinada y que poco se conoce de las interacciones entre productos naturales y fármacos, se consideró importante investigar la interacción farmacodinámica entre timol y los fármacos salbutamol e ipratropio, fármacos de amplio uso en la clínica que por mecanismos de acción diferentes provocan la relajación del músculo liso de vías aéreas (Orriols & Vallano, 2007; Barnes, 2006; Soto - Quirós, 2008; Britton et al., 1992; Israel et al., 2000; Abad et al., 2003). Con ello se pretende contribuir al conocimiento del potencial de interacción entre un producto natural y fármacos de uso clínico con la posibilidad de obtener nuevas combinaciones que puedan en un futuro ser utilizadas para tratar las enfermedades obstructivas de las vías respiratorias.

III. HIPÓTESIS

Mediante el análisis isobolográfico se espera encontrar un efecto superativo de timol sobre el efecto relajante de salbutamol e ipratropio en el modelo de tráquea aislada de cobayo.

IV. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Determinar la interacción farmacodinámica entre timol y los fármacos broncodilatadores salbutamol e ipratropio en el modelo de tráquea aislada de cobayo a través del análisis isobolográfico.

b. Objetivos particulares

b.1. Determinar la concentración efectiva 50 relajante de timol, ipratropio y salbutamol en el modelo de tráquea aislada de cobayo.

b.2. Realizar el análisis isobolográfico de la interacción entre timol y salbutamol y entre timol e ipratropio para relajar el músculo liso de la tráquea aislada de cobayo en las proporciones fijas 1:1, 1:3 y 3:1 de las concentraciones efectivas 50.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Fármacos

El timol y el bromuro de ipratropio usados en el desarrollo experimental de este proyecto fueron comprados a Sigma Aldrich® (St. Louis MO 63103 USA.) y el salbutamol de grado farmacéutico fue donado por la compañía HELM de México S. A. (México).

b. Preparación de la suspensión de timol

En frascos viales de 2 mL se pesó la cantidad necesaria para obtener la concentración deseada, se adicionó 1 gota de tween 80 y se aforó con agua; posteriormente fueron tapados y agitados por ultrasonido durante 4 horas a temperatura ambiente; una vez que el timol se dispersó homogéneamente en toda la suspensión se realizaron las diluciones correspondientes para alcanzar la concentración deseada.

c. Preparación de la solución de bromuro de ipratropio y de salbutamol

Se pesaron las cantidades necesarias en viales para obtener las concentraciones deseadas de cada fármaco, se aforó con agua y se realizaron las diluciones pertinentes para obtener las concentraciones que se usaron para la realización de la curva dosis-respuesta.

d. Animales

Para realizar los experimentos se utilizaron cobayos macho con peso corporal de 300 – 400g. Se manipularon siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM -062 -ZOO -1999. Los animales se mantuvieron a temperatura ambiente (en un rango aproximado de 21°C - 24°C) con libre acceso a alimento y agua.

e. Disección de tráquea y montaje de preparación

Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (75 mg kg^{-1}), posteriormente se realizó la traqueotomía, limpiando la tráquea del exceso de tejido conectivo y grasa; la tráquea limpia se transfirió a una caja Petri que contenía disolución Krebs - Henseleit (KHS). La tráquea fue dividida en ocho anillos pequeños de aproximadamente 2 mm de largo conteniendo de 2- 3 segmentos cartilagosos. El montaje se realizó siguiendo la técnica descrita por Rodríguez- Ramos

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo et al., (2011); cada anillo traqueal fue colocado en un baño de 10 mL conteniendo KHS de composición (mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ · 7 H₂O 1.2, CaCl₂ · 2H₂O 2.5, NaHCO₃ 25, glucosa 11.1. Esta disolución se mantuvo a 37°C, burbujeada con gas carbógeno (5% CO₂- 95% O₂). La tensión isométrica fue registrada a través de un Polígrafo de ocho canales Bio Pack System MP 100, el órgano se sometió a una tensión isométrica inicial de 1.5 g y se le permitió estabilizar por 60 minutos. La preparación se lavó con KHS a intervalos de 15 minutos antes de comenzar los experimentos. Después del periodo de estabilización los anillos traqueales fueron contraídos con una disolución de acetilcolina (Ach) (3 x 10⁻¹ mM) dos veces a intervalos de 30 minutos seguida de lavados con KHS, para así después contraer la preparación con la disolución de carbacol (Cch) (1 mM).

f. Evaluación del efecto relajante de timol, salbutamol e ipratropio

Después de contraer los anillos traqueales con Cch (1 mM) y alcanzar la meseta se aplicaron concentraciones acumulativas (31.62, 56.23, 100.00, 177.83 y 316.2 µg/ mL) de timol, para producir los efectos relajantes a la tráquea, esperando que el tejido alcanzara un estado estacionario en cada concentración. El mismo procedimiento se realizó para construir la curva concentración - respuesta de salbutamol (2.39x 10⁻⁴, 2.39x 10⁻³, 0.023, 0.23 y 2.39 µg/ mL) y bromuro de ipratropio (7.3x 10⁻⁵, 4.1x 10⁻³, 7.3x 10⁻⁴, 1.3x 10⁻³, 2.3x10⁻³µg/ mL).

Los controles para las curvas concentración respuesta, tanto de las sustancias puras como de las combinaciones; fueron elaborados con una gota de tween 80 en 3 mL de agua.

g. Evaluación del efecto relajante de las interacciones de timol con ipratropio y timol con salbutamol

El efecto relajante de las interacciones entre timol con los dos fármacos antiasmáticos se evaluó siguiendo la misma metodología utilizada en la evaluación del efecto relajante de los compuestos individuales. Una vez estabilizada la preparación, el tejido se contrajo con carbacol (1 mM), se esperó a que el tejido alcanzara la meseta para aplicar las concentraciones acumulativas de las combinaciones de timol y salbutamol y de timol e ipratropio para las tres proporciones estudiadas (1:1, 1: 3 y 3:1). Las concentraciones de cada compuesto se agregaron de forma simultánea con un intervalo mínimo de tiempo a

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

las concentraciones indicadas en los Cuadros 5 y 6 determinadas a partir de las concentraciones efectivas 50 de los fármacos individuales (Cuadro 4).

h. Determinación de las curvas concentración - respuesta

Se construyeron las curvas concentración - respuesta de timol, bromuro de ipratropio, salbutamol y las diferentes combinaciones. La concentración que provocó el 50% de efecto relajante (CE_{50}) para los compuestos individuales y en las diferentes combinaciones se calculó por un ajuste no lineal utilizando la Ecuación de Hill (Tallarida, 2000).

i. Análisis estadístico

Se comparó el valor de Z_{exp} con el de Z_{ad} por un análisis estadístico que se basa en la prueba de t de Student, éste análisis está modificado para aplicarse al análisis isobolográfico (Tallarida et al., 1997 a; Tallarida, 2000). Los valores de Z_{exp} menores que Z_{ad} fueron interpretados como una interacción *superaditiva* cuando la diferencia fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en ambas direcciones de los ejes X y Y. Para un valor de Z_{exp} mayor que Z_{ad} la combinación se interpretó como *subaditiva*, cuando no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los valores de Z_{exp} y Z_{ad} , se interpretó como la ausencia de interacción, declarándose una combinación con relación *aditiva* (Tallarida, 2000; 2006).

Se realizó un análisis fraccional para obtener un valor que describiera la magnitud de la interacción (M) para cada combinación utilizando los valores de las CE_{50} de las sustancias individuales (timol, ipratropio y salbutamol) y de la combinación de acuerdo a la relación $a/A + b/B$, para lo cual A y B son los valores de las CE_{50} cuando cada fármaco actúa individualmente y a y b son las cantidades con las que contribuye cada fármaco en la combinación, este valor mide cuanto difiere el valor de la CE_{50} experimental (Z_{exp}) del valor de la CE_{50} teórico (Z_{ad}) de cada combinación (Tallarida, 2000). Cuando $a/A + b/B$ fue estadísticamente significativo > 1 se interpretó como una interacción de la combinación *subaditiva* y cuando $a/A + b/B$ fue < 1 se consideró como una relación *superaditiva*. Finalmente cuando $a/A + b/B$ no fue estadísticamente diferente de 1 se interpretó el efecto como ausencia de interacción y la relación se definió como *aditiva* (Tallarida, 2000).

j. Representación gráfica de la interacción

Los isobogramas para el estudio de la interacción fueron construidos uniendo los valores de CE_{50} del fármaco más potente en el eje de las ordenadas y del fármaco menos potente en el eje de las abscisas para obtener el área de aditividad (Tallarida, 2006). Debido a que las curvas concentración respuesta presentaron potencia variable con pendientes diferentes y diferentes valores del número de Hill, se estimaron los valores de las coordenadas cartesianas del par (a, b) para definir el área de aditividad (Tallarida, 2006). En la misma gráfica se representaron la contribución de cada fármaco en la interacción (Z_{exp}) y la dosis efectiva teórica (Z_{ad}). Los pares (a, b) de la curvilínea cóncava se calcularon por la relación:

$$b = B_{50} \left(\frac{Ai - a}{A_{50}} \right)^{q/p}$$

y los pares la curvilínea convexa por la relación:

$$b = Bi - \frac{B_{50}}{\left(\frac{A_{50}}{a} \right)^{q/p}}$$

En ambas relaciones se asignó el valor de a (coordenada en el eje de las "x" del fármaco menos potente) para calcular el valor de b (coordenada en el eje de las "y" del fármaco más potente).

VI. RESULTADOS.

La ventana de actividad del efecto relajante de timol en el modelo de tráquea aislada de cobayo se encontró entre 31.62 y 316.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la Figura 3 se muestra la curva concentración- respuesta del efecto relajante de timol, encontrándose como concentración efectiva 50 para este compuesto la concentración de $141.8 \pm 6.42 \mu\text{g}/\text{mL}$, con número de Hill = 2.221.

Las concentraciones efectivas 50 (CE_{50}) y el número de Hill correspondiente para timol y los fármacos salbutamol e ipratropio se presentan en el Cuadro 4 y en las Figuras 4 y 5 se presentan las curvas concentración respuesta para salbutamol e ipratropio respectivamente.

Cuadro 4. Valores de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) y del número de Hill para timol, ipratropio y salbutamol en el modelo de tráquea aislada de cobayo.

Fármaco/ compuesto	$\text{CE}_{50} \pm \text{EEM} (\mu\text{g}/\text{mL})$	No. Hill
Timol	141.80 ± 6.42	2.221
Ipratropio	$8.05 \times 10^{-4} \pm 7.17 \times 10^{-5}$	3.211
Salbutamol	$9.60 \times 10^{-3} \pm 3.03 \times 10^{-3}$	1.098

En los Cuadros 5 y 6 se presentan las concentraciones de las combinaciones de timol: ipratropio y timol: salbutamol utilizadas para realizar los experimentos de la interacción y fueron calculadas a partir de las CE_{50} de los fármacos individuales (Cuadro 4). En vista de que las curvas concentración- respuesta del timol e ipratropio y de timol y salbutamol no presentaron paralelismo, indicado por los valores del número de Hill (Cuadro 4), además se demostró la ausencia de paralelismo entre las curvas ($p > 0.05$) (Tallarida, 2000), se realizó la corrección detallada por Tallarida (2006) para cuando las curvas concentración respuesta de los fármacos involucrados tienen potencia variable.

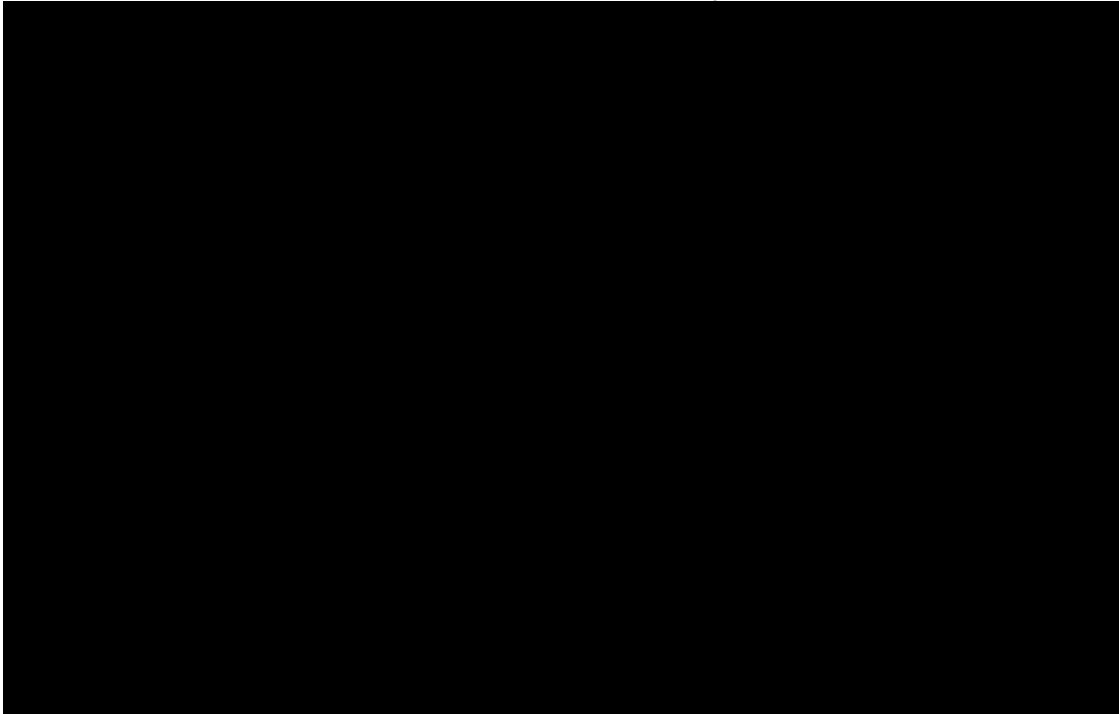


Figura 3. Curva concentración- respuesta del efecto relajante de timol en el modelo de tráquea aislada de cobayo. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y la línea continua al ajuste utilizando el ajuste no lineal de la ecuación de Hill. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 experimentos.

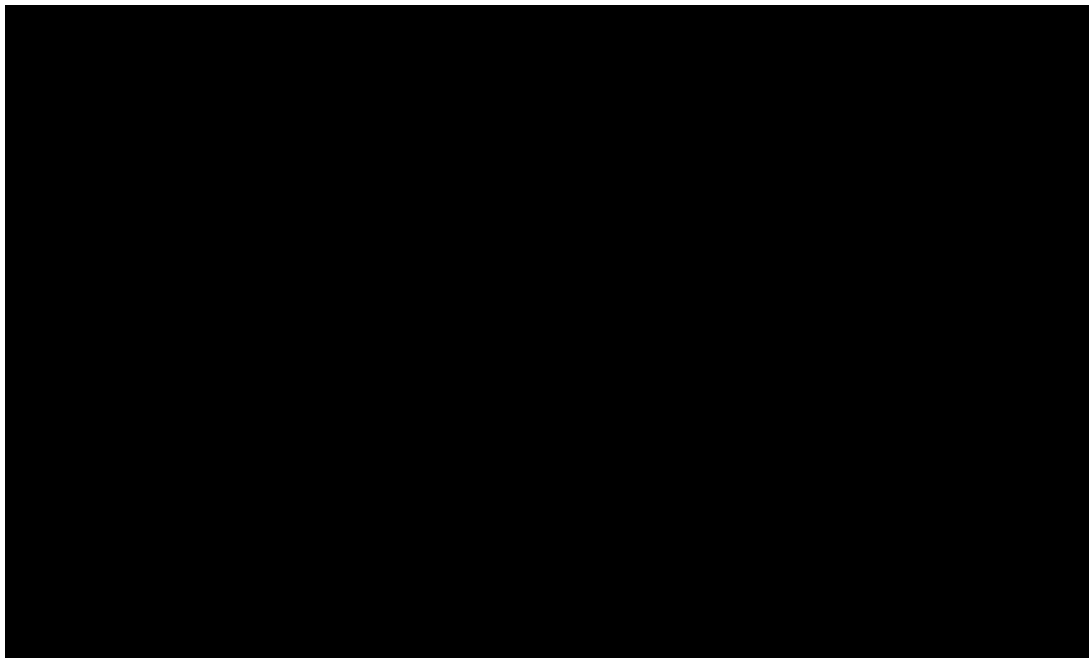


Figura 4. Curva concentración- respuesta del efecto relajante de salbutamol en el modelo de tráquea aislada de cobayo. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y la línea continua al ajuste utilizando el ajuste no lineal de la ecuación de Hill. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 experimentos.

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

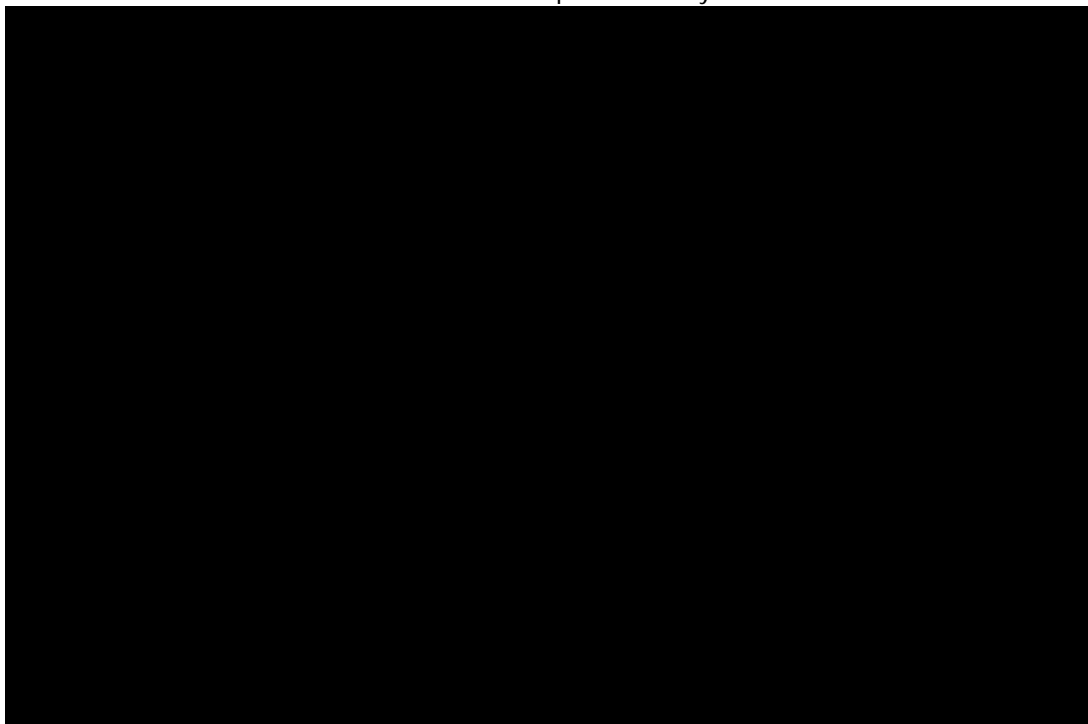


Figura 5. Curva concentración- respuesta del efecto relajante de bromuro de ipratropio en el modelo de tráquea aislada de cobayo. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y la línea continua al ajuste utilizando el ajuste no lineal de la ecuación de Hill. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 experimentos.

Análisis isoblográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

Cuadro 5. Concentraciones utilizadas en la evaluación de las interacciones entre timol y bromuro de ipratropio.

Combinación 1:1 timol : ipratropio [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
Timol	Ipratropio	Total
8.8625	5.03×10^{-5}	8.8626
17.7252	1.01×10^{-4}	17.7251
35.4500	2.01×10^{-4}	35.4502
70.9000	4.02×10^{-4}	70.9004
141.8000	8.05×10^{-4}	141.8008
283.6000	1.61×10^{-3}	283.6016
Combinación 1:3 timol : ipratropio [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
Timol	Ipratropio	Total
8.8625	1.51×10^{-4}	8.8626
17.7252	3.02×10^{-4}	17.7255
35.4504	6.04×10^{-4}	35.4510
43.6508	7.10×10^{-4}	43.6515
47.2520	9.06×10^{-4}	47.2529
70.9008	1.21×10^{-3}	70.9020
88.6250	1.51×10^{-3}	88.6265
Combinación 3:1 timol : ipratropio [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
Timol	Ipratropio	Total
27.2255	5.03×10^{-5}	27.2256
54.4511	1.01×10^{-4}	54.4512
68.0639	1.26×10^{-4}	68.0640
85.0799	1.50×10^{-4}	85.0800
106.3500	2.01×10^{-4}	106.3502
212.7000	4.03×10^{-4}	212.7004

Análisis isoblográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

Cuadro 6. Concentraciones utilizadas para la evaluación del efecto relajante de la interacción entre timol y salbutamol

Combinación 1:1 timol : salbutamol [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
Timol	Salbutamol	Total
8.8625	6.04×10^{-4}	8.8631
17.7252	1.21×10^{-3}	17.7262
35.4500	2.42×10^{-3}	35.4524
70.9000	4.84×10^{-3}	70.9048
141.8000	9.67×10^{-3}	141.8097
283.6000	1.93×10^{-2}	283.6193
Combinación 1:3 timol : salbutamol [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
Timol	Salbutamol	Total
10.5037	5.39×10^{-4}	10.5042
15.7556	8.09×10^{-4}	15.7564
23.6333	1.21×10^{-3}	23.6345
35.4500	1.82×10^{-3}	35.4518
53.1750	2.73×10^{-3}	53.1777
79.7625	410×10^{-3}	79.7666
Combinación 3:1 timol : salbutamol [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		
Timol	Salbutamol	Total
6.646875	1.26×10^{-5}	6.6469
13.29375	2.512×10^{-5}	13.2938
26.5875	5.03×10^{-5}	26.5876
53.1750	1.01×10^{-4}	53.1751
106.3500	2.01×10^{-4}	106.3502
159.5250	3.02×10^{-4}	159.5253

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

En las Figuras 6, 7 y 8 se presentan las curvas concentración- respuesta de las combinaciones 1:1, 1:3 y 3:1 de timol: ipratropio y de los fármacos solos así como la curva concentración- respuesta teórica de cada combinación. En el Cuadro 4 se puede apreciar que el número de Hill obtenido para timol (número de Hill= 2.221) es diferente al valor del número de Hill para bromuro de ipratropio (3.211), por lo que la comparación se realizó para agonistas completos con potencia variable (Tallarida, 2006). Los valores de las CE_{50} teóricas (Z_{ad}) para dos de las tres combinaciones ensayadas entre timol y bromuro de ipratropio (1:1 y 3:1) fueron significativamente ($p < 0.05$) mayores a las CE_{50} experimentales (Z_{exp}) y el valor de la magnitud de la interacción fue significativamente ($p < 0.05$) menor a 1 (Cuadro 7) lo que sugiere una interacción superaditiva entre timol y bromuro de ipratropio como se aprecia en el isoblograma correspondiente (Figura 9). Para la combinación 1:3 la CE_{50} experimental (Z_{exp}) no fue estadísticamente diferente de la CE_{50} teórica (Z_{ad}) por lo que no se encontró interacción en esta proporción de la combinación (Figura 9, Cuadro 7).

El timol presentó una interacción superaditiva con el salbutamol en la combinación 3:1 (Cuadro 8), en tanto que las combinaciones 1:1 y 1:3 presentaron una relación aditiva (Cuadro 8). Las curvas concentración- respuesta para estas últimas combinaciones son muy cercanas a las curvas de concentración- respuesta teóricas (Figuras 10 y 11), en tanto que se aprecia un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración- respuesta experimental respecto a la curva teórica para la combinación 3:1 (Figura 12). En el isoblograma (Figura 13) se aprecia mejor la interacción entre timol y salbutamol; las coordenadas de los valores experimentales de las concentración equiefectiva ($Z_{exp} = 56.000 \pm 5.367 \mu\text{g/ mL}$) en las combinaciones 3:1 están por debajo de las coordenadas del valor teórico ($80.002 \pm 0.101 \mu\text{g/ mL}$) correspondiente en la curva inferior de la isobola (Figura 13). Por el contrario las coordenadas de la combinación 1:1 experimental ($Z_{exp} = 53.100 \pm 5.376 \mu\text{g/ mL}$) coincide con el valor teórico ($53.684 \pm 0.183 \mu\text{g/ mL}$) de la curva inferior de la isobola (Figura 13), en tanto que las coordenadas de la combinación 1:3 experimental ($Z_{exp} = 43.610 \pm 2.696 \mu\text{g/ mL}$) coincide con el valor teórico ($42.549 \pm 0.2647 \mu\text{g/ mL}$) de la curva superior de la isobola (Figura 13).

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

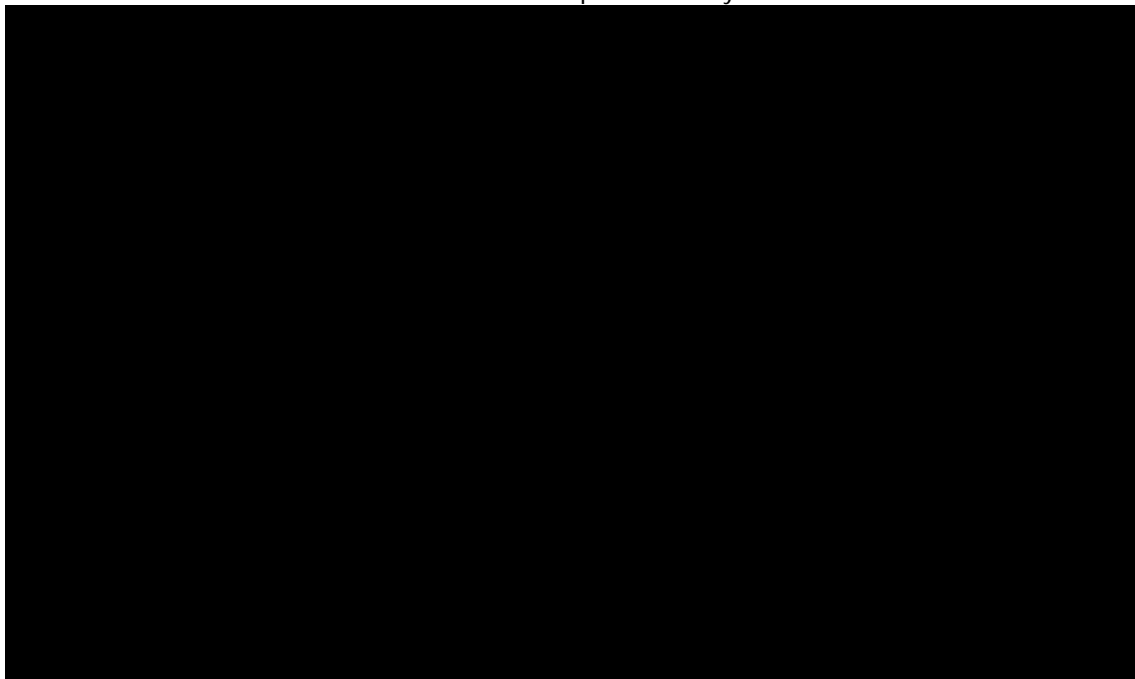


Figura 6. Comparación de las curvas concentración- respuesta experimental y teórica del efecto relajante de la interacción de la combinación 1:1 entre timol y bromuro de ipratropio en anillos de tráquea aislada de cobayo. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 experimentos.

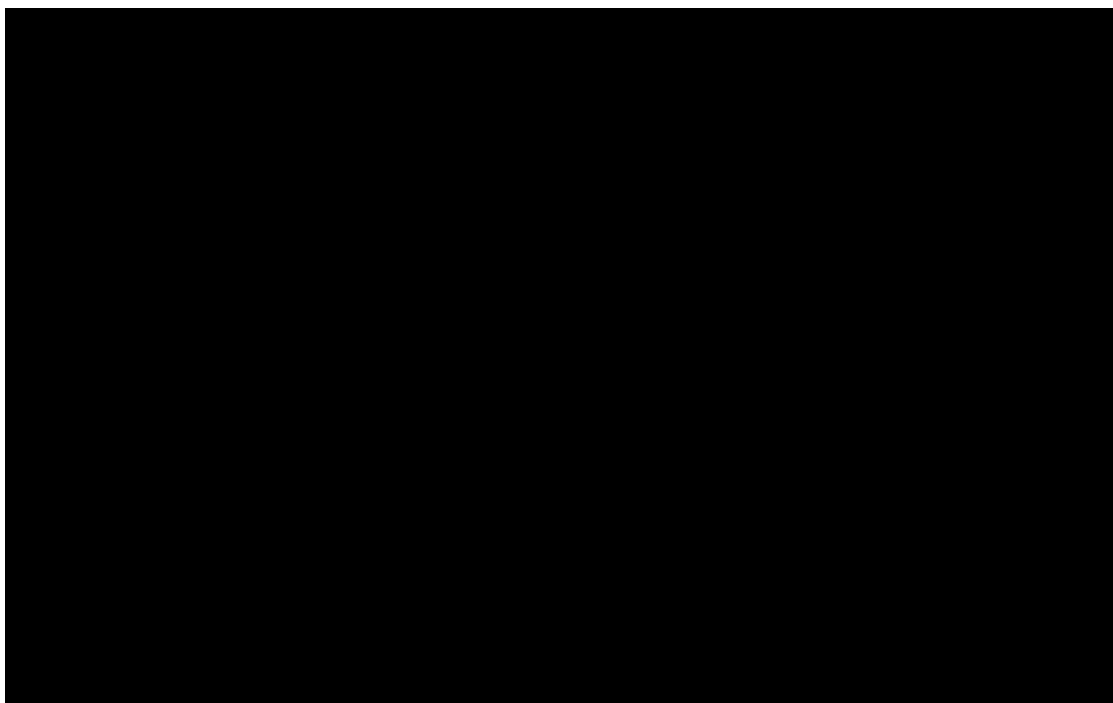


Figura 7. Comparación de las respuestas teórica y experimental inducida por las concentraciones de la combinación 1:3 entre timol y bromuro de ipratropio en el efecto relajante en el modelo de tráquea aislada de cobayo. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 experimentos.

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

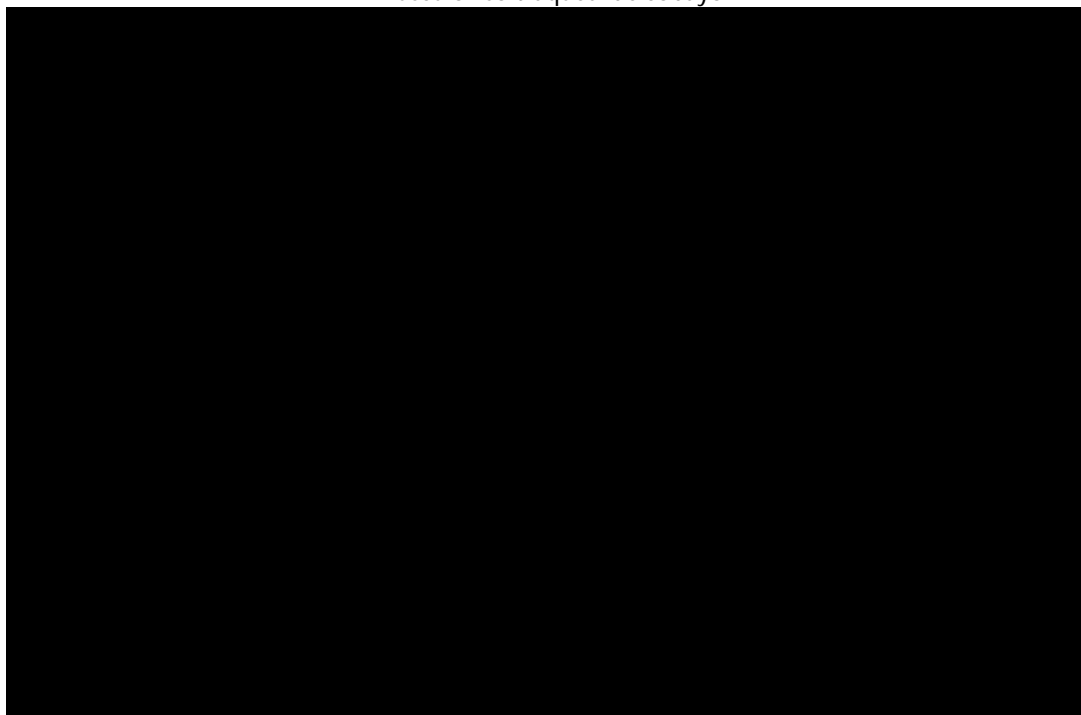


Figura 8. Curva concentración- respuesta del efecto relajante de la interacción de la combinación 3:1 entre timol y bromuro de ipratropio en tráquea aislada de cobayo. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 experimentos. Se representa la repuesta teórica que debió ser inducida.

Cuadro 7. Comparación de Z_{ad} y Z_{exp} de las combinaciones de la interacción de timol con bromuro de ipratropio, *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre Z_{ad} y Z_{exp}

	Timol : ipratropio $CE_{50} \pm$ EEM ($\mu\text{g/ mL}$)		
	Z_{ad}	Z_{exp}	Magnitud de la interacción
1:1	62.330 ± 0.039	32.740 ± 3.315	0.46*
1:3	30.771 ± 0.049	25.980 ± 1.434	0.73
3:1	99.260 ± 0.029	65.830 ± 1.350	0.61*

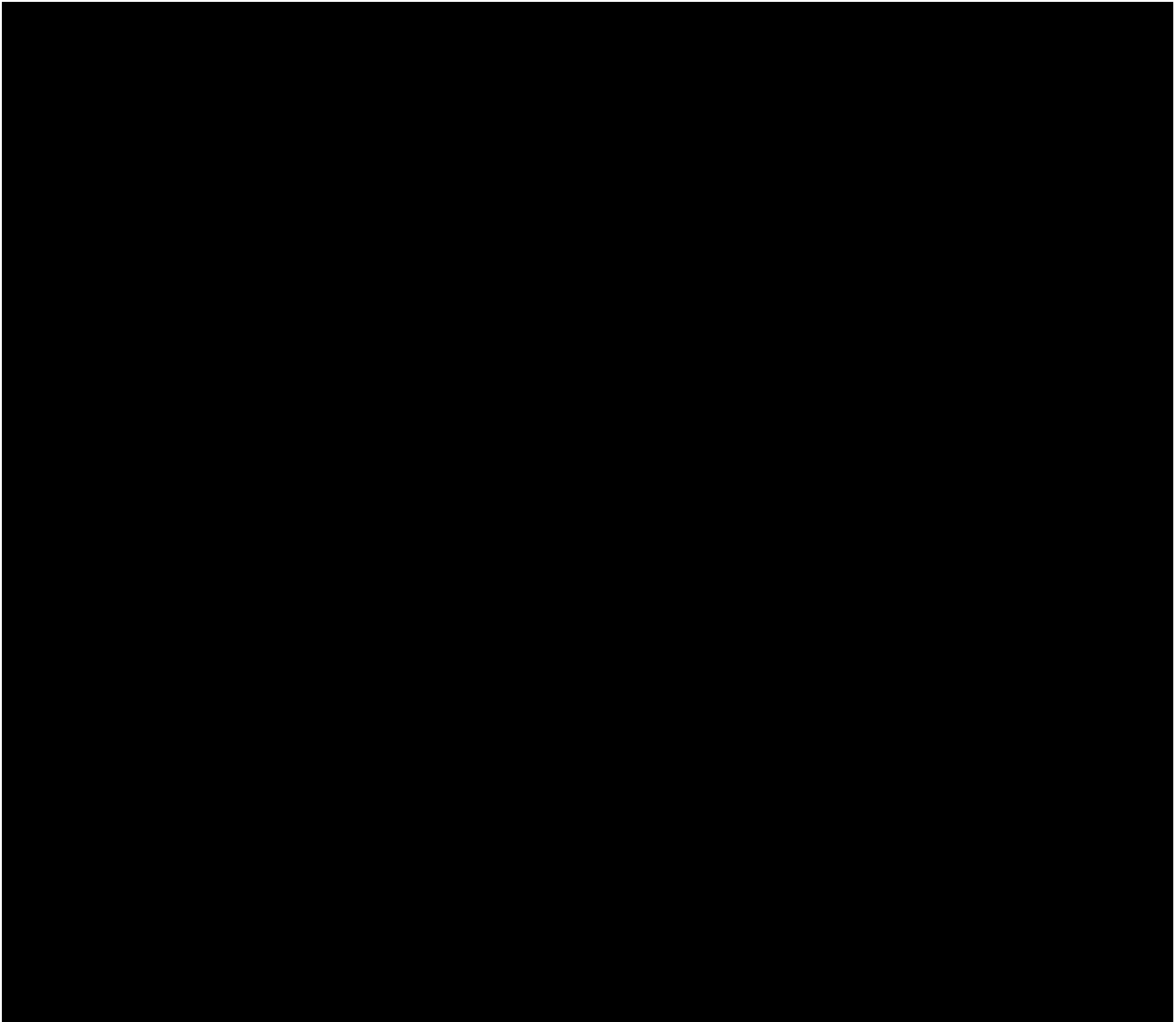


Figura 9. Isoblograma de la interacción de timol y bromuro de ipratropio en tráquea aislada de cobayo. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 experimentos, * $p < 0.05$ entre Z_{ad} y Z_{exp} .

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

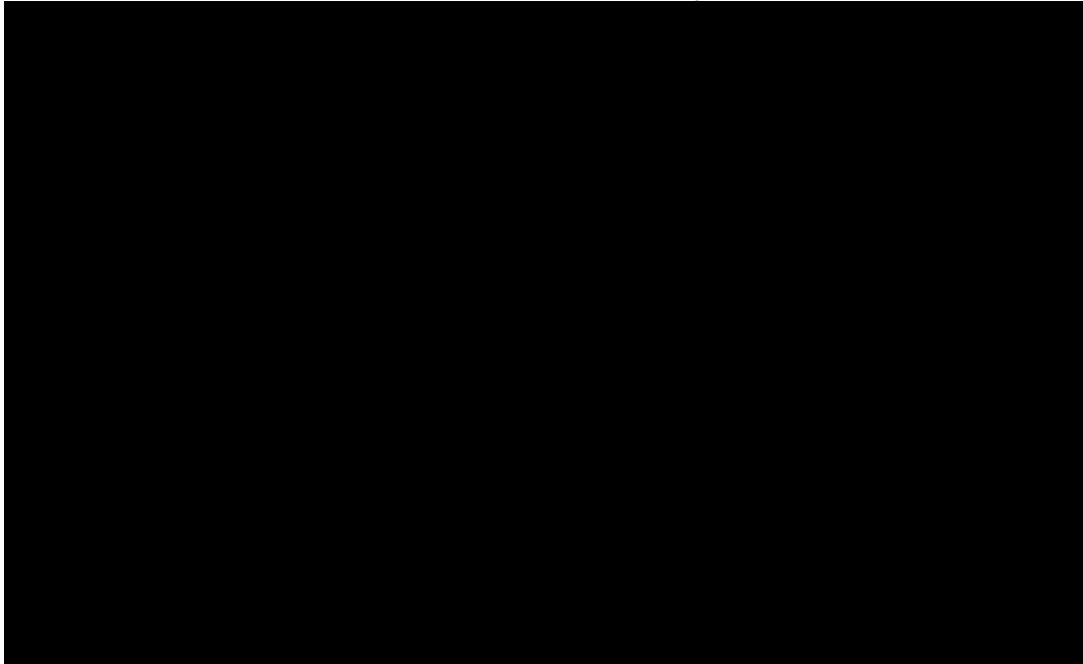


Figura 10. Curvas concentración- respuesta teórica y experimental del efecto relajante en el modelo de tráquea aislada de cobayo de la interacción de la combinación 1:1 de timol con salbutamol. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 experimentos.

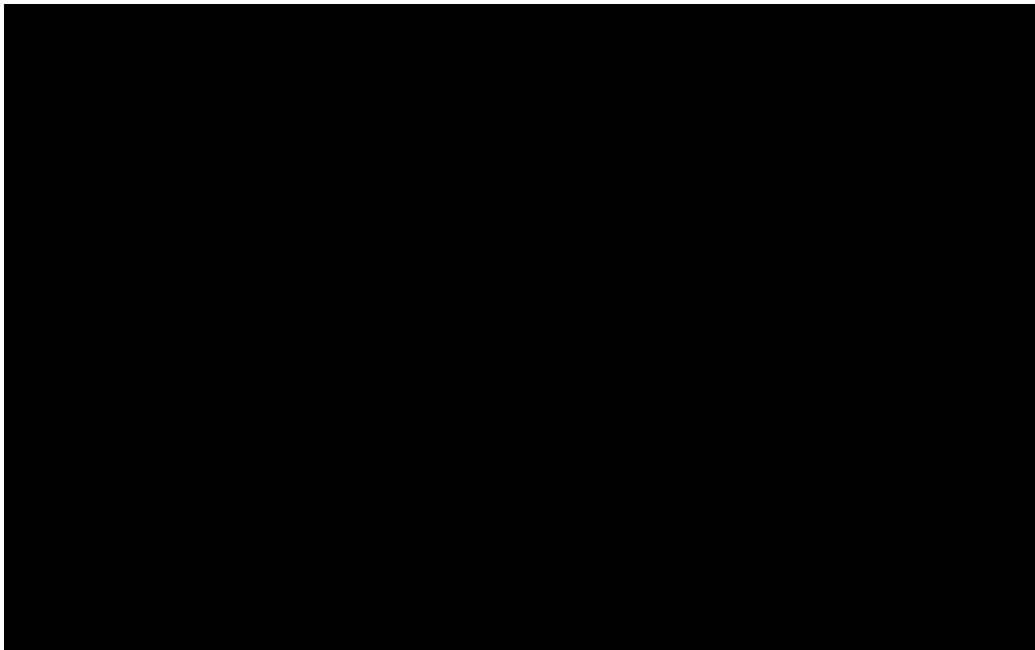


Figura 11. Comparación de las respuestas teórica y experimental inducida por las concentraciones de la combinación 1:3 entre timol y salbutamol en tráquea aislada de cobayo. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 experimentos.

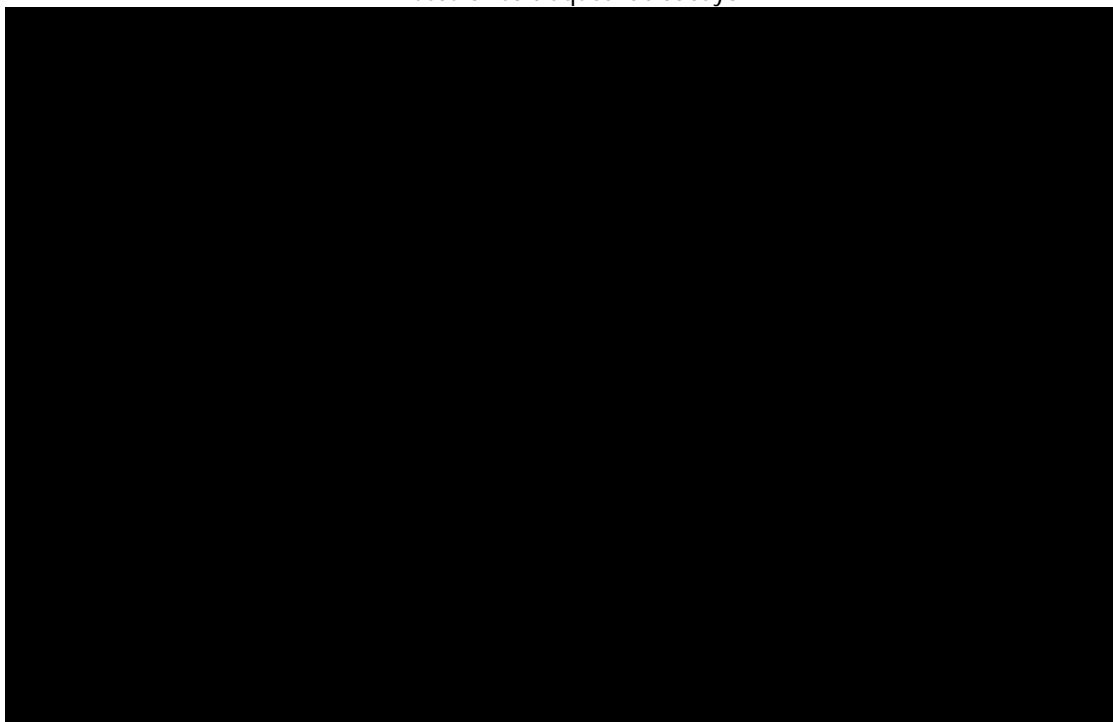


Figura 12. Curva concentración- respuesta del efecto relajante de la interacción de la combinación 3:1 entre timol y salbutamol en anillos de tráquea aislada de cobayo. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 experimentos.

Cuadro 8. Comparación de Z_{ad} y Z_{exp} de las combinaciones de la interacción de timol con salbutamol, * diferencia significativa ($p < 0.05$) entre Z_{ad} y Z_{exp} .

	Timol : salbutamol $CE_{50} \pm$ EEM ($\mu\text{g/ mL}$)		
	Z_{ad}	Z_{exp}	Magnitud de la interacción
1:1	53.684 ± 0.1830	53.100 ± 5.376	0.75
1:3	42.549 ± 0.2647	43.610 ± 2.696	1.24
3:1	80.002 ± 0.1013	56.000 ± 5.367	0.52*

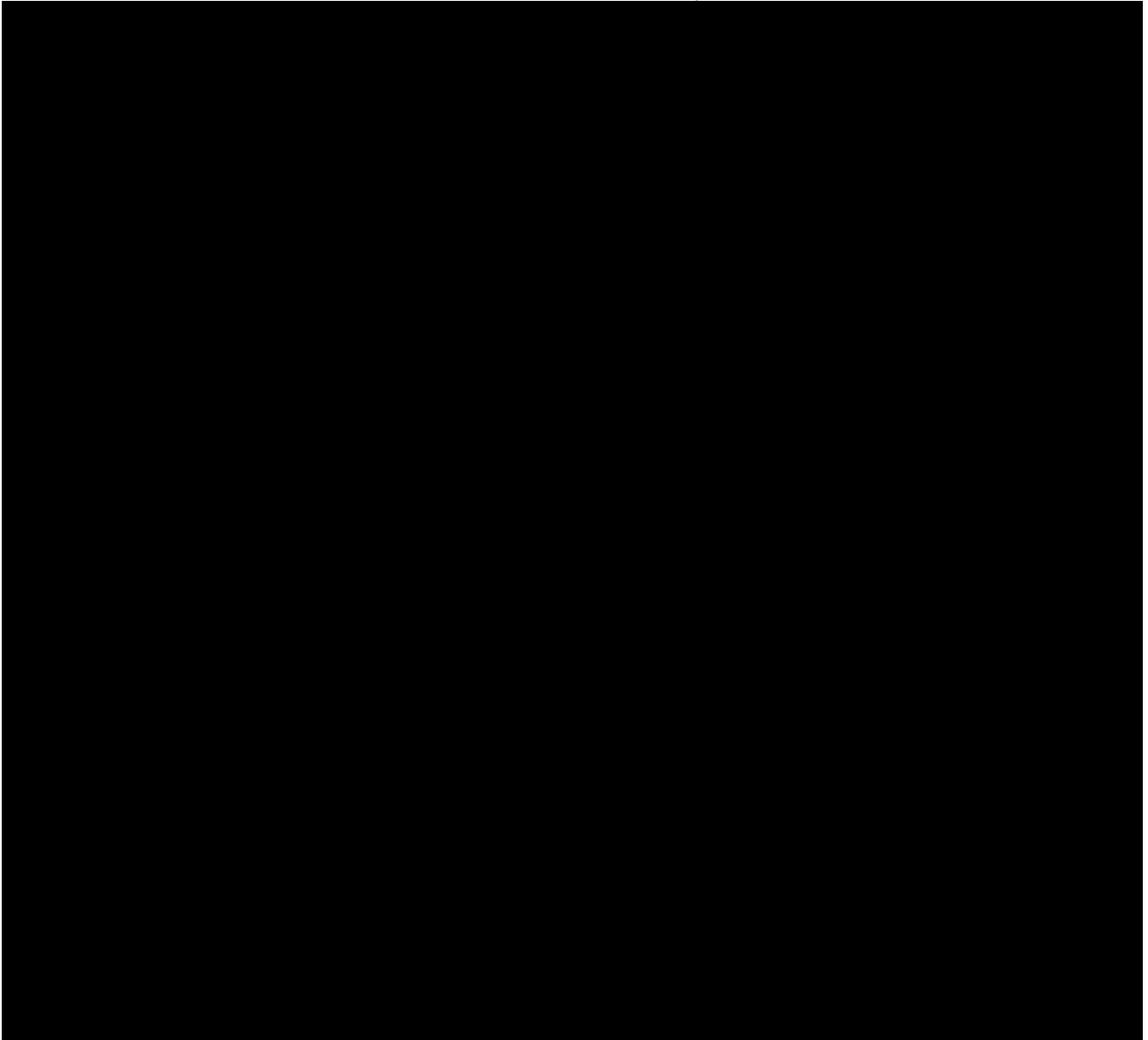


Figura 13. Isoblograma de la interacción de timol y salbutamol en tráquea aislada de cobayo. Cada punto representa la media \pm EEM de al menos 6 animales, * diferencia significativa ($p < 0.05$) entre Z_{ad} y Z_{exp} .

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los efectos relajantes de timol en tráquea aislada de cobayo (Astudillo et al., 2004) y en tráquea aislada de rata se ha demostrado con anterioridad (Begrow et al., 2010). En este trabajo mediante el análisis isobolográfico se demostró que el timol tiene un efecto superaditiva con ipratropio para relajar el músculo liso de tráquea de cobayo cuando se combina en las proporciones fijas timol: ipratropio 1:1 y 3:1 (Cuadro 7, Figura 9). Sin embargo en la combinación en la cual el timol se encuentra en menor proporción (timol: ipratropio 1:3) no se presentó el efecto superaditivo (Cuadro 7). Con salbutamol, otro fármaco antiasmático y relajante de la musculatura lisa traqueal, únicamente se presentó el efecto superaditivo en la proporción timol: salbutamol 3:1, es decir cuando el timol se encuentra en la mayor proporción (Cuadro 8). Esto último puede deberse a que de acuerdo a lo descrito por Beer y colaboradores (2007) el timol actúa como agonista de los receptores β - adrenérgicos, por lo que se presenta una relación aditiva ya que tanto timol como salbutamol actúan por el mismo mecanismo de acción, como ocurre con otros fármacos que actúan por un mecanismo de acción común (Miranda et al., 2001). El uso de isobogramas permite caracterizar las relaciones *superaditivas o sinergistas*, *subaditivas o atenuantes* y las relaciones *aditivas* cuando se aplican dos fármacos simultáneamente a un sistema biológico en el que provocan un efecto similar (Gravovsky & Tallarida, 2004). La forma usual de un isobograma ocurre como una línea recta (*línea de aditividad*) que conecta los interceptos que representan individualmente las dosis efectivas de cada fármaco Z_1 y Z_2 (Tallarida, 2000). Generalmente esta línea es la referencia para distinguir entre la existencia (*sinergismo o atenuación*) o la ausencia (*aditividad*) de interacciones entre los fármacos que se combinan (Tallarida, 2000) de acuerdo a si existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores teóricos que se encuentran sobre esta línea (Z_{ad}) y los valores experimentales (Z_{exp}). Si bien el análisis isobolográfico data de la primera mitad del siglo XX, a partir de la segunda mitad de la década de 1990 se retomó y han aparecido un número importante de publicaciones, la mayoría de las cuales utiliza el análisis isobolográfico de manera inadecuada; principalmente por considerar que la potencia es constante para diferentes niveles de efecto de los fármacos de la combinación, lo que involucra considerar que las curvas dosis- respuesta son paralelas y que la línea de aditividad aparece como una línea recta en el isobograma (Tallarida, 2006). El considerar que en todo momento el isobograma corresponde a una línea recta, involucra un error si

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

no existe paralelismo entre las curvas concentración- respuesta de los fármacos involucrados al momento de definir la existencia o no de interacción (Tallarida, 2006), ya que la línea recta en el isoblograma sólo se presenta cuando existe paralelismo entre las curvas concentración- respuesta en una regresión lineal o cuando el valor del número de Hill es el mismo en una regresión no lineal y por lo tanto la potencia es constante para diferentes niveles de efecto (Tallarida, 2006). Cuando las curvas concentración- respuesta no son paralelas el isoblograma aparece como una curva cóncava o convexa (Tallarida, 2006). Para el caso particular de este estudio, la curva concentración- respuesta de timol no fue paralela con las curvas concentración- respuesta de bromuro de ipratropio y de salbutamol (Figuras 3 a 5) descritas por los valores diferentes del número de Hill; el número de Hill para timol fue de 2.221, en tanto que para bromuro de ipratropio y para salbutamol fueron de 3.211 y 1.098 respectivamente (Cuadro 4). Por esta razón se utilizó

la relación $b = B_{50} \left(\frac{A_i - a}{A_{50}} \right)^{\frac{q}{p}}$ para calcular la curva cóncava de aditividad de la isobola y la relación $b = B_i - \frac{B_{50}}{\left(\frac{A_{50}}{a} \right)^{q/p}}$ para calcular la curva convexa de aditividad de la isobola

(Tallarida, 2006). En la ecuación anterior A_{50} y B_{50} corresponden a las CE_{50} de cada fármaco en la combinación; A_i y B_i corresponde a las CE_i , es decir el valor de la concentración efectiva a un nivel de respuesta por ejemplo CE_{30} , CE_{40} , CE_{60} , etc.; p es el número de Hill del fármaco más potente y q es el número de Hill del fármaco menos potente. Con estas ecuaciones se dieron valores de a para calcular el valor de b para formar el par (a, b) de las coordenadas cartesianas de las isobolas aditivas teóricas cóncavas y convexas de las combinaciones evaluadas, resultando los isobogramas representados en las Figuras 9 y 13, con lo que fue posible definir los puntos teóricos para la comparación de los valores de las curvas aditivas (Z_{ad}) para las combinaciones 1:1, 1:3 y 3:1 con los valores experimentales (Z_{exp}), que se muestran en los Cuadros 7 y 8 para las interacciones de timol: ipratropio y de timol: salbutamol respectivamente. Es importante señalar que de no haber considerado que existe una relación curvilínea, el valor experimental de la relación timol: ipratropio 1:3 ($Z_{exp} = 25.980 \pm 1.434 \mu\text{g}/\text{mL}$; Cuadro 7) alcanzaría diferencia significativa con el valor teórico en la línea de aditividad considerando valores del número de Hill iguales, lo que llevaría a interpretar que existe una interacción superaditiva cuando en realidad existe una relación aditiva (Figura 9) ya que no existe

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

diferencia significativa entre el valor experimental ($Z_{\text{exp}} = 25.980 \pm 1.434 \mu\text{g}/\text{mL}$) y el valor teórico ($Z_{\text{ad}} = 30.771 \pm 0.049 \mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la curva cóncava para esta combinación. Para el caso de la combinación timol: salbutamol, los valores experimentales de la CE_{50} (Z_{exp}) para las proporciones 1:1 y 1:3, fueron iguales a los valores teóricos en las curvilíneas cóncava ($Z_{\text{exp}} = 53.100 \pm 5.376 \mu\text{g}/\text{mL}$ vs $Z_{\text{ad}} = 53.684 \pm 0.183 \mu\text{g}/\text{mL}$) y convexa ($Z_{\text{exp}} = 43.61 \pm 2.696 \mu\text{g}/\text{mL}$ vs $Z_{\text{ad}} = 42.549 \pm 0.2647 \mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente (Figura 13) y sólo en la proporción timol: salbutamol 3:1 se presentó interacción superaitiva ($Z_{\text{exp}} = 56.000 \pm 5.367 \mu\text{g}/\text{mL}$ vs $Z_{\text{ad}} = 80.002 \pm 0.101 \mu\text{g}/\text{mL}$; Figura 13). Además de los valores distintos del número de Hill de los fármacos evaluados, la falta de paralelismo en las curvas concentración- respuesta y la potencia variable se pudo apreciar al construir los isobogramas para timol: ipratropio (Figura 14) y para timol: salbutamol (Figura 15) para diferentes concentraciones relajantes efectivas (CE_{30} , CE_{40} , CE_{50} , CE_{60} y CE_{70}). Para la combinación timol: salbutamol se aprecia una mayor desviación de la linearidad en el isobograma debido a que el cociente de los números de Hill (Cuadro 4) de timol ($q = 2.221$) y salbutamol ($p = 1.098$) es mayor ($q/p = 2.022$) al cociente ($q/p = 0.691$) de los números de Hill de timol ($q = 2.221$) e ipratropio ($p = 3.211$).

La interacción de timol con ipratropio fue superaitiva en la combinación 1:1 reduciendo la Z_{exp} a aproximadamente la mitad de la concentración efectiva 50 teórica (Z_{ad}) para producir el mismo nivel de efecto (Cuadro 7, Figura 9), en tanto que la combinación 3:1 redujo la Z_{exp} en un 30% el valor de la Z_{ad} (Cuadro 7, Figura 9). La potenciación del efecto se debe probablemente a que timol y bromuro de ipratropio actúan simultáneamente por mecanismos diferentes en la tráquea de cobayo; mientras que timol actúa sobre receptores β - adrenérgicos (Beer et al., 2007), el bromuro de ipratropio actúa como antagonista de los receptores M_3 colinérgicos (Mendoza, 2008; Abad et al., 2003; Barnes, 2006). De esta manera, timol aumenta la concentración de AMP_c que favorece la relajación impidiendo la liberación de calcio intracelular e ipratropio actúa para disminuir la concentración de calcio intracelular (iCa^{2+}) por la inhibición de la formación de IP_3 y de esta forma disminuye la contracción del músculo liso de vías aéreas (Barnes, 2006). El timol actúa por dos tipos de receptores situados en tráquea, al ser un agonista β - adrenérgico evita la constricción de la musculatura lisa traqueal activando a la PKA incrementando los niveles de AMP_c y disminuyendo la concentración de calcio intracelular; el timol es además agonista α_1 y α_2

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo adrenérgico. Los agonistas de receptores α provocan efecto descongestionante debido a la vasoconstricción de la mucosa en vías respiratorias según Lorenzo y colaboradores (2007), justificando de esta manera la mayor contribución de timol en la respuesta del tejido.

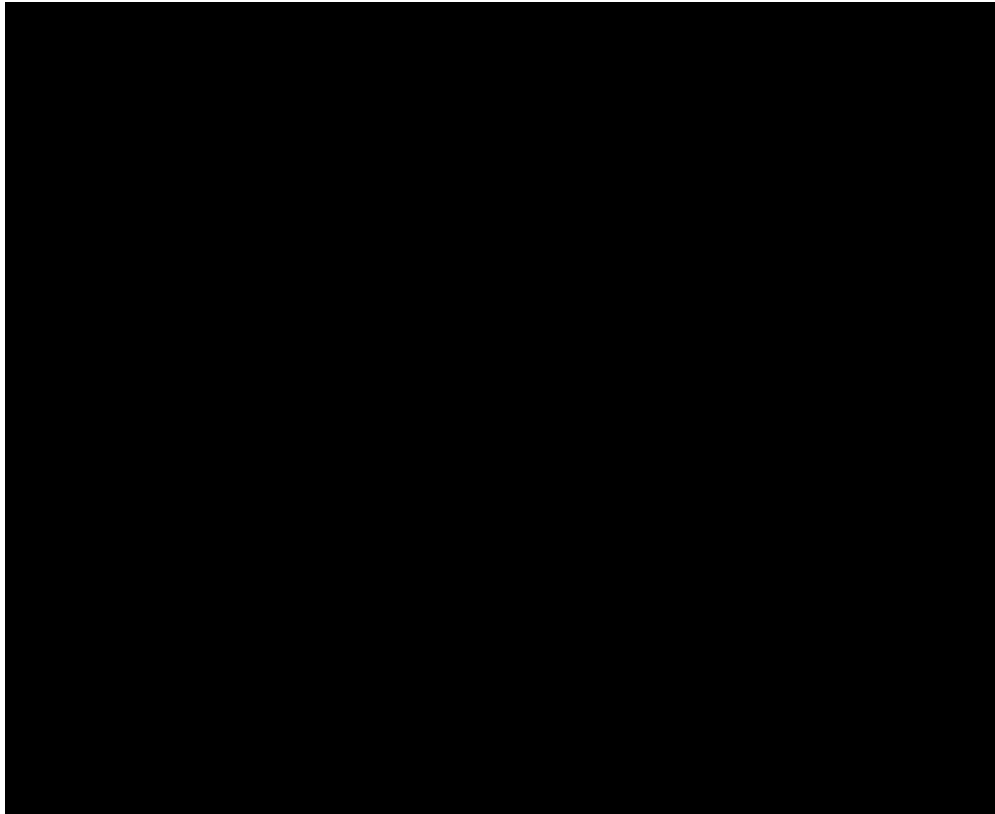


Figura 14. Isobograma para diferentes concentraciones efectivas (30%, 40%, 50%, 60% y 70% de relajación) para la combinación timol: ipratropio. La línea punteada corresponde al isobograma para la combinación timol: ipratropio considerando la CE_{70} de cada fármaco para valores del número de Hill iguales y por lo tanto una potencia constante.

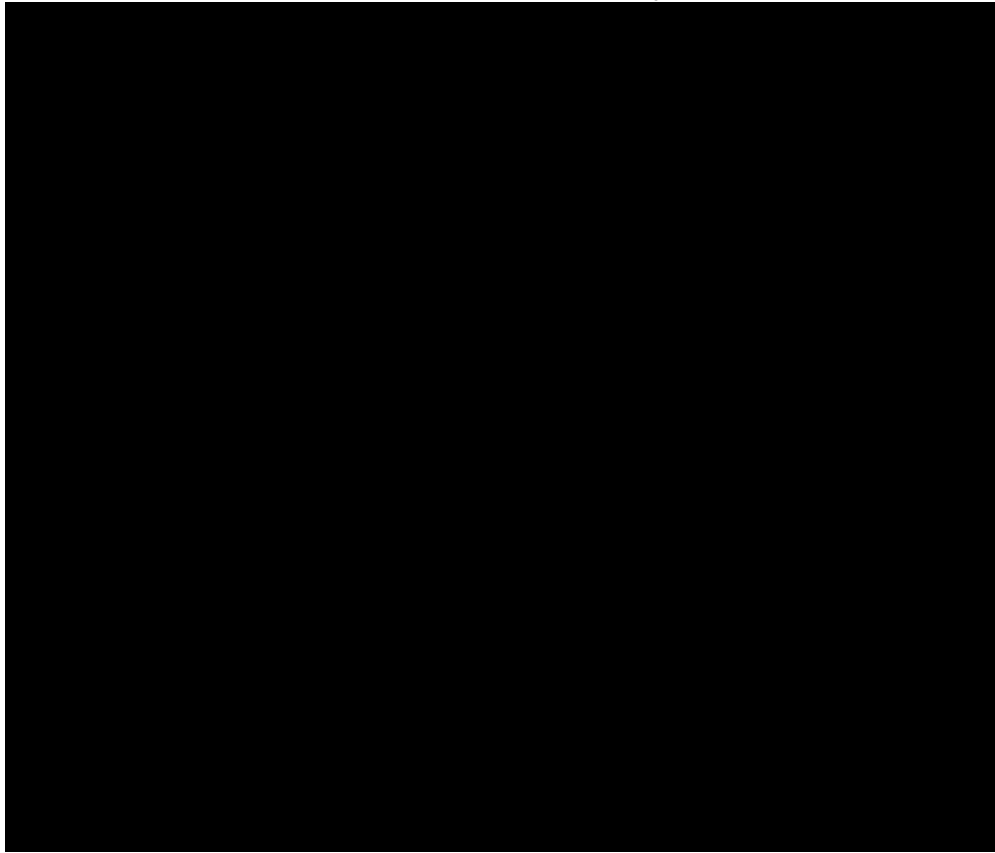


Figura 15. Isoblograma para diferentes concentraciones efectivas (30%, 40%, 50%, 60% y 70% de relajación) para la combinación timol: salbutamol. La línea punteada corresponde al isoblograma para la combinación timol: salbutamol considerando la CE_{70} de cada fármaco para valores del número de Hill iguales y por lo tanto una potencia constante.

Diversos trabajos (Beer et al., 2007; Orriols & Vallano, 2007) indican que tanto el timol como el salbutamol producen relajación del músculo liso de vías aéreas por la activación de receptores adrenérgicos β_2 . Dicho argumento da pie a suponer que existe cierta competencia por los receptores en los que actúan, justificando de esta manera que las combinaciones 1:1 y 1:3 timol: salbutamol sean simplemente una adición del efecto individual de cada fármaco; ya que actúan por el mismo mecanismo pero con diferente potencia siendo el salbutamol más potente y más afín por los receptores β_2 en el modelo probado (Barnes, 2006). Los resultados obtenidos de la combinación 3:1 de timol con salbutamol en la cual la proporción de timol es mayor que en las combinaciones anteriores, la contribución de timol al efecto relajante de las vías aéreas es mayor y por ello potencia el efecto de salbutamol de una manera más franca que cuando se encuentra en

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo
proporciones menores. Una posible explicación es que a mayor cantidad de timol se manifiesten otros de sus mecanismos relajantes como es la inhibición de los canales de sodio en tráquea (Haeseler et al., 2002) y por lo tanto se manifieste el efecto superaditivo relajante (Figura 13).

VIII. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se derivan del presente trabajo son:

1. El timol presentó efecto relajante del músculo liso de vías aéreas de manera dependiente de la concentración, con menor potencia que ipratropio y que salbutamol.
2. Mediante el análisis isobolográfico se determinó que el timol provoca un efecto superaditivo del efecto relajante del músculo liso traqueal de bromuro de ipratropio en las proporciones fijas 1:1 y 3:1 y provocó una relación aditiva en la proporción fija timol: ipratropio 1:3.
3. Mediante el análisis isobolográfico se determinó que timol potencia el efecto relajante del músculo liso traqueal de salbutamol sólo en la proporción fija timol: salbutamol 3:1 y una relación aditiva para las proporciones 1: 1 y 1: 3.
4. Para el análisis isobolográfico se utilizó una relación de agonistas completos con potencia variable debido a que las curvas concentración - respuesta no presentaron paralelismo tanto para la combinación timol: ipratropio como para la combinación timol: salbutamol, dando como resultado líneas cóncavas y convexas en los isobogramas correspondientes.

IX. PERSPECTIVAS

Este trabajo logró demostrar el efecto relajante de timol sobre el músculo liso traqueal de cobayo y de sus interacciones con los fármacos antiasmáticos, bromuro de ipratropio y salbutamol, sin embargo no existe evidencia científica del efecto relajante ocasionado por el aceite y/ o infusión de *Thymus vulgaris* o del timol en el efecto relajante de vías respiratorias, por lo que hace falta realizar estudios *in vivo* e *in situ* de la planta así como del timol y se deberá realizar dichos estudios a las interacciones probadas en este trabajo para comprobar el efecto que tienen en la musculatura bronquial.

De igual manera es necesario evaluar diversas combinaciones que presenten efecto superaditivo entre timol y salbutamol, con el fin de reducir los efectos secundarios ocasionados por dichas sustancias.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, F., Novalbos, J., Gallego, S., Gálvez, M. (2003). Regulación del tono bronquial en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC): papel de los receptores muscarínicos. *Anales de Medicina Interna*.**20** (4); 201- 205.
- Amrani, Y., Panettieri, R. (2003). Airway smooth muscle: contraction and beyond. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* .**35**; 272- 276.
- Astudillo, A., Hong, E., Bye, R., Navarrete, A. (2004). Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *Phytotherapy Research*. **18**; 102- 106.
- Baeza, M., Albertos, N. (1997). Prevalencia de asma en niños escolares de Mérida, Yucatán. *Revista Panamericana de Salud Pública* 2. **5**;299- 302.
- Baños, J., Farré, M. (2002). *Principios de Farmacología Clínica. Bases científicas de la utilización de medicamentos*. Masson, [España];87- 98.
- Barnes, P. (1998). Pharmacology of airways smooth muscle. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **94**; 519- 528.
- Barnes, P. (2000). Chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine*.**343** (4); 269- 281.
- Barnes, P. (2006). Drugs for asthma. *British Journal Pharmacology*. **147**; 297- 303.
- Beer, A.,Lukanov, J., Sagorchev, P. (2007). Effect of thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine*. **14**; 65- 69.
- Begrow, F.,Engelbertz, J.,Feistel, B.,Lehnfeld, R., Bauer, K.,Verspohl, E. (2010). Impact of thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance. *Planta Médica*.**76** (4); 311- 318.
- Bermúdez, I., Real, N., Acosta, J., Rodríguez, A. (1999). Farmacovigilancia intensiva en pacientes adultos y pediátricos. *Revista Cubana de Farmacia*. **33** (2); 111- 115.

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

- Boskabady, M., Aslani, M., Kiani, S. (2006). Relaxant effect of *Thymus vulgaris* on Guinea-pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *Phytotherapy Research*. **20**; 28- 33.
- Britton, M., Earnshaw, J., Palmer, J. (1992). A twelve month comparison of salmeterol with salbutamol in asthmatic patients. European Study Group. *European Respiratory Journal*. **5**; 1062- 1067.
- Busquets, R., Escribano, A., Fernández, M., García - Marcos, L., Garde, J., Ibero, M., Pardos, L., Sánchez, J., Sánchez, E., Sanz, J., Villa, J. (2006). Consenso sobre el tratamiento del asma en Pediatría. *Anales de pediatría*. **64** (4); 364- 378.
- Castillo, J., Beer, E. (1947). The tracheal chain. I. A preparation for the study of antispasmodics with particular reference to bronchodilator drugs. *Journal Pharmacology Experimental Therapy*. **90**; 104- 109.
- Cires, M., Delgado, I., Cruz, M., Pérez, J., Benítez, B., Calvo, D., Furones, J., Jiménez, G., Domínguez, J., Sansó, F. (2010). Guía Terapéutica para la Atención Primaria en Salud. [Zapata, A. *Asma Bronquial*: 87- 95]. [Rego, J. *Crisis aguda de asma bronquial*: 373- 375]. Ciencias Médicas; [La Habana, Cuba].
- Correa, M., Melo, G., Costa, S. (2008). Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*; [La Habana, Cuba] **18 (Supplement)**; 785- 797.
- Encarna, I. (2007). Manual de Fitoterapia. [Parte II. *Fitoterapia para el aparato respiratorio*. Montero, M., Villagrasa, V., Carron, R. *Cap. 9. Fitoterapia para las infecciones respiratorias y el asma*]. Elsevier; [España]; 120- 121.
- Engelbertz, J., Schwenk, T., Kinzinger, U., Schierstedt, D., Verspohl E. (2008). Thyme Extract, but not Thymol, Inhibits Endothelin- Induced Contractions of Isolated Rat Trachea. *Planta Médica*. **74**; 1436- 1440.
- Gravovsky Y., Tallarida, R. (2004). Isobolographic Analysis for Combinations of a Full and Partial Agonist: Curved Isoboles. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **310** (3); 981- 986.

Análisis isoblográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

Haeseler, G., Maue, D., Grosskreutz, J., Bufler, J., Nentwig, B., Piepenbrock, S., Dengler, R., Leuwer, M. (2002). Voltage- dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. *European Journal Anesthesiology*. **19** (8); 571 - 579.

Heilmeyer, M. (2007). *Ancient Herbs*. Frances Lincoln Limited; 66 -67.

Holgate S. (2011). Pathophysiology of asthma: what has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *Journal Allergy Clinical Immunology*. **128**; 495-505.

Israel, E., Drazen, J., Liggett, S., Boushey, H., Cherniack, R., Chinchilli, V., Cooper, D., Fahy, J., Fish, J., Ford, J., Kraft, M., Kunselman, S., Lazarus, S., Lemanske, R., Martin, R., Mclean, D., Peters, S., Silverman, E., Sorkness, C., Szefer, S., Weiss, C., Yandava, C. (2000). The effect of polymorphisms of the β_2 - adrenergic receptor on the response to regular use of albuterol in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **162**; 75- 80.

Landi, F., Russo, A., Liperoti, R., Cesari, M., Barillaro, C., Pahor, M., Bernabei, R., Onder, G. (2007). Anticholinergic drugs and physical function among frail elderly population. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. **81** (2); 235- 241.

Lee, S., Burber, M., Yang, Q., Cerne, R., Sprou, D., Bryant, R. (2008). Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *British Journal of Pharmacology*. **153**; 1739-1749.

Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J. C., Lizasoain, I., Moro, M. A. (2007). *Velázquez Farmacología Básica y Clínica*. 17ª edición. Editorial Médica Panamericana, [Buenos Aires; Madrid]; 145- 162.

Mannino, D. (2002). COPD: Epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease Heterogeneity. *American College of Ches Physycyanst*; 121S- 126S.

McLain, G. (1997). *La curación natural del asma y las alergias*. 2a edición. Robinbook, SL. [Barcelona, España]; 93.

Análisis isoblográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

Mendoza, N. (2008). *Farmacología Médica*. Editorial Médica Panamericana, [México]; 541-548.

Miranda, H., Sierralta, F., Pinardi, G. (2001). An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception. *Anesthesia & Analgesia*. **93**; 430- 435.

Montemayor, T. (1997). La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Manejo y tratamiento. *Revista de la Asociación de Neumólogos del Sur*. **4** (9); 40- 57.

Moorman, J., Zahran, H., Truman, B., Molla, M. (2011). CDC. Health Disparities and Inequalities Report – United States, 2011. Current Asthma Prevalence- United States, 2006- 2008. Center Disease Control and Prevention MMWR. **Supplement 60**; 84- 87.

Norma Oficial Mexicana NOM- 062- ZOO- 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. (México, 2001).

Orriols, R., Vallano, A. (2007). Riesgo de los broncodilatadores agonistas β_2 - adrenérgicos de acción prolongada en el asma bronquial. *Medicina Clinica*. **128** (9); 352- 354.

Panettieri, R., Kotlikoff, M., Gerthoffer, W., Hershenson, M., Woodruff, P., Hall, I., Schlegel, S. (2008). Airway smooth muscle in bronchial tone, inflammation and remodeling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **177**; 248- 252.

Rang, H., Dale, M., Ritter, J., Flower, R. (2007). *Rang and Dale's Pharmacology*. Sixth edition. Churchill Livingstone. [USA]; 361- 366.

Rodríguez- Echeverry, J. (2010). Uso y manejo tradicional de plantas medicinales y mágicas en el Valle de Sibundoy, Alto Putumayo, y su relación con procesos locales de construcción ambiental. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*. **34** (132); 309- 326.

Rodríguez- Ramos, F., Gonzalez- Andrade, M., Navarrete, A. (2011). Gnaphaliin A and B relax smooth muscle of guinea- pig trachea and rat aorta via phosphodiesterase inhibition. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **63**; 926- 935.

Siegel, D., Sheppard, D., Gelb, A., Weinberg, P. F. (1985). Aminophylline increases the toxicity but not the efficacy of an inhaled beta- adrenergic agonist in the treatment of

- Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo
acute exacerbations of asthma. *American Review of Respiratory Disease*. **132** (2); 283-286.
- Soto- Quirós M. (2008). Tratamiento práctico del asma basado en el control de la enfermedad: actualización de guías GINA. *Anales de Pediatría*. **68** (4); 317- 319.
- Tallarida R. (2000). *Drug synergism and dose- effect data analysis*. Chapman & Hall/ CRC Press, [USA]; 21- 39.
- Tallarida R. (2006). An overview of drug combination analysis with isobolograms. *Perspectives in Pharmacology*. **319**; 1- 7.
- Tallarida, R., Kimmel, H., Holtzman, S. (1997 a). Theory and statistics of detecting synergism between two active drugs: cocaine and buprenorphine. *Psychopharmacology*. **133**; 378- 382.
- Tallarida R., Stone D., Raffa R. (1997 b). Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sciences*. **61**; PL417- PL425.
- Tamura, T., Iwamoto, H. (2004). Thymol: a classical small- molecule compound that has a dual effect (potentiating and inhibitory) on myosin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **318**; 786- 791.
- López, T. (2006). Tomillo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Ámbito farmacéutico. Fitoterapia*. **25** (1); 74- 77.
- Vogel, H. G. (2002). *Drug discovery and evaluation. Pharmacological Assays*. Second edition. Springer; [USA]; 109- 110 y 353- 354.
- Waizel, H., Waizel, B. (2009). Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *Anales de Otorrinología Mexicana*. **54** (4); 145- 171.
- Webb, R. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*. **27**; 201- 206.
- Williamson, E., Okpayo, D., Evans, F. (1996). *Selection, prepatration and pharmacological evaluation of plant material*. Pharmacological methods in phytotherapy research; 113- 129.

Análisis isobolográfico de la interacción entre timol e ipratropio y el timol y el salbutamol en el efecto relajante del músculo liso traqueal de cobayo

Wright, J. (2002). *Asthma and bronchitis*. How to books; 111- 129.