



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“Evaluación de las propiedades relajantes en miometrio humano embarazado y del mecanismo de acción de dos análogos de talidomida”

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

LIC. EN BIOL. CYNTHIA MAYÉN GARCÍA

Director(a) de Tesis

DR. EN C. TOMÁS EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

San Agustín Tlaxiaca Hgo. Agosto de 2015





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
 MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Of. No MCBS/2015/81
 Asunto: Asignación de Jurado de Examen

L.B. Cynthia Mayén García
 Candidata a Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Evaluación de la Propiedades Relajantes en Miometrio Humano Embarazado y del Mecanismo de Acción de Dos Análogos de Talidomida.", con el cual obtendrá el Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma

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

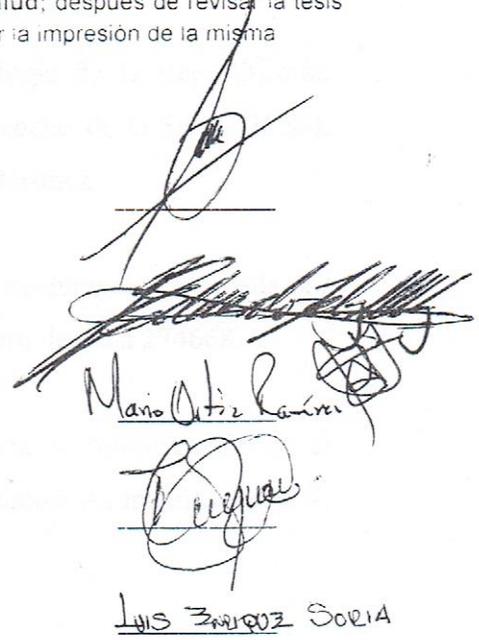
PRESIDENTE DR. HÉCTOR ANTONIO PONCE MONTER

PRIMER VOCAL DR. TOMAS EDUARDO FERNANDEZ MARTINEZ

SECRETARIO DR. MARIO ISIDORO ORTIZ RAMÍREZ

SUPLENTE DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS

SUPLENTE DR. LUIS ENRIQUE SORIA JASSO



Mano Ortiz Ramirez
 Raquel Carino Cortes
 Luis Enrique Soria

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



Atentamente
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
 San Agustín Tlaxiaca Hgo., a 29 de junio 2015
 M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL
 DIRECTOR


 DRA. ARACELI ORTIZ POLO
 COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN
 COORDINADOR DEL PROGRAMA



Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Biología de la Reproducción (CIBIOR), del Área Académica de Medicina del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa), UAEH, bajo la tutoría del Dr. en C. Tomás Eduardo Fernández Martínez.

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 274668.

Durante el periodo Marzo-Junio de 2014 se realizó una estancia de investigación en el Departamento de Fisiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, en México, D.F., apoyada por Beca Mixta del CONACyT.

Agradecimientos

Al Dr. Eduardo Fernández Martínez, que desde un principio confió en mi para la realización de este trabajo, muchas gracias por guiarme con paciencia y sabiduría en este campo de la investigación, por el tiempo que dedicó en enseñarme y explicarme aquello que me costaba trabajo entender, le agradezco por haberme brindado su cariño, amistad y apoyo incondicional tanto académico como personal. Doctor le agradezco de corazón lo que ha hecho por mí, por la influencia y grandes enseñanzas que me ha dejado en todo este tiempo, pues me han hecho crecer bastante como persona en todos los sentidos y gracias por enseñarme a amar esta área de la investigación, como usted lo sabe hacer.

Al Dr. Héctor Ponce Monter, quien me instruyó y me brindó su apoyo incondicional en el laboratorio para la realización de la parte funcional del proyecto, y por compartir conmigo sus conocimientos e historias de vida que me brindaron grandes enseñanzas, y también le quiero agradecer sus consejos, observaciones y puntos de vista para mi formación y para que el trabajo mejorara. Gracias por su tiempo y dedicación en todo momento, y por la confianza de haberme permitido formar parte del proyecto

Al Dr. Luis, quien me apoyó en todo momento durante los experimentos de cuantificación de AMPc y por haberme ayudado a comprender mejor la técnica; gracias por su ayuda, sus consejos, su confianza y la motivación que me brindó durante toda la maestría.

A la Dra. Raquel Cariño Cortés y al Dr. Mario Ortiz Ramírez, por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial, por asesorarme y por brindarme su apoyo durante este periodo, gracias por las observaciones, comentarios y sugerencias que me dieron para que este trabajo mejorara.

Al Dr. José Antonio Arias Montaña, por habernos enseñado como realizar la técnica para la cuantificación del AMPc y su confianza para permitirnos trabajar en su laboratorio, facilitándonos el uso de su equipo y material requerido para el desarrollo de esta parte experimental del proyecto; gracias por su ayuda y apoyo, y a sus alumnos que siempre fueron muy amables durante nuestra estancia.

A mis padres Reyna García y José Luis Mayén, por ser unas personas increíbles, que nos aman y apoyan incondicionalmente, de no ser por ustedes y sus regaños no hubiera logrado lo que soy hoy en día. Gracias por estar conmigo siempre, motivándome para seguir adelante, por escucharme y aconsejarme, por aguantar mis malos ratos y compartir mis alegrías. Gracias por ser unos buenos padres.

A mi hermano Luis Ángel por ser mi mejor amigo, confidente y cómplice, gracias por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo momento, por ser una de las personas que siempre me motivan por salir adelante y echarle muchas ganas a todo lo que hago. Gracias manis porque a pesar de ser mi hermano menor, parece que eres el mayor al cuidarme y preocuparte por mí. Te amo hermanito.

A Rossy, porque a lo largo de nuestra vida encontramos personas que nos marcan de una manera única y nos llenan de grandes momentos y recuerdos maravillosos, y te agradezco por ser alguien que ha marcado la mía de una manera muy especial, gracias por todo el apoyo que me has dado, tu cariño y confianza, sin duda concerté ha sido uno de las mejores experiencias que me han pasado.

A mis amigos Miguel, Esme, Pepe, Omar, Ary e Imanol, que han compartido conmigo grandes momentos y malos también, gracias por sus locuras que hacen que la vida sea más divertida y por el cariño que me han brindado durante tantos años, y también quiero agradecer a mis amigos que a pesar del poco tiempo que llevo de conocerlos han sido unas personas maravillosas, gracias Isaac, Faty, Irvin, Ale y Alfredo que igual he compartido varios momentos increíbles con ustedes y por demostrarme su amistad sincera.

A Ali, que a pesar de conocerte hace poco, te has convertido en una de mis mejores amigas, gracias por brindarme tu cariño, confianza y sobre todo tu amistad; gracias por siempre darme tu apoyo en los momentos malos y alegrarte conmigo en los buenos, sin duda en la vida se encuentran pocas personas como tú y una vez que se encuentran su amistad se debe cuidar para toda la vida.

Dedicado a...

A mis abuelos Leopoldo García y Ángeles Cervantes, quienes son las personas que nos han llenado de un amor incondicional y nos han mostrado lo maravilloso de la vida compartiendo con nosotros sus vivencias y consejos que siempre estarán presentes en nuestras vidas. Gracias por sentirse siempre orgullosos de nuestros logros por pequeños que fueran y darnos ánimos en los fracasos, y por preocuparse siempre por nosotros, aun cuando no lo consideráramos necesario. Gracias por enseñarnos a disfrutar la vida y a luchar por ella aún en los momentos más difíciles.

“Recordar es fácil para el que tiene memoria.
Olvidar es difícil para el que tiene corazón.”

Gabriel García Márquez

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Parto normal	1
1.2 Anatomía y fisiología del útero	2
1.2.1 Quiescencia del útero	4
1.2.2 Mecanismo de contracción y relajación del músculo liso uterino	7
1.2.2.1 Regulación de los canales de calcio	7
1.2.2.2 Regulación de los niveles de AMPc	9
1.3 Parto prematuro	11
1.3.1 Causas que inducen el parto pretérmino	12
1.3.2 Citocinas y su participación en el parto normal y el parto prematuro	14
1.4 Tratamiento para el parto prematuro	17
1.4.1. Bloqueadores de canales de calcio y el sulfato de magnesio	17
1.4.2 Agonistas β 2-adrenérgicos y la progesterona	18
1.4.3 Inhibidores de prostaglandinas y antagonistas de la oxitocina	19
II. ANTECEDENTES	21
2.1 Fosfodiesterasas-4 (PDE-4) como blanco terapéutico	21
2.1.1 Inhibidores de PDE-4	22
2.1.2 Inhibidores de PDE-4 como tocolíticos	24
2.2 Talidomida	26
2.2.1 Mecanismos de acción de la talidomida	28
2.2.2 Uso actual de la talidomida en la clínica	29
2.3 Análogos de la talidomida como inhibidores de PDE-4	30
III. JUSTIFICACIÓN	34

IV. HIPÓTESIS	34
V. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo General	35
5.2 Objetivos específicos	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 Fármacos y soluciones	36
6.2 Colección de tejidos	36
6.3 Estudios funcionales in vitro con tiras de miometrio humano embarazado	37
6.3.1 Efecto inhibitorio sobre contracciones espontáneas	37
6.3.2 Efecto inhibitorio sobre contracciones tónicas sostenidas	38
6.3 Bloqueo de canales de calcio	39
6.4 Cuantificación de AMPc en células HeLa	40
6.5 Inmunocitoquímica	41
6.6 Análisis estadístico	42
VII. RESULTADOS	43
7.1 Resultados del efecto inhibitorio sobre contracciones espontáneas	43
7.2 Resultados del efecto inhibitorio sobre contracciones tónicas sostenidas	47
7.3 Resultados del experimento como bloqueadores de canales de calcio	50
7.4 Resultados de la cuantificación de AMPc en células HeLa	52
7.5 Inmunocitoquímica	54
VIII. DISCUSIÓN	58
IX. CONCLUSIONES	73
XI. BIBLIOGRAFÍA	74
XII. GLOSARIO DE TÉRMINOS	85
XIII. ANEXO 1	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Esquema general que muestra la estructura del útero y las partes que lo conforman; B) La pared del útero está compuesto por tres capas: perimetrio, endometrio y miometrio.	3
Figura 2. Tejido muscular uterino humano conformado por células en forma de huso, en donde, se observa a) el músculo liso unitario y b) el músculo liso multiunitario.	4
Figura 3. Rutas para la elevación de calcio intracelular mediante la activación de los canales iónicos y de la fosfolipasa C y la ruta de las proteínas Rho que puede activar o desactivar a la fosfatasa de la MLC. Tomado de Webb, 2003.	8
Figura 4. Ruta del AMPc y su participación en la inactivación del mecanismo contráctil del músculo liso mediante la desactivación de la fosfolipasa C y la inactivación del flujo de Ca^{2+} . (→ estimulación, —● inhibición). Tomado de Yuan y López-Bernal, 2007.	10
Figura 5. Diversos factores de riesgo que pueden inducir el parto prematuro (Vause y Johnston, 2000).	13
Figura 6. Mecanismo de infección y activación de la respuesta inflamatoria. Tomado de Elovitz y Mrinalini, 2004.	15
Figura 7. Estructura química del Rolipram.	23
Figura 8. Estructura química de la talidomida.	27
Figura 9. Estructura química de los cuatro análogos de la talidomida.	32
Figura 10. Trazos típicos que representan las contracciones espontáneas del útero humano embarazado y la representación del efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas inducidas por los compuestos ensayados.	43
Figura 11. Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas inducido por rolipram, 4NO ₂ FDPM _e y 4AFDPM _e , en útero humano embarazado.	44
Figura 12. Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas inducido por TFFDPM _e , 8-Br-AMPc y FDPMe.	45

- Figura 13.** Trazos típicos del modelo experimental utilizado para ensayar el efecto inhibitorio de los compuestos estudiados sobre la contracción tónica sostenida del útero humano embarazado inducida por una solución despolarizante de K^+ 40 mM con Ca^{2+} . 47
- Figura 14.** Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de rolipram, 4AFDPMe y 4NO2FDPMe sobre la contracción tónica sostenida inducida por la solución despolarizante de K^+ 40 mM con Ca^{2+} . 48
- Figura 15.** Trazos típicos del modelo experimental utilizado para ensayar el bloqueo de canales de calcio de los compuestos estudiados mediante una curva acumulativa de Ca^{2+} con una solución despolarizante elevada de K^+ sin calcio. 51
- Figura 16.** Curva de la respuesta contráctil inducida por el $CaCl_2$ para evaluar el efecto del bloqueo de canales de calcio de rolipram, 4AFDPMe y 4NO2FDPMe mediante una curva acumulativa de Ca^{2+} con una solución despolarizante elevada de K^+ sin calcio. 51
- Figura 17.** Niveles de AMPc en células HeLa estimuladas con concentraciones crecientes de los análogos de talidomida. 53
- Figura 18.** Curva sigmoide log [concentración]-respuesta [AMPc] en células HeLa de dos análogos de talidomida. * = Diferentes, $P < 0.05$, t-Student. 54
- Figura 19.** Prueba de inmunocitoquímica en la que se exhibe la presencia de la PDE-4 subtipo-B2 (PDE-4B2) y la fosforilación de la MCL en células UtSMC. En donde, DAPI se refiere a la tinción de los núcleos y MERGE a la sobreposición de PDE-4B2 o la pMCL y DAPI. 55
- Figura 20.** Panel de inmunocitoquímica en la que se presentan los grados de fosforilación de la MLC en células UtSMC en presencia o ausencia de OT, y en presencia o no de dos análogos 4AFDPMe y 4NO2FDPMe. En donde, pMCL se refiere a la fosforilación de la cadena ligera de miosina, DAPI, a la tinción de los núcleos y MERGE a la sobreposición de pMCL y DAPI. 57
- Figura 21.** Estructuras químicas de los análogos de talidomida y varios fármacos bloqueadores de canales de calcio, donde se muestran los grupos funcionales y similitudes moleculares que podrían conferirle tal actividad novedosa. Tomado de Manzur, 2014. 68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades inmunomoduladoras en citocinas de los cuatro análogos de talidomida evaluados.	33
Tabla 2. Mecanismos moleculares de acción posibles de talidomida y los cuatro análogos de talidomida evaluados.	33
Tabla 3. Valores de la concentración inhibitoria cincuenta (CI_{50}) y de la respuesta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) de los cuatro análogos, rolipram y 8-Br-AMPC.	46
Tabla 4. Valores de la concentración inhibitoria cincuenta (CI_{50}) y la respuesta máxima ($R_{m\acute{a}x}$).	49
Tabla 5. Valores de la CI_{50} de las contracciones espontáneas vs. las tónicas sostenidas.	50

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular de Ca ²⁺
4AFDPMe	3-(4-amoniftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo
4NO₂FDP	3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4dimetoxifenil)-propanoato de metilo
Me	propanoato de metilo
8-Br-AMPc	8-bromo-AMPc (análogo del AMPc)
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
AMPc	3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
AUC	Área bajo la curva
AUC_i	Es la AUC de la actividad integral
AUC_r	El restante de la AUC
Ca²⁺	Calcio
CE₅₀	Concentración efectiva-50
CGRP	Péptido relacionado con el gen calcitonina
CI₅₀	Concentración inhibitoria-50
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenasas
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CRH	Corticotropina
CSFs	Factores estimulantes de colonias
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
ENL	Eritema nodoso lepromatoso
FDA	Food and Drug Administration
FDPMe	3-ftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de

	metilo
GMPC	Guanosín monofosfato cíclico
GPRC	Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Guanosín trifosfato
HPDE-4	Alta afinidad a PDE-4
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IFNs	Interferones
IFN-γ	Interferón- γ
IgM	Inmunoglobulinas-M
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina-10
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IP3	Inositol 1,4,5 trifosfato
KCl	Cloruro de potasio
KRH	Solución Ringer Krebs-HEPES
LC2	Cadenas ligeras-2
LPDE-4	Baja afinidad a PDE-4
MLCK	Cinasa de las cadenas ligeras de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MMPs	Metaloproteasas
NF-κB	Factor nuclear- κ B
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
OT	Oxitocina
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Amortiguador salino de fosfato
PDE	Fosfodiesterasas
PDE-4	Fosfodiesterasa-4

PDE-4B2	Fosfodiesterasa-4B2
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandinas-E2
PGF2α	Prostaglandinas-F2 α
PG-I2	Prostaciclina-I2
PKA	Cinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Cinasa dependiente de GMPc
PLC	Fosfolipasa-C
pMLC	Fosforilación de la cadena ligera de miosina
PTH	Péptido relacionado con la hormona paratiroidea
Rho-GEFs	Factores de intercambio de nucleótidos de guanina
Rmax	Respuesta máxima
ROCK	Cinasa de Rho
RS	Retículo sarcoplásmico
SEM	Error estándar
STEPS	Programa para la prescripción con seguridad
TFFDPMe	3-tetrafluoroftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo
TGFs	Factores de crecimiento transformante
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
UtSMC	Células miometriales uterinas humanas

RESUMEN

El nacimiento prematuro o pretérmino es un problema de salud reproductiva a nivel mundial. Este problema representa aproximadamente el 12% del total de partos, siendo una de las causas principales de muerte neonatal y morbilidad neurológica infantil a corto y largo plazo. El parto prematuro es una enfermedad multifactorial debido a que el mecanismo que induce la expulsión del feto antes del periodo de gestación normal puede ser desencadenado por diversos factores como variables genéticas, edad maternal, problemas de alcohol y drogas, o infecciones intrauterinas, siendo esta última la causa más común, ya que promueve una respuesta en cascada que induce la síntesis de prostaglandinas (PG)-E₂ y PGF_{2α}, la liberación e incremento de la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como interleucina (IL)-1β, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF)-α, cuya liberación induce el aumento de los niveles de oxitocina (OT). Actualmente varios fármacos tocolíticos se utilizan en la clínica, mediante el conocimiento de algunos mecanismos que causan la contracción del miometrio, tales como los β-miméticos, antagonistas de OT, inhibidores de la síntesis de PG, bloqueadores de calcio y sales de magnesio, que causan reacciones adversas tanto para la madre como para el feto; además, no son del todo seguros ni eficaces, ya que solo logran detener las contracciones durante un periodo muy corto. Por esta razón, la investigación actual se ha centrado en el mecanismo de relajación de músculo liso uterino inducido por la elevación intracelular del 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), mediante la inhibición de la actividad de las fosfodiesterasas-4 (PDE-4), las cuales reducen rápidamente las concentraciones de este segundo mensajero y, a su vez, induce la contracción del músculo miometrial. Por lo tanto, este proyecto está enfocado en la evaluación de las propiedades relajantes probables y del mecanismo de acción de dos análogos de talidomida que han mostrado ser inhibidores potentes y selectivos de PDE-4 y, en consecuencia, del TNF-α, por lo que se aportarán algunas evidencias experimentales para proponer a estos análogos como una alternativa de fármacos tocolíticos nuevos.

Por lo tanto, se realizó un estudio funcional de los efectos inhibitorios de dos análogos de talidomida sobre la contracción fásica espontánea y la tónica sostenida inducida por KCl en

tejidos aislados de miometrio humano embarazado y sus efectos se compararon con el rolipram. También se evaluó la acumulación de AMPc inducida por los análogos, en donde, se cuantificaron los niveles de este segundo mensajero en células HeLa mediante un ensayo de radio-ligando competitivo. Se corroboró la presencia de la PDE-4B2 y la fosforilación de la cadena ligera (pMLC) por inmunocitoquímica en células miometriales uterinas humanas (UtSMC), en presencia de análogos de talidomida así como en ausencia o en presencia de OT.

Los análogos de la talidomida exhibieron efectos inhibidores de las contracciones espontáneas y tónicas del tejido miometrial dependientes de la concentración; así mismo, inhibieron la respuesta contráctil inducida por calcio y a pesar de que fueron menos potentes resultaron ser equiefectivos con rolipram. Los dos análogos también evidenciaron un aumento en la acumulación de AMPc de manera dependiente de la concentración, aunque no reducen la producción pMLC inducida por OT; sin embargo, inducen cambios en la localización subcelular de esa proteína en las UtSMC.

En conclusión, los dos análogos de talidomida poseen efectos inhibitorios sobre las contracciones espontáneas y tónicas sostenidas en el miometrio humano embarazado debido a su efecto inhibidor de la PDE-4 y, es probable, que presenten un mecanismo novedoso como bloqueadores de canales de calcio. Estos análogos no teratogénicos, inmunomoduladores, antiinflamatorios y útero-relajantes podrían ser tocolíticos potencialmente más seguros y eficaces.

ABSTRACT

The premature or preterm birth is a World's reproductive health problem; this accounts for 12% of all births, being one of the main causes of neonatal death and short and long-term infant neurological morbidity. Preterm birth is a multifactorial disease because the mechanism that induces the fetus expulsion before the normal gestation period can be triggered by various factors such as genetic variables, maternal age, alcohol and drug complications, or intrauterine infection, this last is the most common cause,; all of them promote a response cascade that induces prostaglandins (PG) synthesis (PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$), the release and increased production of proinflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor (TNF)- α as well as increases oxytocin (OT) levels. Several tocolytic drugs are used in the clinic, through the knowledge of some mechanisms that cause the myometrium contraction, such as β -mimetics, OT antagonists, PG synthesis inhibitors, calcium blockers and magnesium salts, which cause adverse reactions to both mother and fetus; in addition, they are not completely safe nor effective, but also they just stop contractions for a very short period. For this reason, the current investigation has been focused on the uterine smooth muscle relaxation mechanism induced by the elevation of intracellular cAMP, through inhibiting the activity of phosphodiesterases (PDE)-4, such enzyme quickly reduces the concentration of this second messenger and in turn induces muscle myometrial contractions. Therefore, this work was intended for the evaluation of the likely relaxing properties and the action mechanism of two thalidomide analogs that have been shown to be potent inhibitors of both PDE-4 and in consequence of TNF- α ; thus, providing of experimental evidences to propose these thalidomide analogs as a new alternative as tocolytic drugs.

A functional study of the inhibitory effects of two thalidomide analogs on spontaneous phasic, KCl-induced tonic, and calcium-induced contractions was performed in isolated pregnant human myometrial tissues and compared to rolipram. The thalidomide analogs-induced accumulation of cAMP was quantified in HeLa cells by competitive radioligand assay. Presence of phosphodiesterase-4B2 and phosphorylated myosin light-chain (pMLC), as well as the effect of both thalidomide analogs, in absence or in presence of oxytocin, on

the formation of pMLC were assessed by immunocytochemistry in human uterine myometrial cells (UtSMC).

Both thalidomide analogs evidenced concentration-dependent inhibitory effects on spontaneous and tonic myometrial contractions; also, they inhibited the calcium-induced contractile responses and were less potent but equieffective than rolipram. Both analogs increased the cAMP accumulation in a concentration-dependent manner, although they did not reduce the oxytocin-induced pMLC production; however, they induced changes in the subcellular localization of that protein in UtSMC.

In conclusion, both thalidomide analogs possess inhibitory effects on the spontaneous and tonic contractions of pregnant human myometrium due to their inhibitory effect on PDE-4 and likely to their novel mechanism as calcium-channel blockers. These non-teratogenic, immunomodulatory, antiinflammatory and now uterus-relaxant agents may be potentially safer and effective tocolytics.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Parto normal

El parto a término se define como aquel nacimiento en el que se han completado de 37 a 42 semanas de gestación, lo que no presenta grandes complicaciones en el nacimiento y el desarrollo del infante. El parto normal es un evento fisiológico multifactorial, en el que se ha sugerido que existe una relación dependiente del tiempo con la activación fisiológica de los componentes de una vía terminal común que inducen el trabajo de parto a través de una serie de eventos anatómicos, bioquímicos y endocrinológicos, tanto en la madre como en el feto, aunque el mayor cambio se muestra en los tejidos maternos del útero (miometrio, decidua y el cuello uterino) (Hasbun y Hasbun, 2000; Norwitz y Robinson, 2001).

Los procesos que se encuentran involucrados en la regulación de la actividad del útero durante el embarazo se han dividido en 4 fases, en donde, se promueve la quiescencia relativa, el crecimiento del útero (activación), el término del embarazo (estimulación) y la involución del útero. Durante el embarazo, el útero se mantiene en estado de quiescencia funcional a través de la acción de varios inhibidores, tales como: la progesterona que a su vez induce la producción de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), el óxido nítrico (ON), la relaxina, la prostaciclina (prostaglandina (PG)-I₂), la adrenomedulina, el péptido relacionado con la hormona paratiroidea y el péptido relacionado con el gen de calcitonina, importantes para permitir el desarrollo adecuado del feto. Antes de terminar el embarazo el miometrio sufre un proceso de activación en respuesta a una o más uterotropinas, que modulan la función uterina y su crecimiento (Farina y Winkelman, 2005; Norwitz y Robinson, 2001), como los estrógenos que estimulan la síntesis de fosfolípidos para aumentar la incorporación de ácido araquidónico (AA) importante en la biosíntesis de las PG's que se encargan de inducir la inflamación (Ganong, 2006); también, se caracteriza por el incremento de la expresión de una serie de proteínas asociadas a la contracción (incluyendo receptores miometriales de PGs y oxitocina (OT)), así como la activación de canales iónicos y el incremento de uniones estrechas Gap que ayudan a establecer una sincronía eléctrica que permite una contracción eficaz. En la fase de estimulación, el

miometrio es activado a través de uterotoninas como la OT y las prostaglandinas (PG)-E₂ y PGF_{2α} quienes juegan un papel importante como estimulantes potentes de la contracción uterina y, por último, se lleva a cabo la involución del útero mediada principalmente por la OT (Norwitz y Robinson, 2001).

El comienzo y la progresión del parto son el resultado de una sincronía de varios factores encontrados en tejidos placentarios, maternos y fetales, y del tiempo para la activación de cada uno de ellos. Estos factores, que incluyen a las PG's, la histamina, cortisol, progesterona y la OT, actúan como señales para detener o activar el parto, e interactúan con las citocinas en una cascada de efectos múltiples (Farina y Winkelman, 2005) pero la activación del trabajo de parto dentro del periodo normal de gestación regularmente suele verse interrumpido por una serie de factores internos o externos antes de las 37 semanas de gestación, induciendo así el parto prematuro, el cual, ha sido uno de los problemas principales de salud que ha prevalecido durante varias décadas hasta la actualidad; por esta razón, en este trabajo se propusieron cuatro compuestos que tal vez actúan a través de varias vías para inducir la relajación miometrial, de ellos se seleccionaron los dos más efectivos por lo que podrían ser fármacos tocolíticos novedosos, pero antes de ahondar sobre el parto prematuro y de estos compuestos, se darán las bases de la anatomía y fisiología (quiescencia durante el embarazo y mecanismo de contracción y relajación miometrial) del útero.

1.2 Anatomía y fisiología del útero

El útero es un órgano hueco en forma de pera invertida y de paredes musculares gruesas (Figura 1A). La pared se encuentra conformada por tres capas de células que van de adentro hacia afuera, la primer capa es una cavidad conformada por células epiteliales y mucosa llamada endometrio, rodeada por una segunda capa denominada miometrio conformada principalmente por tejido muscular liso que se organiza en fibras acomodadas en direcciones múltiples alrededor de la cavidad central y por último recubriendo esta segunda capa se encuentra la serosa peritoneal (Figura 1B) (Bernal, 2006; Botella, 1997).

El útero es un órgano miogénico que se caracteriza por su actividad contráctil espontánea sin la necesidad de una estimulación externa, dándole actividad de células marcapaso. Estas células marcapaso pueden despolarizar la membrana y los potenciales de acción son los responsables de iniciar una señalización y producir un grado alto de actividad eléctrica que puede ser coordinada y propagada de manera eficiente a las células adyacentes que permiten una sincronía contráctil, al final del parto esto se consigue con un incremento de estos puentes de célula a célula denominadas uniones estrechas Gap, que transfieren una gran variedad de moléculas pequeñas tales como metabolitos, iones y moléculas de señalización (Bernal, 2006; Botella, 1997; Graves, 1996; Hudson y López-Bernal, 2012; Macintyre et al., 2007; Norwitz y Robinson, 2001).

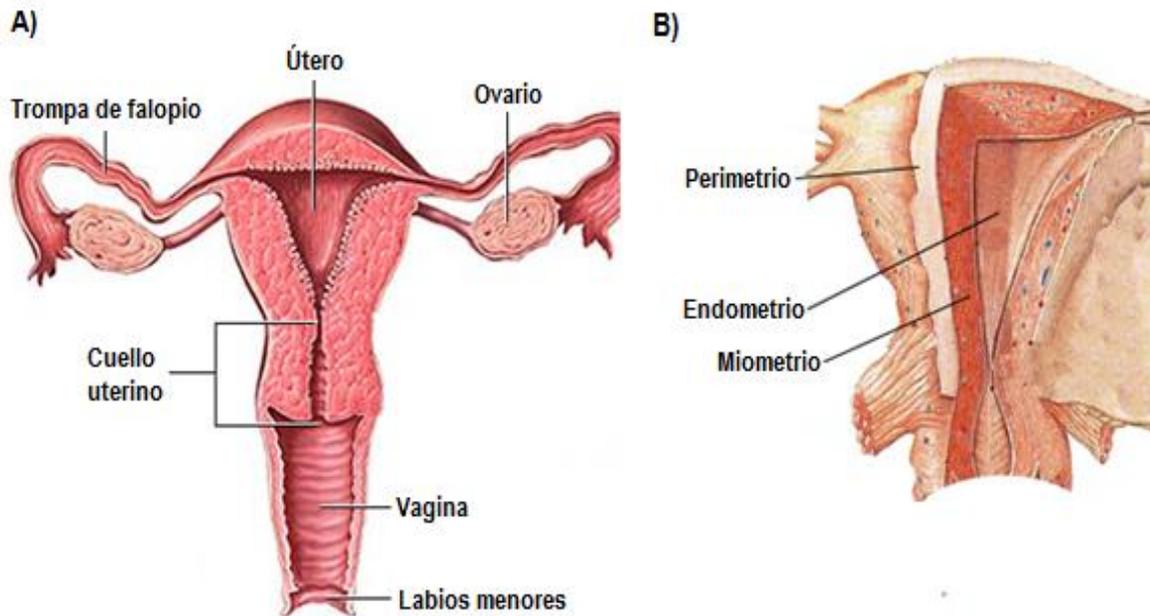


Figura 1. A) Esquema general que muestra la estructura del útero y las partes que lo conforman; B) La pared del útero está compuesta por tres capas: perimetrio, endometrio y miometrio. Tomado de www.clinicafertilidadpuebla.com.

El músculo liso uterino o miometrio humano es un órgano unitario y multiunitario, que se encuentra conformado por células en forma de huso y uninucleado, que carecen de estriaciones transversales, aunque muestran ligeramente estrías longitudinales (Figura 2). Los componentes proteicos principales que forman parte de este músculo liso son

filamentos de actina y miosina II (Ganong, 2006). Estas células usan ciclos de puentes cruzados entre la actina y la miosina para desarrollar la contracción (Bernal, 2006; Graves, 1996; Webb, 2003). La actividad bioquímica y funcional de las células miometriales también se encuentra mediada por el sistema nervioso simpático, el cual gobierna la formación de AMPc y promueve la relajación del músculo liso mediante la activación de proteínas G y la adenil ciclasa, mientras que el sistema nervioso parasimpático gobierna la generación de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) mediante la activación de proteínas G y la fosfolipasa-C (PLC), las cuales permiten la movilización de Ca^{2+} a través de canales iónicos y, en consecuencia, produce un efecto contrario a la vía del AMPc, induciendo así la contracción miometrial (Abdel-Latif, 2001).

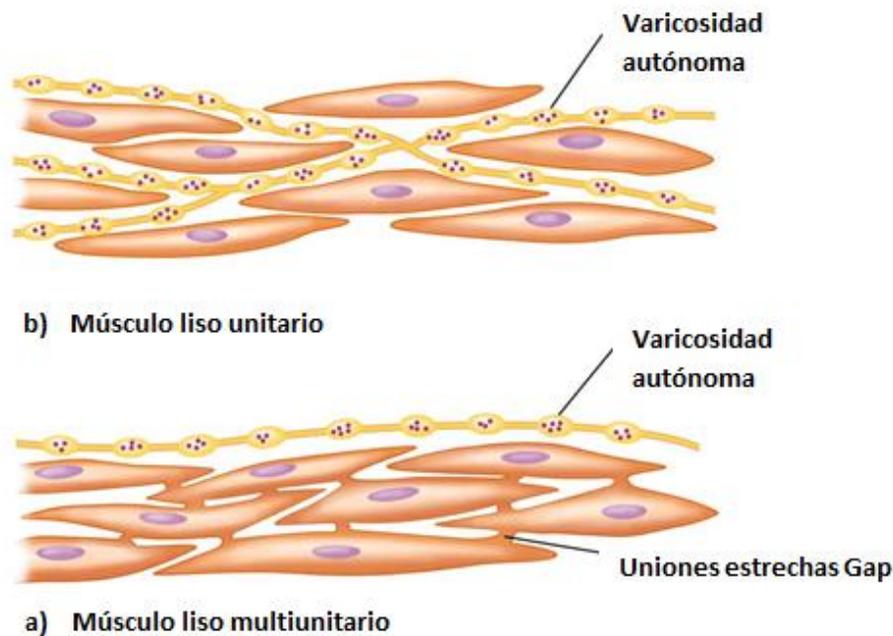


Figura 2. Tejido muscular uterino humano conformado por células en forma de huso, en donde, se observa a) el músculo liso unitario y b) el músculo liso multiunitario.

Tomado de Stanfield y Germann, 2011.

1.2.1 Quiescencia del útero

Un embarazo exitoso requiere de una relajación completa del útero por más del 95% del periodo de gestación para que el feto se pueda desarrollar adecuadamente, superando la

tendencia inherente del miometrio de contraerse y estirarse. A este proceso activo y altamente regulado se ha denominado quiescencia miometrial. Después de este periodo de inactividad uterina, la activación del miometrio ocurre al final del embarazo y antes del inicio del parto, los mecanismos moleculares de la quiescencia miometrial son anulados y la capacidad del miometrio para contraerse por uterotoninas son restauradas (Carvajal y Weiner, 2003). Existen varios mediadores que participan en el mantenimiento de la quiescencia uterina como la progesterona, ON, AMPc, GMPc y la relaxina, así como agentes involucrados en la contracción miometrial como la OT, los estrógenos, las PGE₂ y PGF_{2α}, y la histamina (Palencia, 2011).

La progesterona es una hormona esteroidea que durante el embarazo mantiene sus niveles elevados. Su función se ha visto relacionada con la quietud de las fibras musculares uterinas, inhibe la madurez cervical y disminuye la producción de citocinas; al término del embarazo y comienzo del parto se ha visto que sus niveles disminuyen y aumentan los estrógenos que ejercen el efecto contrario, ya que en la placenta activan una cascada de eventos que incluyen contracciones uterinas de gran amplitud y regularidad, madurez del cuello uterino, la activación de la decidua y las membranas fetales. Los estrógenos aumentan la expresión de la OT, receptores de prostaglandinas y otras proteínas asociadas que promueven la contractibilidad uterina (Palencia, 2011). Los sistemas de segundos mensajeros, GMPc y AMPc también se han visto involucrados en la inducción de la relajación miometrial. El GMPc es generado por la guanilato ciclasa soluble (s-GC) que puede ser activado por el ON o el monóxido de carbono (CO); el GMPc induce la relajación del músculo liso a través de la activación de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) que se encarga de reducir la concentración intracelular de Ca²⁺ [Ca²⁺]_i y la reducción de la sensibilidad a Ca²⁺ del sistema contráctil, pero este ácido nucleico no es un mediador clave para la quiescencia miometrial debido a que se ha considerado que el miometrio es insensible al GMPc debido a que se requieren grandes concentraciones para inducir la relajación por lo que su papel central se ha enfocado en otros mecanismo de acción como inducir el incremento del ON. Por otro lado, el AMPc se ha visto más relacionado con la inducción de la relajación miometrial y muy posiblemente puede estar involucrado en la quiescencia del útero durante el embarazo. Este segundo mensajero

modifica la expresión de varias proteínas relacionadas con la contracción, tales como: la ciclooxigenasa-2 (COX-2) precursor de las PGE₂ y PGF_{2α}, los adrenoreceptores-β₂ y receptores de OT, e induce la síntesis y liberación de la progesterona que produce la relajación uterina (Carvajal y Weiner, 2003; Price y López-Bernal, 2012).

El ON es un agente endógeno potente que induce la relajación del músculo liso, y su acción es mediada predominantemente por un incremento del GMPc intracelular. La ruta de relajación del ON-GMPc se ha visto presente en el útero humano, cuyos niveles se elevan durante el embarazo y disminuyen durante el parto, pero varios estudios han reportado que el ON a pesar de inducir relajación, no es un agente que controle ampliamente la actividad contráctil del músculo liso debido que se ha reportado que no inhibe el efecto de otros estimulantes uterinos como el efecto inducido por la OT y para mantener la quiescencia del útero requiere de otros mediadores de la relajación. Otros de los agentes que igual se encuentran involucrados en el mantenimiento de la quiescencia miometrial son los neuropéptidos, como la hormona liberadora de corticotropina (CRH), el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTH), el péptido relacionado con el gen calcitonina (CGRP) y la relaxina, que comparten la característica de inhibir las contracciones del miometrio humano y promover la quiescencia mediante el incremento de los niveles intracelulares del AMPc (Carvajal y Weiner, 2003).

Al final del embarazo la pérdida de la quiescencia empieza cuando el útero sufre una transformación que le confiere la capacidad de generar una fuerza impulsora que facilite la salida del feto. Este cambio en el fenotipo abarca una serie de eventos bien coordinados que involucran el ablandamiento y dilatación de la cervix, la ruptura de membranas, las contracciones miometriales potentes y coordinadas, y finalmente la involución del útero a través de la acción de varios agentes como las uterotropinas y las uterotoninas, así como la activación de una cascada de eventos mediada por citocinas proinflamatorias principalmente (Macintyre et al., 2007).

1.2.2 Mecanismo de contracción y relajación del músculo liso uterino

Las contracciones miométriales son gobernadas principalmente por la concentración de los iones de calcio intracelulares pero actualmente se ha visto que el AMPc juega un papel importante para inducir la relajación del músculo liso. Existen varios mecanismos involucrados en la regulación de la actividad uterina cuyas rutas incluyen: 1) los canales iónicos, en donde, se involucran potenciales de acción que despolarizan la membrana celular permitiendo una rápida entrada de calcio al medio intracelular a través de canales operados por voltaje, y 2) la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) mediante efectores hormonales, neurotransmisores o farmacológicos, para la activación de segundos mensajeros (Hudson y López-Bernal, 2012; Macintyre et al., 2007).

1.2.2.1 Regulación de los canales de calcio

La regulación de la contractibilidad miométrial en gran parte depende de los canales iónicos de Ca^{2+} y K^{+} (figura 3). Los canales de K^{+} dependientes de adenosín trifosfato (ATP) y de voltaje se encargan de promover la hiperpolarización y la repolarización, y los canales iónicos de Ca^{2+} mantienen el potencial de membrana en reposo (Carbajal y Weiner, 2003; Macintyre et al., 2007). Los canales iónicos juegan un papel importante al regular la cantidad de iones en el medio intracelular y extracelular, y cuyos cambios en cualquiera de los dos medios pueden disparar una diferencia de voltaje eléctrico que puede despolarizar, hiperpolarizar o mantener en estado de reposo a la membrana. La despolarización del miometrio implica un aumento en la permeabilidad de la membrana a Ca^{2+} , mientras que la repolarización e hiperpolarización son provocados por los cambios a la permeabilidad del K^{+} . La permeabilidad de la membrana a Ca^{2+} es regulada por dos tipos de canales de Ca^{2+} , el tipo L y el T dependientes de voltaje, que son altamente expresados en miometrio humano. El canal de tipo L al comienzo del parto exhibe una sobre regulación y su activación es dependiente de voltaje mientras que su inactivación es a través de un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; el canal iónico del tipo T han sido considerados como importantes reguladores de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, una caracterización más detallada de este canal muestra sus tres

subunidades $Ca_v3.1$ ($\alpha1G$), $Ca_v3.2$ ($\alpha1H$) y $Ca_v3.3$ ($\alpha1I$), en donde, la subunidad $Ca_v3.1$ es altamente expresada en células del miometrio humano (Macintyre et al., 2007).

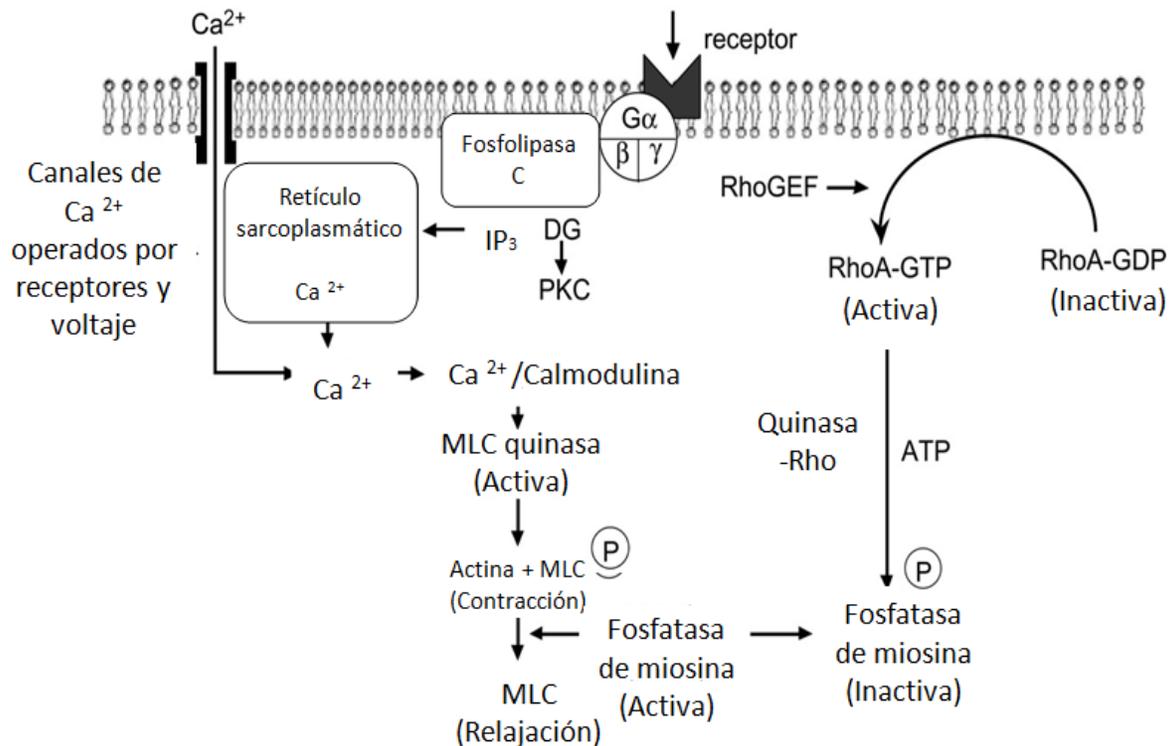


Figura 3. Rutas para la elevación de calcio intracelular mediante la activación de los canales iónicos y de la fosfolipasa C y la ruta de las proteínas Rho que puede activar o desactivar a la fosfatasa de la MLC. Tomado de Webb, 2003.

Otro de los mecanismos que permiten el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ es mediante la activación de la PLC, la generación de IP₃ y DAG; IP₃ induce la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (RS) a través de un ligando activado a canales de Ca^{2+} y DAG que activa la proteína cinasa C (PKC) como se muestra en la figura 3 (Macintyre et al., 2007). Factores como la OT y PGE₂ pueden activar las rutas de señalización que involucran a las proteínas G, caracterizadas por su capacidad para hidrolizar el guanosín trifosfato (GTP) y estimular o inhibir varias enzimas y canales iónicos que modulan la contractibilidad uterina. La unión de estos factores a los GPCRs conducen a la activación de las subunidades G α /G $\beta\gamma$ que activan el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ al ser liberado del RS; una vez liberado el Ca^{2+} en el medio intracelular, éste se une a la calmodulina formando un complejo que produce un

cambio conformacional en la calmodulina que conduce a la exposición de los sitios de unión a la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK). La unión de la calmodulina a la MLCK resulta en la activación de la cinasa y la fosforilación de la cadena ligera de miosina (pMLC), aumentando la actividad de la ATP-asa miosínica y, por lo tanto, se podrá producir la unión de la miosina con la actina en forma de puentes cruzados induciendo la contracción del músculo; mientras que para la relajación, la miosina se tiene que desfosforilar por medio de una fosfatasa de la MLC (MLCP) independiente de Ca^{2+} o tienen que reducirse las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para la disociación del complejo calcio-calmodulina. La contracción del músculo liso se encuentra controlada por el grado de fosforilación de sus cadenas ligeras-2 (LC2) (Ganong, 2006; Hudson y López-Bernal, 2012; López-Bernal, 2003; Macintyre et al., 2007; Sánchez, 1997; Stryer, 1990; Webb, 2003). Es importante mencionar que otro grupo de proteínas que pueden regular la relajación o contracción del músculo liso son la proteínas Rho, que son proteínas G pequeñas de bajo peso molecular, que se acoplan al GTP. La activación de RhoA a través de los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (Rho-GEFs) o de la PKC, inducen la activación de la cinasa de Rho (ROCK) que se encarga de regular la actividad de la MLCP (figura 3), ya que cuando esta enzima es fosforilada por ROCK, se inactiva y no promueve la relajación de la MLC (Hudson y López-Bernal, 2012; López-Bernal, 2003; Webb, 2003).

1.2.2.2 Regulación de los niveles de AMPc

A pesar de que los mecanismos bioquímicos del parto pretérmino aún no son muy claros, actualmente se ha podido establecer que la relajación del músculo liso y probablemente el mantenimiento de la quiescencia del útero es en gran parte consecuencia de la elevación intracelular de nucleótidos cíclicos como el AMPc y el GMPc (Adbel-Latif, 2001; Méhats et al., 2000; Méhats et al., 2004; Yuan y López-Bernal, 2007). El AMPc es un segundo mensajero intracelular, clave en procesos fisiológicos numerosos y su papel en la relajación del músculo liso uterino inducida a través de la inhibición de la movilización del calcio y la inhibición del aparato contráctil mediante la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) se ha convertido en un estudio central (Yuan y López-Bernal, 2007).

El AMPc es producido a partir de la actividad de la adenilato ciclasa (AC), que es un grupo de enzimas que se encuentran directamente involucradas en la síntesis de AMPc, cuyo núcleo catalítico consiste en un heterodímero pseudo-simétrico compuesto por dos regiones citosólicas altamente conservadas denominadas C_{1a} y C_{2a} , las cuales resultan ser importantes para que pueden unirse tanto en la proteína Gs como en el ATP (figura 4). Todas las isoformas de AC pueden ser activadas por la subunidad α de las proteínas Gs o puede ser activada de manera directa por la forskolina, la cual actúa sobre la subunidad catalítica de la enzima sin la necesidad de activar a la proteína G (Yuan y López-Bernal, 2007).

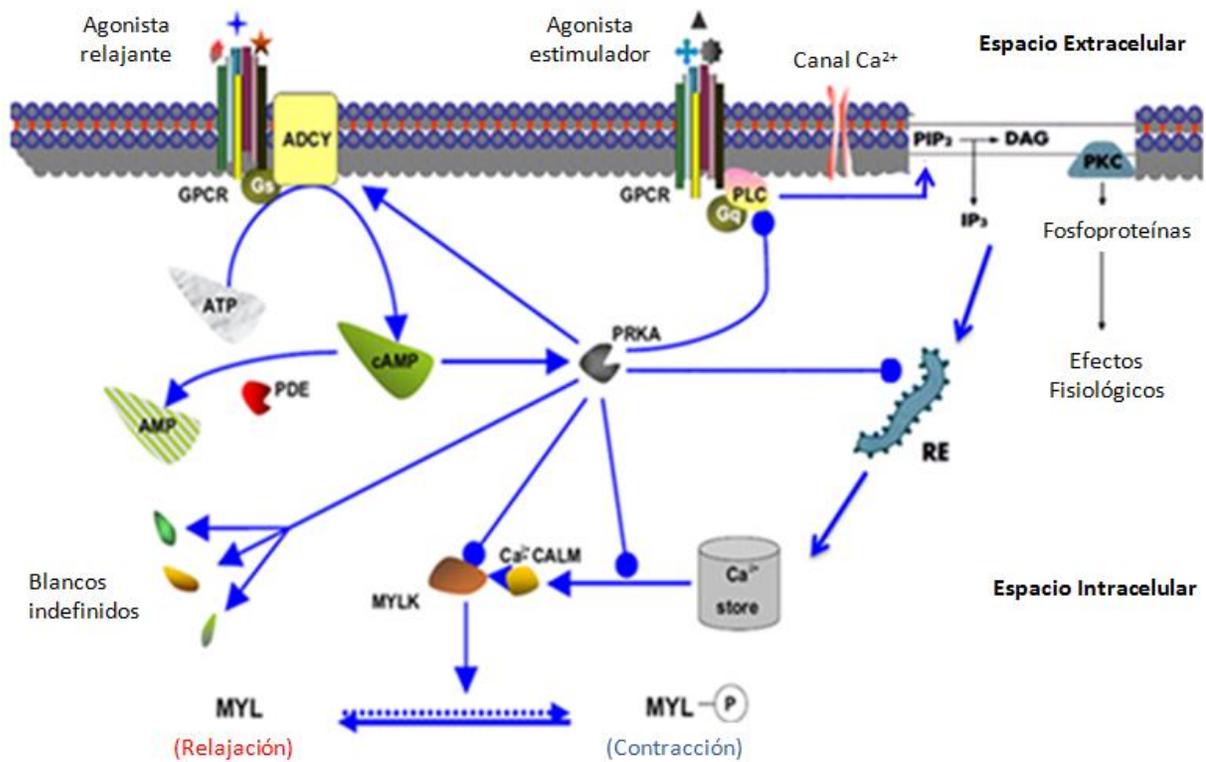


Figura 4. Ruta del AMPc y su participación en la inactivación del mecanismo contráctil del músculo liso mediante la desactivación de la fosfolipasa C y la inactivación del flujo de Ca^{2+} . (→ estimulación, —● inhibición). Tomado de Yuan y Lopéz-Bernal, 2007.

La acción de un agonista como las catecolaminas y PGs actúan sobre los receptores β -adrenérgicos y una vez activados estos se produce un cambio en la configuración que permite la interacción con la subunidad α de las proteínas G (Stryer, 1990; Yuan y López-

Bernal, 2007). Las proteínas G tienen tres subunidades: α , β y γ . La subunidad α puede unirse tanto a GTP como a GDP con una alta afinidad; cuando la subunidad α es activada se libera GDP y se une a GTP, e induce la disociación del complejo $\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha_s$ activa a la AC que se encarga de la conversión de ATP a AMPc al remover una molécula de pirofosfato y, en consecuencia, incrementan los niveles intracelulares de AMPc, este nucleótido cíclico se encarga de activar a la PKA. La PKA activada fosforila y altera la actividad de muchas proteínas involucradas en la contracción y relajación del músculo liso (Adbel-Latif, 2001; Carvajal y Weiner, 2003; Yuan y López-Bernal, 2007), tales como: la fosforilación e inactivación de la MLCK que produce una disminución en la afinidad de la enzima para el complejo Ca^{2+} /calmodulina, inhibe la activación de la PLC, inhibe la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio, activa las bombas de Ca^{2+} y activan la gran conductancia del Ca^{2+} activados por los canales de K^+ que llevan a la hiperpolarización de la membrana (Carvajal y Weiner, 2003). Por otra parte, los niveles de AMPc pueden verse regulados a la baja rápidamente por un grupo de enzimas denominadas fosfodiesterasas (PDE) que se encargan de hidrolizar e inactivar específicamente al AMPc, particularmente la familia de fosfodiesterasas-4 (PDE-4), cuya producción incrementa al final del embarazo y su función ha estado directamente involucrada en la contracción e inflamación del músculo uterino (Méhats et al., 2004).

1.3 Parto prematuro

El parto prematuro es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como aquel nacimiento que se origina cuando la edad del feto es menor a las 37 semanas de gestación, a través de una ruptura o desajuste en el mecanismo responsable del mantenimiento de la quiescencia uterina mediante la activación de uno o varios componentes que inducen el parto antes del periodo normal de gestación, lo que puede ocasionar una complicación obstétrica tanto en la madre como al feto durante y después del parto (Gutiérrez y Pareja, 2010; Hasbun y Hasbun, 2000; Norwitz y Robinson, 2001; Palencia, 2011). Se estima que cada año nacen aproximadamente 15 millones de niños prematuros en el mundo, de los cuales más de un millón mueren por complicaciones en el parto y muchos de los que sobreviven presentan algún tipo de discapacidad de por vida, como problemas de audición,

lenguaje, retraso mental, aprendizaje y visuales (OMS, 2013; Kinney et al., 2012); por esta razón, el parto pretérmino se encuentra entre los principales problemas de salud reproductiva a nivel mundial, que ocurre aproximadamente en un 12% del total de partos y representa más del 85% de la mortalidad (segunda causa de muerte entre los menores de 5 años) y morbilidad neonatal, siendo uno de los principales causales de problemas neurológicos a corto y largo plazo, del síndrome de dificultad respiratoria, enterocolitis necrotizante, displasia pulmonar, así como problemas de audición y locomoción (Buhimschi et al., 2000; Peltier, 2003; Villanueva et al., 2008; Yuan y López-Bernal, 2007).

Actualmente a pesar de que en los países desarrollados los avances médicos y sociales han mejorado la tasa de supervivencia de los recién nacidos mediante el desarrollo de varias pruebas de detección para predecir el parto prematuro como el monitoreo uterino en casa, la valoración de la maduración cervical, las mediciones de marcadores endocrinológicos, así como también el empleo de cuidados prenatales, las diversas consideraciones para prevenir el parto pretérmino o el desarrollo de fármacos tocolíticos, la tasa de incidencia de parto prematuro y la morbilidad relacionada siguen siendo un problema grave de recientes años (Norwitz y Robinson, 2001; Vause y Johnston, 2000; Villanueva et al., 2008; Yuan y López-Bernal, 2007). Por esta razón, el parto pretérmino ha sido considerado como un proceso complejo, en el cual los mecanismos fisiopatológicos que lo inducen siguen sin entenderse por completo, ya que la activación del miometrio puede seguir varias rutas (Gutiérrez y Pareja, 2010), y éstas pueden ser activadas por una gran variedad de factores, tanto internos como externos, encargados de modificar la actividad uterina (Vause y Johnston, 2000).

1.3.1 Causas que inducen el parto pretérmino

El proceso del parto prematuro representa posiblemente un síndrome más que un diagnóstico debido a que las causas que lo inducen son variadas y multifactoriales (Norwitz y Robinson, 2001; Palencia, 2011), que se manifiestan con la ruptura de los mecanismos normales que mantienen en estado de reposo al útero y puede iniciar debido a una serie de

factores de riesgo, tales como: variables genéticas, problemas de alcoholismo y drogadicción, partos pretérmino previos, abortos, el fumar, la edad materna, embarazos múltiples, factores ambientales, el nivel socioeconómico (Figura 5) (Vause y Johnston, 2000); así como las variables iatrogénicas que han representado una incidencia alta de partos prematuros realizadas por indicaciones médicas, ya sea para la madre o para el feto debido a algunos problemas que se pueden presentar durante el embarazo, como la restricción de crecimiento intrauterino, preeclampsia y placenta previa (Gutiérrez y Pareja, 2010; Norwitz y Robinson, 2001; Vause y Johnston, 2000).

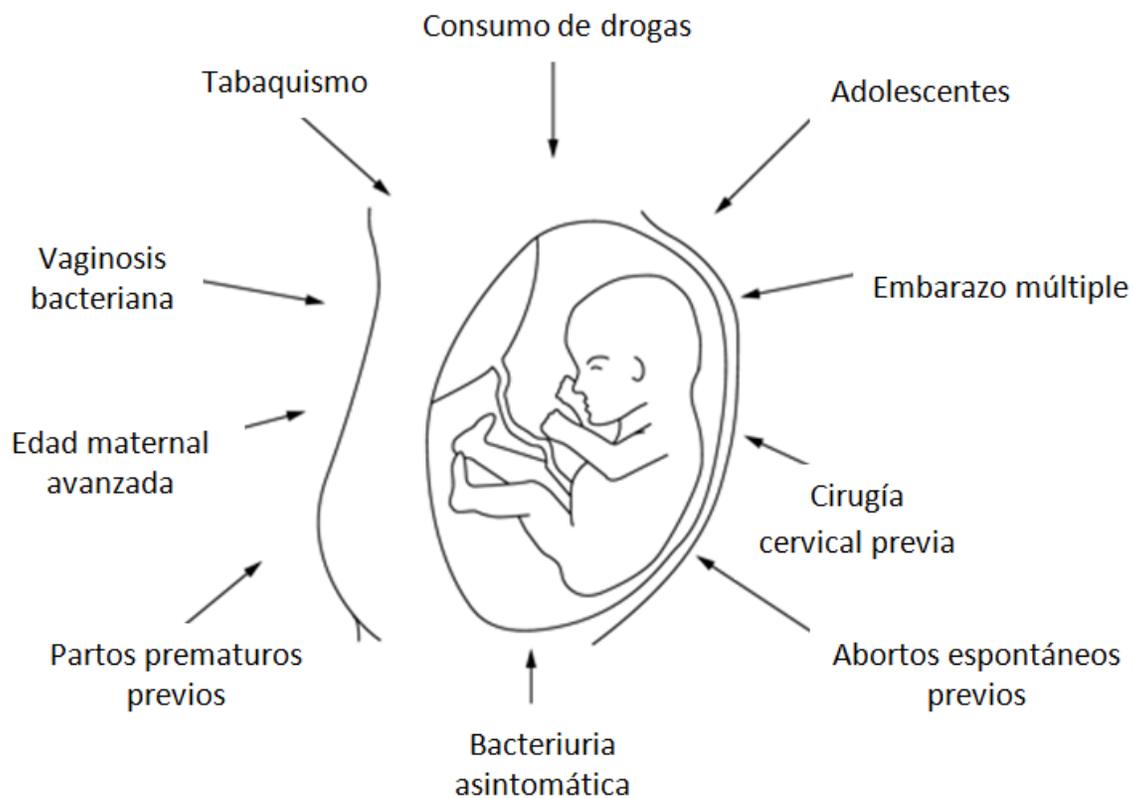


Figura 5. Diversos factores de riesgo que pueden inducir el parto prematuro (Vause y Johnston, 2000).

La información que se ha ido obteniendo sobre los partos prematuros ha sugerido que entre las causas principales relacionadas con este problema de salud reproductiva han sido las infecciones intrauterinas que ocupan la mayor incidencia, como: bacteriuria asintomática y vaginosis bacteriana, cuyas bacterias relacionadas con esta condición se encuentran:

Neisseria gonorrhoea, *Chlamydia trachomatis*, estroptococos del grupo B, *Ureaplasma urealyticum* y *Trichomonas vaginalis*. A pesar de que las infecciones intrauterinas se han reportado como el factor más común para inducir el parto prematuro mediante la activación y la síntesis de citocinas proinflamatorias, de acuerdo a la evidencia recabada se ha pretendido que estas citocinas también pueden constituir la ruta final hacia el parto a término (Farina y Winkelman, 2005; Hasbun y Hasbun, 2000; Méhats et al., 2000). Esta producción de mediadores inflamatorios desencadena una cascada que activa la producción de otras citocinas, PG's, y mediadores que se encargan de incrementar la actividad del miometrio e inducir la expulsión del feto (Méhats et al., 2000).

1.3.2 Citocinas y su participación en el parto normal y el parto prematuro

Las citocinas son proteínas pequeñas o péptidos solubles, producidas por una variedad de células mediante la estimulación de varios agentes inductores. Las fuentes celulares o blancos fisiológicos no se restringen al sistema inmunitario, aunque su principal fuente productora son las células de este sistema, tales como los monocitos y macrófagos (Simpson et al., 1997). Las citocinas se pueden agrupar de acuerdo a su estructura o función en interleucinas (ILs), factores de crecimiento transformante (TGFs), interferones (IFNs), factores estimulantes de colonias (CSFs), factores de necrosis tumoral (TNF) y quimiocinas, y se encuentran involucradas en la regulación de una variedad de funciones fisiológicas en humanos, tales como: la proliferación celular, reactividad inmunitaria, reparación o daño a tejidos, generación de células T citotóxicas, disfunción de órganos durante ciertas patologías y se encuentran en casi todas las actividades asociadas a la inmunidad e inflamación (Fernández-Martínez, 2011; Simpson et al., 1997).

Los leucocitos juegan un papel importante en la activación del trabajo de parto para inducir las contracciones uterinas, al invadir los tejidos maternos, fetales y placentarios, ya sea en presencia de una infección (figura 6); estas células blanco una vez activadas son capaces de sintetizar y liberar citocinas proinflamatorias, las cuales inducen una cascada de eventos que contribuyen a la síntesis de proteínas y enzimas que promueven los cambios uterinos y promueven la producción de efectores potentes en la contractibilidad miometrial necesarios

para el parto, tales como la síntesis de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$, y la liberación e incremento de la producción de otras citocinas proinflamatorias (Farina y Winkelman, 2005). Las citocinas proinflamatorias que se han visto implicadas para inducir el parto son: interleucina (IL)- 1β , IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α (Farina y Winkelman, 2005; Goldenberg et al., 2000).

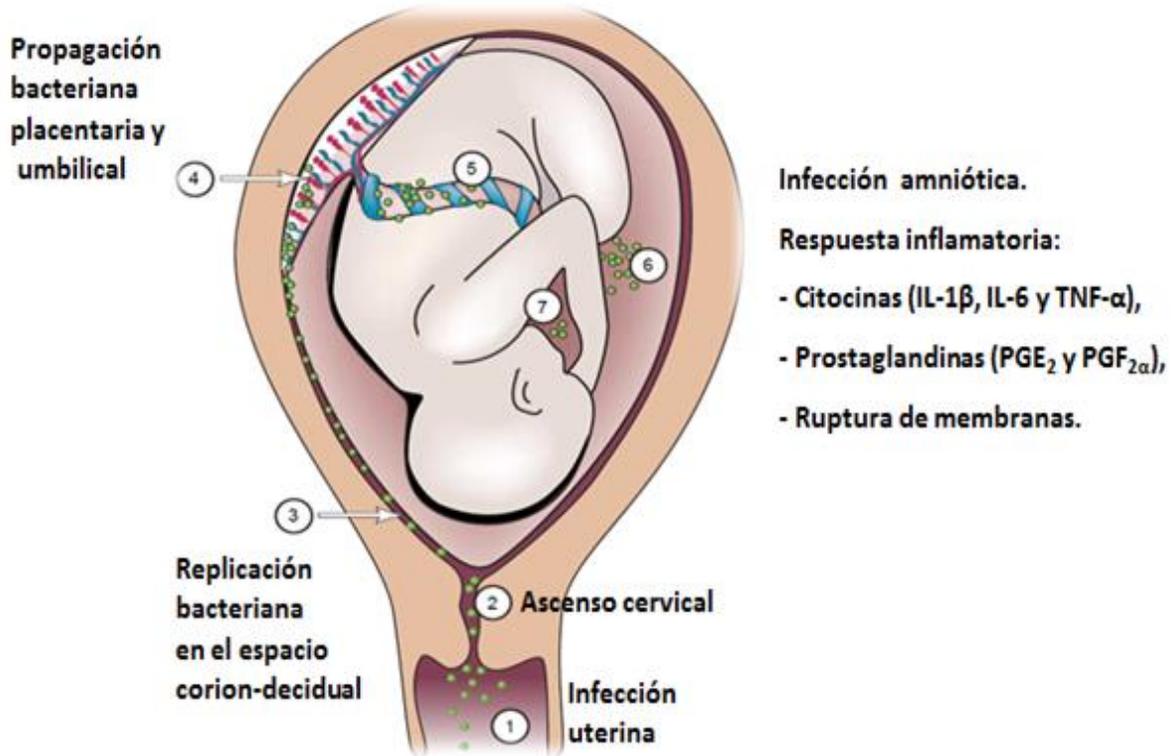


Figura 6. Mecanismo de infección y activación de la respuesta inflamatoria. Tomado de Elovitz y Mrinalini, 2004.

La IL-1 en el tejido endometrial se encarga de incrementar el tráfico de leucocitos para mejorar la vasodilatación, aumentando el número de células productoras de hormonas y citocinas que inician el parto, y es un agente de la maduración cervical que se encarga de estimular la producción de PGE_2 (dilatador cervical potente) e incrementa la producción de la expresión de metaloproteasas (MMPs); esta citocina también incrementa las $[Ca^{2+}]$ en el plasma, estimulando las contracciones. La IL- 1β que es una de las dos formas de IL-1, tiene una participación más activa al término del embarazo y una mayor expresión, e influye en la homeostasis del calcio para estimular las contracciones y la remodelación cervical (Farina y Winkelman, 2005).

Es importante mencionar que también la actividad de la IL-1 β , ha mostrado incrementar la actividad enzimática de las PDE-4 por la ruta dependiente de PGE₂ (Méhats et al., 2004). Por su parte, la función de IL-6 durante la fase temprana de inflamación, actúa para activar macrófagos, neutrófilos y promueve la diferenciación de las células “natural killer” (NK), las cuales invaden los tejidos cervicales y endometriales antes del parto, y actúa como un factor de crecimiento que promueve la expresión de los receptores de OT en las células miometriales; esta citocina también activa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal que es integral para la progresión del parto e incrementa la producción de prostaglandinas (Farina y Winkelman, 2005). IL-6 ha sido investigado como un marcador viable para identificar pacientes con un riesgo alto de parto pretérmino incluso en ausencia de una infección intrauterina (Goldenberg et al., 2000). La IL-8 en el embarazo se encarga de atraer y activar particularmente a los leucocitos e induce el cambio de forma cervical; induce que los neutrófilos de la periferia migren hacia la cérvix e induce la quimiotaxis, la proliferación de las células endoteliales, y la pérdida de adhesión focal en los fibroblastos, lo que puede tener implicaciones en la ruptura de membranas prematura y la remodelación de cuello uterino durante el parto. Esta citocina también promueve la síntesis de IL-1 e IL-6 en varios tipos celulares que se encargan de activar las células blanco para sintetizar mieloperoxidasa (Farina y Winkelman, 2005). El TNF- α , también llamado caquectina es una citocina proinflamatoria importante, denominada así por su capacidad de producir necrosis hemorrágica. Esta citocina es producida por monocitos, macrófagos, linfocitos y células natural killer, la cual juega un papel importante en las respuestas inflamatorias inducidas por algún daño o infecciones por virus, parásitos, hongos e infecciones bacterianas, cuyos niveles elevados se han visto asociados relacionados con un gran número de condiciones inflamatorias y autoinmunes (Fernández-Martínez, 2004; Muller et al., 1998; Teo, 2005); esta citocina induce la inhibición en la síntesis de colágena e incrementa la producción de MMPs para promover la preparación del cuello uterino; también la secreción de TNF- α conduce a la producción de otras citocinas proinflamatorias y la síntesis de PGs, razón por la cual ha sido una de las citocinas más estudiadas y quizá la más importante desde el punto de vista farmacológico (Farina y Winkelman, 2005; Fernández-Martínez, 2004).

Finalmente el TNF- α también se ha visto implicado en la señalización de la muerte celular programa (apoptosis) que contribuye a la ruptura de membranas y la progresión del parto (Farina y Winkelman, 2005).

1.4 Tratamiento para el parto prematuro

En la clínica los fármacos que se utilizan para evitar o retrasar las contracciones miométriales cuando se presentan antes del periodo normal de gestación, son denominados tocolíticos, cuyo objetivo es permitir que el feto pueda madurar lo más que se pueda en el vientre materno y de los cuales la mayoría se han desarrollado enfocándose en la reducción de los niveles de calcio intracelulares (Vause y Johnston, 2000). En la actualidad existe una gran variedad de estos agentes que se utilizan en la clínica, por lo que su uso debería ser individualizado y basado en la condición maternal, los efectos secundarios potenciales y la edad gestacional (Tan et al., 2006) para poder iniciar algún tipo de tratamiento y determinar que procedimiento se debe de seguir o que fármaco será más efectivo (Norwitz y Robinson, 2001). Estos fármacos tocolíticos pueden ser agrupados en cinco clases de acuerdo a su mecanismo de acción: los bloqueadores de canales de calcio, los betamiméticos, los antagonistas de receptores de OT, los inhibidores de PGs y el sulfato de magnesio (Tan et al., 2006).

1.4.1. Bloqueadores de canales de calcio y el sulfato de magnesio

El flujo de calcio intracelular juega un papel importante en el mecanismo de la contracción miométrial por lo que el uso de bloqueadores de los canales de calcio ha sido una opción en la clínica para el tratamiento del parto prematuro. En las células miométriales como ya se mencionó anteriormente existen dos tipos de canales de calcio, los del tipo L y los del tipo T. Uno de los fármacos empleados en la clínica es la nifedipina cuyo mecanismo de acción es mediante la unión a los canales de calcio dependientes de voltaje del tipo L, lo que causa que éstos permanezcan cerrados y por lo tanto se inhibe la contracción, sin embargo, este tipo de canales, no solo están presentes en células del miometrio sino también se

encuentran en otros tejidos y, a pesar de que no produce tantos efectos secundarios, la principal preocupación para su uso es que actúa sobre el flujo sanguíneo útero-placentario. Otro fármaco bloqueador de canales de calcio es el mibefradil, el cual es específico para los canales de calcio del tipo T que son específicos para el miometrio por lo tanto tiene el potencial para inhibirlo específicamente (Norwitz y Robinson, 2001; Vause y Johnston, 2000).

El sulfato de magnesio es usado como un agente tocolítico debido a que suprime la transmisión nerviosa al músculo liso uterino y reduce las $[Ca^{2+}]$ al inhibir los canales de calcio dependientes de voltaje en respuesta a los potenciales de acción pues compite con él, pero su uso es limitado debido a que ocasiona problemas de toxicidad (Norwitz y Robinson, 2001; Vause y Johnston, 2000).

1.4.2 Agonistas β_2 -adrenérgicos y la progesterona

Los agonistas- β_2 como la ritodrina actúan de manera similar a la progesterona, al activar a la AC e incrementar los niveles de AMPc. Estos fármacos han logrado retrasar el parto de 24 a 48 horas pero no han reducido de manera significativa el nacimiento prematuro, ni la morbilidad y la mortalidad perinatal; además, los betamiméticos se han visto relacionados con una gran incidencia de efectos secundarios asociados principalmente con el edema pulmonar, arritmias cardíacas e hipocaliemia (Tan et al., 2006; Vause y Johnston, 2000), por lo que pueden ser peligrosos pero se han empleado como una alternativa para ganar tiempo y poder hacer una administración de esteroides (Vause y Johnston, 2000).

La progesterona se presenta en altas concentraciones durante el embarazo y sus niveles disminuyen al finalizar el periodo de gestación. Se ha observado que esta hormona juega un papel importante para mantener en estado de quiescencia al útero al incrementar la producción de AMPc y como se mencionó anteriormente, los nucleótidos cíclicos inducen la relajación del músculo uterino a través de diferentes vías, desafortunadamente se ha demostrado que la progesterona exógena no tiene un efecto tocolítico clínicamente significativo en seres humanos (Vause y Johnston, 2000).

1.4.3 Inhibidores de prostaglandinas y antagonistas de la oxitocina

Las PG's son producidas a partir de AA mediante la actividad de las COXs, que son enzimas encargadas de catalizar su síntesis (Vause y Johnston, 2000). Estos eicosanoides en el parto pretérmino juegan un papel importante como agentes endógenos proinflamatorios que inducen las contracciones intrauterinas a través de la estimulación de los canales de calcio; además, las PGs causan maduración cervical y también participan en la regulación en la expresión de citocinas (Vause y Johnston, 2000). Existen dos tipos de ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), de las cuales se ha observado que durante el embarazo la producción de COX-1 es relativamente constante, mientras que la producción de COX-2 inducida por las citocinas, factores de crecimiento y endotoxinas (Graves, 1996) se eleva de manera significativa al final del embarazo y predomina en la membrana fetal y el miometrio, lo que indica su fuerte participación en labor de parto y la producción de las contracciones (Vause y Johnston, 2000).

La indometacina es un inhibidor potente de COX y puede ser usado para el tratamiento del parto pretérmino, sin embargo, este fármaco puede inhibir a COX-1 y COX-2, por lo que está asociado a complicaciones neonatales serias numerosas, tales como: problemas cardiovasculares, hemorragias intraventriculares, enterocolitis necrosante y el cierre prematuro del ducto arterial. Otros inhibidores de COX pero con menos efectos adversos es el sulindaco, fármaco que no atraviesa fácilmente la placenta y no está asociado con los cambios de volumen del fluido amniótico y la nimesulida, inhibidor específico de COX-2, por lo que puede ser un tocolítico efectivo pero que causa oligohidramnios; también puede inhibir directamente los canales de calcio del tipo T y L, por lo que podría ser un buen tocolítico profiláctico (Vause y Johnston, 2000).

La OT es una hormona que posee efectos estimulantes potentes y selectivos en el músculo liso del útero, que desencadena contracciones idénticas en amplitud, duración y frecuencia al final del embarazo y durante el trabajo de parto espontáneo (Graves, 1996). Esta hormona se encarga de activar a un receptor acoplado a una proteína G que a su vez activa a la PLC, la cual hidroliza al IP_3 y permite la liberación del calcio del RS y del AA,

precursor obligado de las PG's. El atosiban ha sido un fármaco antagonista específico de la OT que se ha utilizado en la clínica e inhibe competitivamente la unión de la OT con sus receptores pero este fármaco no es del todo específico en su unión, ya que también puede unirse a receptores de vasopresina arginina (Vause y Johnston, 2000).

En la actualidad a pesar de que se utilizan en la clínica varios agentes tocolíticos, ninguno de éstos ha resultado del todo efectivo debido a su falta de especificidad a las células miometriales, ocasionando en la mayoría de los casos varios efectos secundarios como taquicardia, edema pulmonar o hipertensión; además, estos agentes no han sido capaces de retrasar el trabajo de parto el tiempo suficiente para permitir el desarrollo adecuado del feto sin complicaciones o repercusiones (Norwitz y Robinson, 2001; Tan et al., 2006). Por esta razón, existe la necesidad de obtener fármacos nuevos que sean realmente eficaces y específicos para el tratamiento de parto prematuro, que logren disminuir la tasa de incidencia del parto prematuro, la mortalidad y morbilidad neonatal. Dada la importancia del sistema de segundos mensajeros, particularmente el AMPc para inducir la relajación miometrial, en estudios recientes ha sido un blanco de estudio debido que al incrementar sus niveles intracelulares inducen la relajación del miometrio a través de su efecto en múltiples blancos intracelulares como: los canales iónicos de calcio, los canales iónicos de potasio o la cinasa de la cadena ligera de miosina; además, otra característica que ha hecho llamativo el incremento de los niveles intracelulares del AMPc, es su participación en la inmunomodulación de varias citocinas proinflamatorias, que juegan un papel importante en la inducción del parto a término y pretérmino (Yuan y López-Bernal, 2007); lo que ha convertido a los inhibidores específicos de PDE-4, en un blanco potencial para el desarrollo de fármacos tocolíticos nuevos (Botella, 1997; Conti y Jin, 1999; Méhats et al., 2004; Méhats et al., 2007).

II. ANTECEDENTES

2.1 Fosfodiesterasas-4 (PDE-4) como blanco terapéutico

La superfamilia de PDEs comprende por lo menos 11 familias de genes relacionados (PDE1 a PDE11) que se han descrito hasta la fecha, los cuales han sido clasificados de acuerdo a sus secuencias de aminoácidos, su especificidad en los sustratos y la sensibilidad a los reguladores endógenos y compuestos farmacológicos (Méhats et al., 2004). Las PDEs son responsables de la hidrólisis AMPc y GMPc y, debido a las funciones importantes que realizan estos segundos mensajeros, se han convertido en excelentes objetivos para el desarrollo de agentes terapéuticos, aunque el gran número de isoformas de esta familia de enzimas ha presentado un desafío para el diseño y síntesis de inhibidores específicos de PDEs (Zheng et al., 2008).

La familia de PDE-4 que es de interés en este estudio, es un sistema enzimático responsable de hidrolizar al AMPc con alta afinidad y de manera específica (Méhats et al., 2004). Este grupo comprende múltiples enzimas codificadas por cuatro genes distintos pero relacionados, PDE-4A, PDE-4B, PDE-4C y PDE-4D, que generan más de 20 diferentes isoformas en mamíferos (Conti y Jin, 1999; Houslay et al., 1998; Méhats et al., 2000; Méhats et al., 2004). Las PDE-4 se subdividen en dos clases principales, las formas largas y cortas que difieren en la ausencia o presencia de dominios reguladores en su extremo amino terminal. Las formas largas (PDE-4A y PDE-4C) presentan un sitio de fosforilación para que PKA active estas isoformas en un bucle de retroalimentación a plazo corto, mientras que las formas cortas (PDE-4B y PDE-4D) controlan su transcripción mediante de los niveles de AMPc y promotores sensibles a hormonas, ya que estas conducen a una caída los niveles de AMPc después de una elevación prolongada del contenido de estos nucleótidos cíclicos (Méhats et al., 2004).

Los inhibidores de PDE-4 desde el punto de vista farmacológico se han considerado un blanco terapéutico para la intervención de enfermedades causadas o reguladas por mecanismos de transducción modulados por los nucleótidos cíclicos, ya que la inhibición

de estas enzimas ha evidenciado ser eficiente para incrementar la producción del AMPc intracelular y, como ya se mencionó anteriormente, este segundo mensajero juega un papel importante en funciones biológicas diferentes, especialmente en prevenir la inducción y el mantenimiento de la contracción a través de la estimulación de la PKA; así como la regulación negativa de la mayoría de las citocinas proinflamatorias y células inmunitarias, ejerciendo una actividad antiinflamatoria amplia, por lo que también han sido considerados para el uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como: el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica; también, se ha reportado que los inhibidores de PDE-4 pueden inhibir la producción de TNF- α mediante el incremento de los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10, la cual se encarga de regular negativamente a las citocinas proinflamatorias (Méhats et al., 2000; Méhats et al., 2004; Méhats et al., 2007; Oger et al., 2004; Zheng et al., 2008).

2.1.1 Inhibidores de PDE-4

A partir de los efectos interesantes que han mostrado los inhibidores selectivos de PDE-4 como miorelajantes y antiinflamatorios mediante la regulación del AMPc, el desarrollo y la evaluación de varios inhibidores selectivos de PDE-4 actualmente se han convertido en un blanco de estudio, sobre todo el estudio de las isoformas de esta familia de enzimas, con el fin de desarrollar fármacos que actúen de manera más específica, ya que estos fármacos se han vuelto atractivos para la prevención del parto prematuro y para el tratamiento de enfermedades relacionadas con desórdenes inflamatorios (Méhats et al., 2004; Méhats et al., 2007).

En la distinción farmacológica de las isoformas de PDE-4 para el desarrollo de fármacos más específicos y con el fin de reducir los efectos secundarios, se ha utilizado un criterio basado en su actividad mediante su sensibilidad relativa a rolipram, que es un fármaco perteneciente a la primera generación de inhibidores específicos de PDE-4, que ejerce un efecto relajante potente *in vitro* en tiras miométriales de mujeres embarazadas, razón por la cual este fármaco ha sido empleado en este estudio para comparar el efecto relajante de los análogos de talidomida (Figura7). El rolipram, además ha sido eficaz en el tratamiento de la

depresión; sin embargo, a pesar de que ha presentado propiedades antitumorales atractivas, antiinflamatorias e inmunosupresoras también se le ha relacionado con numerosos efectos secundarios en los que se incluyen náusea, emesis y secreción de ácido gástrico, por lo que su uso se ha limitado como prototipo para el descubrimiento y desarrollo de fármacos nuevos que puedan ser empleados en la clínica (Méhats et al., 2000; Vasta et al., 2004). En modelos experimentales el rolipram ha sido una herramienta efectiva que ha permitido observar los estados conformacionales de las formas cortas y largas de las PDE-4, los cuales han mostrado diferencias en la afinidad de cada una de sus isoformas, las que muestran una afinidad alta en el rango nanomolar (HPDE4) y las de afinidad menor en el rango micromolar (LPDE4).

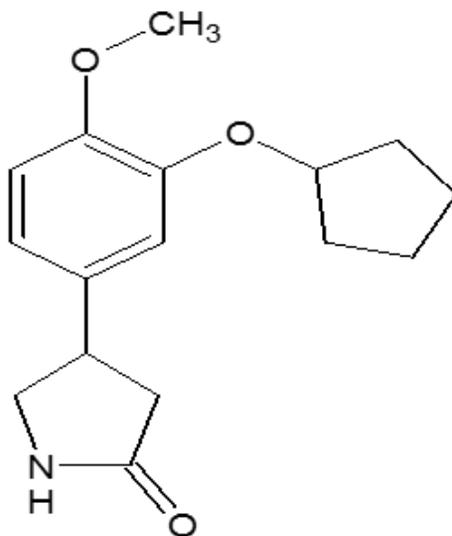


Figura 7. Estructura química del Rolipram. Tomado de Houslay et al., 2005.

Hay inhibidores selectivos de segunda generación, tales como piclamilast, otro prototipo utilizado como herramienta nueva que permite identificar ciertos efectos secundarios relacionados con la inhibición de HPDE-4, así como los efectos terapéuticos potenciales relacionados con la interacción de LPDE-4 en procesos inflamatorios al término del embarazo, debido a presenta una inhibición con la misma afinidad sin discriminar cualquiera de los estados conformacionales de PDE-4 en comparación con el rolipram (Méhats et al., 2000). Otros inhibidores como el cilomilast y roflumilast fueron diseñados originalmente como fármacos para el tratamiento de trastornos respiratorios tales como: el

asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, con efectos secundarios reducidos en comparación con el rolipram, pero también se ha evidenciado la inhibición de las contracciones espontáneas del miometrio a término, dependientes de la concentración. Estos compuestos han soportado la idea de que los efectos secundarios de los inhibidores de PDE-4 pueden ser separados de sus beneficios terapéuticos, mediante el desarrollo de compuestos que actúen de manera más específica sobre las isoformas de PDE-4 (Oger et al., 2004; Yuan y López-Bernal, 2007). Uno de los inhibidores de PDE-4 que ha sido recientemente aprobado en marzo del 2014 por la diligencia de Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de artritis psoriásica activa, ha sido el apremilast, inicialmente diseñado para el tratamiento de enfermedades crónicas de la piel y articulaciones, tales como, la psoriasis, artropatías psoriásicas y el síndrome de Behçet, que en ensayos clínicos ha presentado resultados buenos. Esta molécula novedosa es resultado de un grupo de compuestos análogos de la talidomida, de los cuales se hablará más adelante (Schafer et al., 2014; Schett et al., 2010).

2.1.2 Inhibidores de PDE-4 como tocolíticos

Las PDEs en los humanos se expresan en diferentes órganos y células, pero en el miometrio humano se ha identificado la presencia de 5 familias diferentes de PDEs (PDE-1 a PDE-5) de las cuales; PDE-4 se ha visto estrechamente relacionada con la actividad uterina durante el embarazo, debido a que se ha reportado su ausencia en la mayor parte del periodo de gestación, probablemente en consecuencia de los niveles altos de la progesterona, lo que ha sugerido que la inhibición de estas enzimas puede ser parte del mecanismo que induce la relajación miometrial y el mantenimiento de la quiescencia uterina al mantener elevados los niveles de AMPc, pero al llegar al término se ha registrado en el miometrio un incremento significativo de estas enzimas, siendo la fuente principal de hasta un 75% de la actividad de las PDE-4 (Méhats et al., 2004).

La evidencia de las propiedades relajantes de los inhibidores selectivos de PDE-4 ha llamado la atención de un grupo de investigadores franceses, Méhats y colaboradores (2004, 2007), que han evidenciado la participación de PDE-4 en la contractibilidad

miometrial a través del efecto del rolipram, que exhibió inducir una relajación completa de las tiras miometriales en estado embarazado y no embarazado; y el efecto de los agonistas β -adrenérgicos que son capaces de inducir una relajación completa en el miometrio no embarazado pero incapaces en inhibir las contracciones en un estado embarazado. Estos efectos reflejaron la desensibilización del sistema β -adrenérgicos al final del embarazo, e hicieron evidente que la aplicación de un inhibidor de PDE-4 y el efecto de los β -miméticos pueden potenciar el efecto de la relajación en tejidos embarazados; sin embargo, en tejidos no embarazados no se tuvo ese efecto sinérgico, lo que fue importante para evidenciar el papel de las PDE-4s en la contractibilidad del estado embarazado.

Otra evidencia recabada por este grupo de investigadores fue la determinación de la expresión de las isoformas de PDE-4 en el miometrio humano, en tejidos embarazados y no embarazados, basados en análisis moleculares, donde revelaron que los patrones de expresión del ARNm de sus cuatro genes se expresan de manera simultánea en el músculo uterino, pero se ha observado una diferencia significativa en cuanto a los niveles de expresión de cada uno de estos subtipos, en donde, PDE-4A y PDE-4C se expresan débilmente o no se expresan al término del embarazo, en cambio el ARNm de PDE-4B y PDE-4D se expresan de manera más abundante al final del embarazo; de estas últimas isoformas, de manera más específica se ha identificado que el subtipo PDE4-B2 incrementa en mayor cantidad sus niveles, seguido de los subtipos PDE-4D1 y PDE-4D2. Así mismo, la actividad de las PDE-4s a través de la inducción selectiva de las formas cortas ha indicado un incremento dependiente de la concentración de AMPc intracelular. Por otro lado, también ha reportado que las PGE₂, de las cuales ya se mencionó con anterioridad que son efectores potentes que inducen el parto, se han visto relacionadas con la inducción de las formas cortas de PDE-4B2 y PDE-4D del músculo liso miometrial a través de la ruta dependiente de AMPc (Méhats et al., 2004; Méhats et al., 2007). Esta regulación puede ocurrir durante el parto, cuando las concentraciones de PGE₂ incrementan dramáticamente, pero también pueden incrementar por ciertas situaciones fisiopatológicas, relacionadas con las inflamaciones intrauterinas inducidas por IL-1 β que también incrementa la producción de PGE₂ (Méhats et al., 2007).

Y por último, otro de los hallazgos de Méhats y colaboradores (2007) ha sido la actividad de PDE-4 que no solo se limita al tejido miometrial, sino también a los tejidos del corion y el amnios, estos datos han sido de importancia debido a que las membranas amniocoriónicas son la fuente principal de los mediadores proinflamatorios como TNF- α e IL-1 β , que a su vez induce la síntesis de agentes uterotónicos como las PGs y la activación de las MMPs. Todos los datos obtenidos por estos investigadores han hecho de los inhibidores de PDE-4 moléculas particularmente atractivas para la prevención del parto pretérmino, ya que su combinación miorelajante y antiinflamatoria, desde el punto de vista farmacológico no solo lograría retrasar las contracciones un tiempo suficiente, sino también lograrían disminuir las consecuencias que ocasionan los partos prematuros inducidos por una inflamación (Méhats et al., 2004). Es importante resaltar que en ensayos para evaluar el efecto relajante de los inhibidores de PDE-4 en comparación con algunos fármacos que se utilizan actualmente en la clínica para el tratamiento del parto pretérmino, como el salbutamol, que es un agonista β_2 -adrenorreceptor, se han observado mejores resultados en la relajación de las tiras de tejidos miometriales con estos compuestos nuevos que inhiben la actividad de las PDE-4 para incrementar los niveles intracelulares de AMPc (Oger et al., 2004).

2.2 Talidomida

La talidomida (α -N-ftalimidoglutaramida) como se muestra en la figura 8, es una sustancia química derivada del ácido glutámico (Teo, 2005) conformado por un anillo glutaramida y un anillo ftalimido (2-(2,6-dioxido -3-piperidil)-H1-isondolina-1,3 (H2)-diona o N-ftalimido-glutarimida (Fernández-Martínez et al., 2001; Muller, et al., 1996). Este fármaco es un polvo blanco cristalino insípido con un peso molecular de 258.2 g/mol y con un punto de fusión de 269-271°C; es poco soluble en agua pero puede disolverse fácilmente en dimetilsulfóxido (DMSO) (Somers, 1960).

La talidomida es una molécula poco estable, ya que a un pH fisiológico promueve su hidrólisis espontánea producida en ambos anillos, por lo que se ha postulado que la talidomida puede actuar como un profármaco para sus productos de hidrólisis o metabolitos

(Muller, et al., 1996); esta molécula posee un centro quiral en el anillo glutaramida, el cual permite que se originen dos tipos de enantiómeros, el “R” y el “S”; un cambio de pH puede modificar la orientación del hidrógeno y producir un cambio estereoquímico (100% “R” y 100% “S”) o se puede producir una mezcla racémica (50% “R” y 50% “S”), en donde, el isómero “S” se ha relacionado con la actividad teratogénica dependiente de la dosis, así como la antiinflamatoria y el isómero “R” se ha relacionado con los efectos sedativos, así como los antieméticos (Fernández-Martínez, 2011; Muller, et al., 1996).

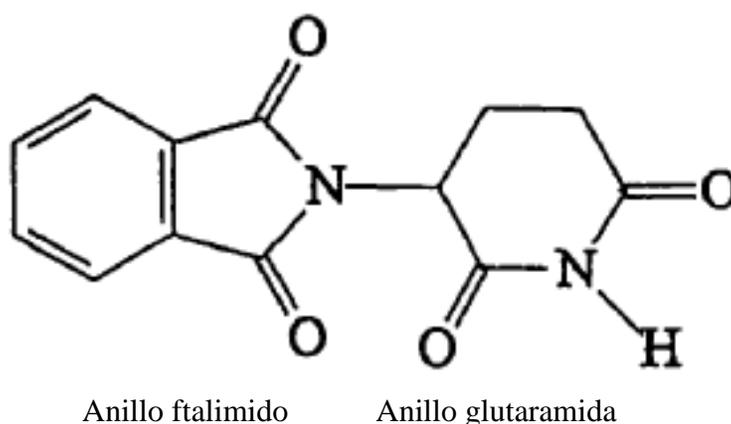


Figura 8. Estructura química de la talidomida. Tomada de Fernández-Martínez, 2011.

La talidomida fue sintetizada por primera vez en Alemania en el año de 1954, desarrollado inicialmente como un agente hipnótico-sedante similar a los barbitúricos pero sin sus efectos adictivos y tóxicos, siendo así aceptada y comercializada rápidamente en varios países excepto en Estados Unidos debido a la FDA, ya que requería de más información en los reportes de neuritis periférica. Al poco tiempo este fármaco se convirtió en un agente inductor de sueño muy común con propiedades antieméticas buenas, por lo que fue recomendado a mujeres embarazadas en el primer trimestre de embarazo para controlar las náuseas (Fernández-Martínez et al., 2001; Fernández-Martínez, 2011; Muller et al., 1996; Somers, 1960; Teo, 2005); a partir de entonces surgieron varios reportes sobre defectos de nacimiento y deformidades en los miembros de los bebés (amelia y focomelia). Lenz en 1961 publicó el primer escrito en el que se sugirió que la talidomida era la responsable de estos efectos teratogénicos que surgieron en los años de 1956 y 1961 en los recién nacidos,

y pronto resultó evidente esta relación, por lo que tuvo que ser retirada del mercado (Fernández-Martínez, 2011; Lenz, 1992; Muller et al., 1996; Teo, 2005).

Años después, el dermatólogo Sheskin en 1965, al administrar talidomida como sedante en pacientes que sufrían eritema nodoso lepromatoso (ENL, complicación dermatológica severa), pudo evidenciar las propiedades antiinflamatorias de la talidomida, ya que, resultó ser efectiva en la cura de las lesiones causadas por esta enfermedad en las primeras 48 h. Este descubrimiento recobró el interés en el uso de la talidomida y su mecanismo de acción, y sentó las bases para la síntesis de compuestos nuevos, análogos de talidomida que pudieran conservar sus propiedades terapéuticas, libres de efectos teratogénicos y químicamente más estables para brindar una aplicación más efectiva y segura en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas y degenerativas (Fernández-Martínez et al., 2004; Fernández-Martínez, 2011; Muller et al., 1996).

2.2.1 Mecanismos de acción de la talidomida

En estudios para definir el blanco fisiológico de la talidomida se han encontrado una amplia variedad de actividades biológicas, relacionadas principalmente con los mecanismos inmunomoduladores y antiinflamatorios debido a su rango amplio para inhibir y estimular efectos en el sistema inmunitario, cuyo mecanismo de acción más plausible es la inhibición de la producción de la citocina proinflamatoria, pronecrótica y pleiotrópica TNF- α , a través de la degradación de su RNAm, aunque también se le ha relacionado con neurotoxicidad, teratogénesis, angiogénesis y neovascularización (Fernández-Martínez, 2011; Muller et al., 1996). Otros de los mecanismos que se han propuesto mediante los cuales la talidomida puede regular su actividad inmunomoduladora, es a través de la reducción del número de células formadoras de inmunoglobulinas-M (IgM) y mejora la secreción de interleucina-2 (IL-2), citocina antiinflamatoria en células mononucleares de la sangre periférica; así también, se ha observado su participación en la inhibición de la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B), que es un factor de transcripción nuclear que ha recibido mucha atención, debido a que su activación provoca diversos y prominentes papeles en el mantenimiento de la homeostasis, el control de desarrollo de la enfermedad, la regulación

de la supervivencia celular y la activación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, por ejemplo, su activación provoca la producción de citocinas proinflamatorias incluyendo la más potente, TNF- α (Fernández-Martínez, 2011).

2.2.2 Uso actual de la talidomida en la clínica

Basados en las propiedades inmunomoduladoras de la talidomida al inducir un efecto antiinflamatorio mediante la inhibición de la producción de TNF- α principalmente y en consecuencia la inhibición de otras citocinas como IL-1 β , IL-6, y la estimulación de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Teo, 2005), actualmente en la clínica el uso de este fármaco se ha aprobado, incluso por la FDA en EU, para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades crónico degenerativas, inflamatorias y condiciones autoinmunes, en las cuales se han reportado resultados satisfactorios, tales como en: el eritema nodoso leproso, la enfermedad de Crohn, shock séptico, artritis reumatoide, caquexia y aftas asociadas al SIDA, la reacción injerto contra huésped y la enfermedad de Behçet (Fernández-Martínez, 2011; Muller et al., 1996; Muller et al., 1998); es importante destacar que el uso de este fármaco no se ha limitado a este tipo de enfermedades, ya que otros efectos que ha demostrado la talidomida, como su actividad antigeogénica, independiente a su efecto inmunomodulador, ha sido de interés para su uso en el tratamiento de condiciones oncológicas, cuya eficacia ha sido observada en ensayos humanos para el cáncer de páncreas, mieloma múltiple, linfoma de células de manto, glioma y melanoma metastásico (Teo, 2005). Aunque, para el uso de este fármaco se han tomado medidas antes de tener acceso a un tratamiento con talidomida o sus análogos, ya que su uso se ha restringido a través de un sistema para la educación de la talidomida y un programa para la prescripción con seguridad (STEPS), el cual es estricto y exhaustivo para prescribirla con seguridad en pacientes sin embarazos posibles debido a su potencial de riesgo para producir teratogenicidad (Fernández-Martínez, 2011; Teo, 2005).

2.3 Análogos de la talidomida como inhibidores de PDE-4

Debido a las propiedades terapéuticas importantes que ha presentado la talidomida y su papel central en la respuesta inmunitaria a través de la inhibición en la producción de TNF- α y la cascada inflamatoria, varios grupos de investigadores, químicos, clínicos y farmacólogos han diseñado y sintetizado una gran variedad de familias de análogos de la talidomida con el fin de aumentar su estabilidad química, su potencia como inhibidor de TNF- α y su eficacia inmunomoduladora; así como la disminución de sus efectos secundarios y la eliminación o disminución de sus efectos teratogénicos (Fernández-Martínez, 2011; Muller et al., 1996; Muller et al., 1998).

Algunos de los análogos se han sintetizado con base en sus productos de hidrólisis del anillo glutaramida de la talidomida que conduce a la formación de metabolitos N-ftaloilglutamina y N-ftaloilisoglutamina, y se ha evidenciado en algunos estudios la importancia del anillo ftalimido intacto (Muller, 1996), y otros son similares a sus metabolitos hidroxilados que son potentes inmunomoduladores. Entre las varias familias de análogos nuevos y prometedores que se han sintetizado, hay dos de ellas que se han mostrado ser excepcionales como inhibidores de TNF- α potentes: el primer grupo compuesto por moléculas muy similares a la talidomida en cuanto a su estructura y función, son conocidos como fármacos inmunomoduladores debido a sus propiedades coestimuladoras de células T, las cuales promueven la secreción de IL-2 e interferón (IFN) γ , inhiben la producción de IL-1 β e IL-6 y aumenta la producción de IL-10 que es una citocina antiinflamatoria del tipo Th2 (humoral) en PBMC estimuladas; entre los miembros más importantes de esta familia se encuentra pomalidomida y lenalidomida (Fernández-Martínez, 2011).

El segundo grupo de inhibidores efectivos de TNF- α se han sintetizado con base al parecido estructural de los productos de hidrólisis de talidomida, como el apremilast que ha sido uno de los fármacos más prometedores de los análogos de talidomida. Esta familia de análogos, además de incrementar la síntesis de IL-10, que conserva y potencia su efecto regulador sobre los niveles de TNF- α , han mostrado una actividad biológica que no presenta la

talidomida, ya que son inhibidores potentes y específicos de PDE-4, que como se mencionó es la enzima principal que cataliza la hidrólisis del AMPc y está ampliamente distribuida en los monocitos y macrófagos, células que son principales productoras de TNF- α (Fernández-Martínez, 2011; Muller et al., 1998). Esta característica de inhibición de PDE-4, es lo que hace llamativa a esta familia de compuestos, motivo por el cual en esta investigación fueron evaluados dos (de los más efectivos) de cuatro análogos pertenecientes a este grupo, debido a que ha sido bien documentado que los niveles elevados de AMPc inhiben la producción de TNF- α , causando un efecto inmunomodulador, que se encarga de regular a la alza o a la baja la síntesis de citocinas proinflamatorias (Muller et al., 1998); por otro lado, como se mencionó anteriormente, el papel central que juega el incremento de los niveles intracelulares de AMPc para la relajación del músculo liso uterino hace que este tipo de compuestos sean candidatos viables como agentes tocolíticos nuevos para retrasar el parto prematuro.

Algunos de los compuestos que pertenecen a este grupo de inhibidores específicos de PDE-4 y que fueron evaluados en este trabajo son: 3-ftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (FDPM_e), 3-(4-amoniftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4AFDPM_e); 3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4-NO₂FDPM_e) y 3-tetrafluoroftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (TFFDPM_e) (Figura 9). En la tabla 1 y 2 se hace un resumen de algunos efectos inmunomoduladores en las citocinas que se han visto involucradas en inducir las contracciones intrauterinas y algunos de los posibles mecanismos de acción de la talidomida y los cuatro análogos (Fernández-Martínez et al., 2004; Fernández-Martínez, 2011).

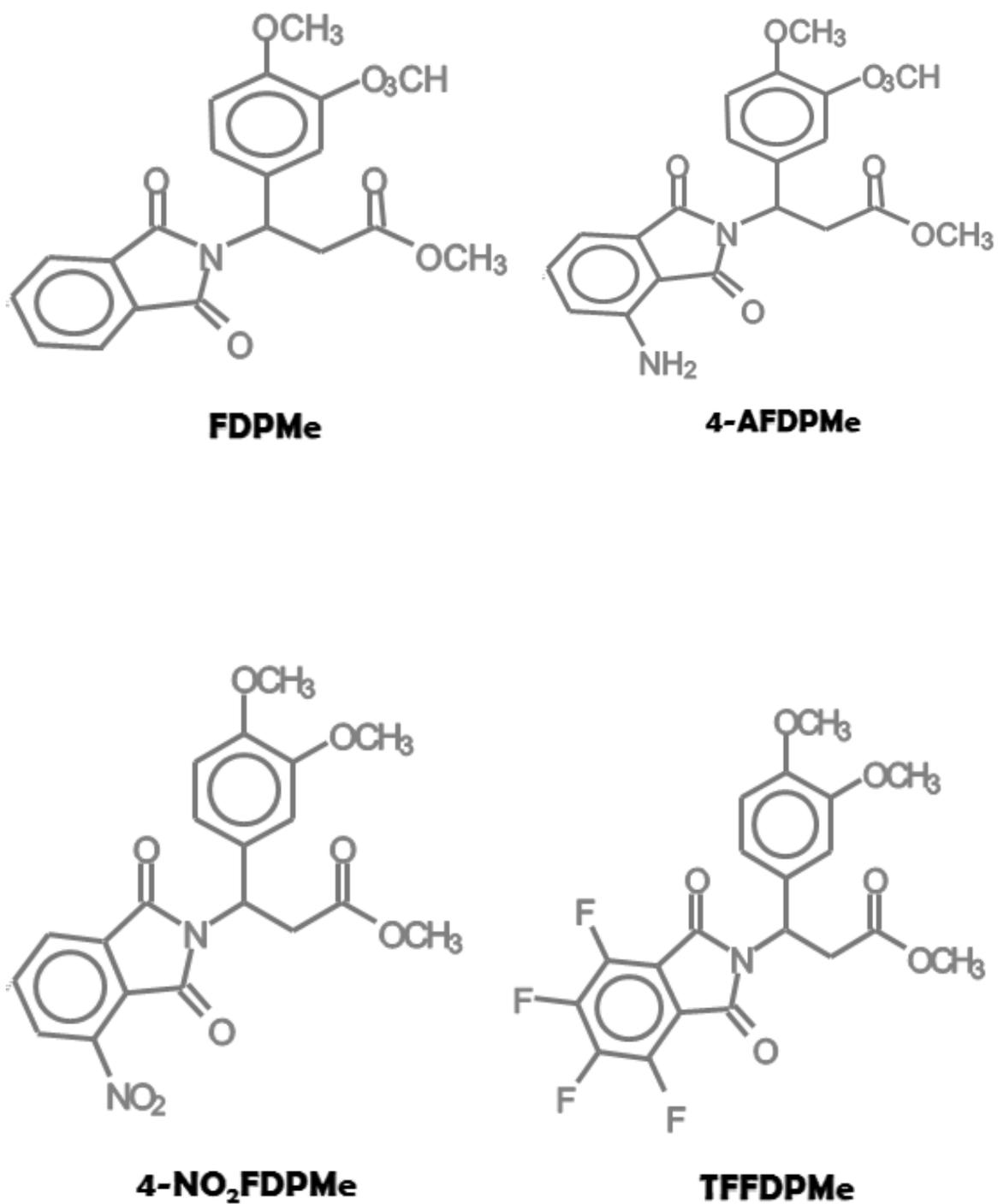


Figura 9. Estructura química de los cuatro análogos de la talidomida. Tomada de Fernández-Martínez, 2011.

Tabla 1. Propiedades inmunomoduladoras en citocinas de los cuatro análogos de talidomida evaluados.

ANÁLOGOS	TNF- α CI ₅₀ (μ M)	IL-1 β CI ₅₀ (μ M)	IL-6 CI ₅₀ (μ M)	Veces más potente que Tal (inhibición de TNF- α)
Talidomida	194	↓SI	↓SI	1.00
4NO2FDPM e	64	ND	ND	3.03
4AFDPM e	0.45	↓SI	↓SI	431.11
TFFDPM e	0.26	0.40	0.30	746.15
FDPM e	2.90	↓SI	↓SI	66.89

↓ Inhibición en la producción; ND, no disponible; IC₅₀, concentración inhibitoria-50 (micromolar, μ M) en la producción de TNF- α y otras citocinas producidas por la estimulación de lipopolisacaridos en PBMC (Fernández-Martínez, 2011).

Tabla 2. Mecanismos moleculares de acción posibles de talidomida y los cuatro análogos de talidomida evaluados.

ANÁLOGOS	PDE-4 CI ₅₀ (μ M)	Degradación del RNAm de TNF- α .
Talidomida	> 500	↑SI
4NO2FDPM e	ND	ND
4AFDPM e	ND	ND
TFFDPM e	4.70	NO
FDPM e	2.50	NO
Rolipram	0.40	ND

IC₅₀, concentración inhibitoria-50 (micromolar, μ M) en la actividad enzimática de PDE-4;
↑ incrementa su degradación; ND, no disponible (Fernández-Martínez, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la incidencia de partos prematuros sigue siendo una de las afecciones principales que causa la morbilidad y mortalidad neonatal a nivel mundial (aproximadamente del 12 %). El parto prematuro es inducido esencialmente por infecciones intrauterinas y es tratado en la clínica con medicamentos llamados tocolíticos, éstos permiten retrasar el parto de 2 a 7 días, tiempo que resulta ser suficiente solo para trasladar a la paciente a una institución de salud de mayor nivel pero no para asegurar el desarrollo adecuado del producto; además, los agentes tocolíticos son pocos y pueden provocar efectos secundarios adversos, tanto para la madre como para el feto. Por lo tanto, existe la necesidad de obtener moléculas nuevas con uso potencial como fármacos tocolíticos, así como de estudiar su mecanismo de acción; los análogos de talidomida inhibidores de PDE-4 que elevan al AMPc pueden ser una alternativa viable como agentes inmunomoduladores y relajantes del músculo liso cuya evaluación contribuya al avance en el diseño de compuestos más estables, efectivos y seguros para tratar el nacimiento pretérmino.

IV. HIPÓTESIS

Dos análogos de talidomida tendrán efectos relajantes del miometrio humano embarazado mediante su mecanismo de acción como inhibidores de la PDE-4.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Evaluar las propiedades relajantes en miometrio humano embarazado y el mecanismo de acción de dos análogos de talidomida.

5.2 Objetivos específicos

- Construir las curvas de concentración-respuesta de cuatro análogos de talidomida en un modelo de útero embarazado humano para observar sus propiedades útero-relajantes.
- Determinar la CI_{50} y la respuesta máxima de cuatro análogos de talidomida, así como del rolipram (inhibidor selectivo de PDE-4) y un análogo del AMPc (8-Br-AMPc) mediante un análisis de curvas para comparar su efecto útero-relajante posible.
- Seleccionar los dos análogos con mejor efecto útero-relajante y evidenciar a través de un modelo funcional si uno de los mecanismos de acción es el bloqueo de canales de calcio.
- Cuantificar los niveles de AMPc en un cultivo celular ante la presencia de dos análogos de talidomida para comprobar si su mecanismo de acción es por medio de la inhibición de PDE-4.
- Corroborar la presencia de PDE-4B2 y de pMLC mediante inmunocitoquímica para evidenciar el efecto de dos análogos sobre los niveles de fosforilación de la MLC inducida por OT.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Fármacos y soluciones

Todos los reactantes usados para las determinaciones fueron adquiridos de la mejor calidad disponible en el mercado. Los cuatro análogos de la talidomida: 3-ftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (FDPMe); 3-(4-amoniftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4AFDPMe); 3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4-NO₂FDPMe) y 3-tetrafluoroftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (TFFDPMe) ya habían sido sintetizados siguiendo la ruta sintética descrita por Muller y colaboradores (Muller et al., 1996; Muller et al., 1998). Las condiciones de reacción fueron modificadas y desarrolladas anteriormente en el laboratorio donde se ha desarrollado el trabajo experimental (Fernández-Martínez et al., 2001; Fernández-Martínez et al., 2004). El rolipram inhibidor específico de PDE-4, el 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) inhibidor no selectivo de PDEs y la forskolina un activador de la AC fueron comprados a Sigma-Aldrich, México. Los compuestos fueron disueltos en DMSO y etanol (1:2), en donde la concentración final del DMSO fue de 0.33% del volumen total de 3 mL de cada cámara en los estudios *in vitro*; la cantidad de disolvente utilizado no afectó la actividad del miometrio, ni la viabilidad celular. La solución Ringer que se utilizó a lo largo de los experimentos fue preparada de la siguiente manera (mM): NaCl 144, NaHCO₃ 30, KCl 6.2, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄ 0.5, CaCl₂ 2.5, y glucosa 11.1, a un pH de 7.4.

6.2 Colección de tejidos

Las muestras de tejido miometrial fueron tomadas con una incisión uterina del margen medio-superior en mujeres con embarazo normal a término (de 37 a 42 semanas de gestación) sometidas a una cesárea electiva. Todas las cesáreas fueron realizadas antes del comienzo del trabajo de parto debido a que el procedimiento se llevó a cabo por una solicitud de la madre, por cesárea previa o por un mal acomodo del feto. De cada una de las donantes se obtuvo un consentimiento informado por escrito. Este estudio fue aprobado por

el Comité de Ética del Hospital General, y se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki.

6.3 Estudios funcionales *in vitro* con tiras de miometrio humano embarazado

6.3.1 Efecto inhibitorio sobre contracciones espontáneas

Para determinar las propiedades de los efectos inhibitorios de las contracciones espontáneas de los cuatro análogos de talidomida (4AFDPM_e, 4NO₂FDPM_e, TFFDPM_e, FDPM_e), 8-Br-AMPC y el rolipram se utilizaron fragmentos de tejidos miometriales aislados de mujeres embarazadas. Una vez obtenidas las muestras se colocaron inmediatamente en una solución salina fisiológica (Ringer) y fueron transportadas al laboratorio. Los tejidos fueron almacenados a 4 °C y fueron trabajados dentro de las primeras 24 horas de su extracción. Se obtuvieron seis tiras previamente cortadas de la muestra de miometrio embarazado de aproximadamente 3-4 mm ancho y 8-10 mm de largo, cada fragmento uterino se colocó verticalmente en una cámara para tejidos aislados que contenían una solución Ringer en un volumen de 3 mL y se prepararon para la tensión isométrica, uno de los extremos del fragmento se sujetó a la base de la cámara y el otro extremo se unió a un transductor de tensión isométrica FT03C por medio de un hilo de seda quirúrgica para ambos lados. La temperatura en cada una de las cámaras se mantuvo a 37 °C y la solución Ringer fue constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de 5 % de CO₂ y 95 % de O₂, a un pH de 7.4.

Los tiras miometriales fueron tensionadas a 2 g durante todo el experimento, y la actividad contráctil de las tiras uterinas se registró isométricamente por medio de un transductor de tensión FT03 conectado a un polígrafo (Grass Instrument Grass Division/Astro-Med, Inc, West Warwick, RI, U.S.A.) acoplado a una computadora; los datos se registraron y analizaron usando un sistema PolyVIEW 2.5 (Grass Instrument Division/Astro-Med, Inc, West Warwick, RI, U.S.A.). Los tejidos uterinos se dejaron estabilizar durante 1 ó 2 h hasta que las contracciones espontáneas generadas a partir de la tensión consiguieran un

equilibrio; durante el periodo de estabilización la solución Ringer de las cámaras fue cambiada cada 15 ó 20 min (Ogers et al., 2004). Los tejidos con poca actividad contráctil espontánea fueron descartados con la suposición de que representaba tejido cicatricial o no era viable para el experimento.

Las contracciones miométriales (actividad integral) se midieron por el área bajo la curva (AUC) definidas por el registro gráfico isométrico en un período de 30 min después de la estabilización de las contracciones espontáneas del miometrio (Figura 1). El efecto inhibitorio de los análogos 4AFDPM_e, 4NO₂FDPM_e, TFFDPM_e, FDPMe, 8-Br-AMPc y el rolipram sobre las contracciones uterinas espontáneas fueron expresadas como: % de inhibición = 100%-(AUC_r/AUC_i) x 100, en donde, AUC_r es el restante de AUC después de la exposición del fármaco en el tejido uterino y AUC_i es la AUC de la actividad integral previa a cualquier exposición de los compuestos; un periodo de 30 min antes y después de la exposición de los compuestos se consideró suficiente para obtener una acción biológica representativa y estable. Las curvas de concentración-respuesta no acumulativas fueron generadas para los cuatro análogos, para el 8-Br-AMPc y el rolipram (estos dos últimos sirvieron para comprar el efecto de los análogos) con el siguiente rango de concentraciones: 32, 56, 100, 180, 320 y 560 μM.

6.3.2 Efecto inhibitorio sobre contracciones tónicas sostenidas

En este modelo se ensayó el efecto inhibitorio de los dos análogos, cuyas respuestas resultaron ser las más efectivas en el experimento anterior. Para evaluar el efecto inhibitorio de la contracción de 4AFDPM_e, 4NO₂FDPM_e y el rolipram, se utilizó un modelo en el que se indujo una contracción tónica sostenida mediante una solución alta en potasio. Las tiras de miometrio fueron contracturadas con una solución despolarizante de KCl (40 mM), preparada mediante una sustitución equimolar de NaCl por KCl. Los tejidos que presentaron dos respuestas consecutivas similares en la respuesta contráctil capturada en el sistema de registro isométrico que ya se mencionó anteriormente, fueron los que se incluyeron en este estudio.

Los compuestos a ensayar se añadieron sobre la contracción tónica sostenida 30 min después de que se produjo el estímulo (fase meseta) y el efecto de cada una de las concentraciones de los compuestos también se mantuvo durante 30 min. La viabilidad de los tejidos se verificó mediante la adición de solución despolarizante en las tiras de miometrio al finalizar cada experimento, que mostró contracciones de amplitud similares a los del inicio del ensayo. Los datos se expresaron con el porcentaje de la respuesta tónica máxima inducida por KCl 40 mM (100%). Para establecer que el efecto relajante no fue originado por la variabilidad biológica de los tejidos, la prueba se repitió para cada concentración por lo menos seis veces para obtener el error estándar (SEM); además, un tejido control se mantuvo en cada experimento, el cual no mostró ninguna variación en respuesta a las contracciones tónicas inducidas por KCl.

Los datos del efecto de los análogos y el rolipram tanto en las contracciones espontáneas como en las tónicas inducidas se sometieron a un análisis de la curva concentración-respuesta mediante el uso de un software Sigma Plot versión 10 (Systat Software Inc., USA) para obtener los valores de concentración inhibitoria-50 (CI_{50}), que es la concentración del fármaco que produce el 50% del efecto inhibitor máximo y la R_{max} , que es la respuesta inhibitoria máxima que puede ser producida por la mayor concentración del compuesto ensayado.

6.3 Bloqueo de canales de calcio

Para determinar si uno de los mecanismos de acción de los análogos de talidomida es mediante el bloqueo de canales de calcio y con el fin de evaluar esta posible vía de acción solo se observó el efecto de dos análogos de talidomida 4AFDPM e y 4NO₂FDPM e que, como se mencionó anteriormente, fueron los dos compuestos que tuvieron una respuesta más eficiente y el rolipram. En este experimento se utilizaron nuevamente fragmentos de tejidos miometriales aislados de mujeres embarazadas y se colocaron en una solución Ringer despolarizante estándar para obtener una contracción completa provocada con KCl 40 mM, la cual fue considerada como el 100% de amplitud. Posteriormente la solución fue cambiada por una solución Ringer despolarizante modificada libre de calcio con quelante

de calcio EGTA al 0.1 mM mantenido por 40 min; después de ese tiempo se añadieron diferentes soluciones de CaCl_2 de manera acumulativa de 0.5 a 5 mM con el objeto de construir una curva de respuesta contráctil inducida por Ca^{2+} , la cual se usó como control. La respuesta contráctil fue expresada como el porcentaje que se produjo con respecto a la contracción miometrial completa. Experimentos similares se repitieron en presencia de la CI_{50} de los dos análogos de talidomida y del rolipram sobre las contracciones tónicas durante un periodo de 20 min previos a la adicción del CaCl_2 para determinar el efecto de bloqueo en la entrada de calcio, y por último se hizo la comparación con la curva control (Granger et al., 1986).

6.4 Cuantificación de AMPc en células HeLa

Para la cuantificación del AMPc se emplearon células HeLa que provienen de una línea celular de cáncer cérvico-uterino. Las células fueron cultivadas rutinariamente en DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal y 0.01 % (m/v) de penicilina/estreptomicina en una atmósfera de 5 % enriquecida con CO_2 humidificado a 37 °C. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (300,000 células por pozo aproximadamente) y se incubaron a 37 °C en 250 μL de solución Ringer-Krebs-HEPES (KRH) compuesta por (mM): NaCl 113, NaHCO_3 25, KCl 3, MgCl_2 1, KH_2PO_4 1, CaCl_2 1.8, D-glucosa 11, HEPES 20; pH 7.4 con NaOH; en algunos pozos se agregó IBMX 1 mM, el cual solo fue utilizado como un control positivo para producir AMPc. Después de 15 min, a cada uno de los pozos se les agregó un volumen de 10 μL de forskolina y se continuó con la incubación por otros 15 min. La concentración final de forskolina fue de 3 μL para el ensayo con diferentes concentraciones de 4AFDPM e y 4NO₂FDPM e (10, 30, 100, 300 y 1000 μM) respectivamente. Los análogos de talidomida fueron agregados 30 min antes de la forskolina. El periodo de incubación óptimo que se seleccionó para llegar a la más alta concentración de AMPc inducida por los análogos de talidomida, fue de 30 min. Después de este tiempo de incubación se detuvo la reacción con 25 μL de HCl (1M) en hielo frío. Después, para neutralizar la reacción se agregaron 25 μL de NaOH (1 M) y 100 μL de solución Tris-HCl (1 M) para mantener el pH en 7.4.

El AMPc endógeno se determinó mediante un ensayo de competición para los que se tomaron 50 μ L de las muestras que fueron incubadas y a cada muestra se le agregó 125 μ L de un amortiguador de incubación con la siguiente composición (mM): Tris-HCl 50, NaCl 100, EDTA 5, BSA 5 mg/mL, pH 7.4 a 4 °C; esta solución también contenía la subunidad reguladora PKA (0.5 UI por muestra) y [3 H]-AMPc (10 nM). Las muestras se incubaron por 2.5 h a 4 °C, posterior a este tiempo las muestras fueron filtradas sobre papel Whatman GF/B previamente remojados en polietilenimina al 0.3 %, seguido de tres lavados subsecuentes con agua fría desionizada 1 mL (4°C). La radioactividad retenida se determinó por un líquido de centelleo y la cantidad de AMPc endógeno presente en cada muestra se calculó utilizando una curva estándar de AMPc. Los datos del efecto de los análogos de la talidomida en la acumulación del AMPc en células HeLa se sometieron a un análisis de la curva concentración-respuesta que se realizó mediante el uso del software Prism versión 5 (GraphPad Inc., EUA) para obtener los valores de concentración efectiva 50 (CI₅₀), concentración de fármaco que produce el 50 % del efecto entre la línea base y la respuesta máxima.

6.5 Inmunocitoquímica

Se utilizaron células miometriales uterinas humanas normales (UtSMC) que fueron adquiridas de Clonetics (San Diego, CA) y crecieron en un medio que contenían suplementos y suero fetal bovino del Kit Bullet SmGM-2 (Cambrex, Walkersville, MD). Las UtSMC fueron tripsinizadas y sembradas en cubreobjetos de vidrio dos días antes de su uso para lograr una confluencia del 80 % en el tiempo de la experimentación. Las células fueron mantenidas en una incubadora humidificada a 37 °C con 95 % aire y 5 % dióxido de oxígeno. Las UtSMCs colocadas en cubreobjetos fueron tratadas con 1mM de 4NO2FDPM e y 1mM de 4AFDPM e durante 30 min; es importante mencionar que de las células tratadas unas fueron expuestas a OT (5 mUI/pozo) y otras no para poder observar y comparar el grado de fosforilación de la cadena ligera de miosina inducido por la OT en presencia o no de los compuestos. Después del tratamiento con los análogos, las células fueron lavadas tres veces con una amortiguador salino de fosfato (PBS) que contenía 0.2 % de Triton X-100 por 2 min. Después, las células fueron bloqueadas durante 20 min con

gelatina al 1 % (m/v) y suero fetal de bovino (FBS) al 1.5 % en PBS e incubados toda la noche a 4 °C con p-MYL9 (Thr 18/Ser 19) (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente las células fueron lavadas con PBS e incubadas por 1 h a 4 °C con fluoresceína conjugado de burro IgG anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology). Las preparaciones de las células fueron lavadas nuevamente con PBS y se montaron en un portaobjetos con VectaShield (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA) y fueron visualizados en un microscopio de barrido láser con focal (TCP-SP5, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), utilizando un Plan Neo Fluor 63x (NA=1.4) con el objetivo de inmersión en aceite.

6.6 Análisis estadístico

Se construyeron las curvas concentración respuesta, para determinar los parámetros de concentración inhibitoria cincuenta (IC_{50}) y la respuesta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) para cada análogo de la talidomida que fue ensayado y el rolipram. Los datos obtenidos fueron expresados como medias \pm SEM en las determinaciones para cada concentración (N= 6). La prueba estadística que se aplicó para determinar las diferencias entre los compuestos en la IC_{50} (potencia) y $R_{m\acute{a}x}$ (eficacia) se determinaron mediante un análisis estadístico de varianza ANOVA de una vía, para la comparación múltiple pareada total seguido de una prueba post hoc de Bonferroni utilizando una versión de software Sigma Stat 3.1. (Systat Software Inc., EE.UU.). En todos los casos se consideró una diferencia significativa cuando $P < 0.05$.

VII. RESULTADOS

7.1 Resultados del efecto inhibitorio sobre contracciones espontáneas

En esta determinación se observó el efecto de los cuatro análogos de talidomida (FDPMe, 4AFDPMe, 4NO₂FDPMe, TFFDPMe), el rolipram y 8-Br-AMPC, de los cuales se obtuvieron los trazos típicos de las contracciones espontáneas y el efecto inhibitorio de las contracciones de cada uno de los compuestos ensayados en esta parte experimental, como se muestra en la figura 10. Se observó que el efecto es dependiente de la concentración, ya que al aumentar la concentración de los compuestos la relajación del tejido uterino igual aumentó.

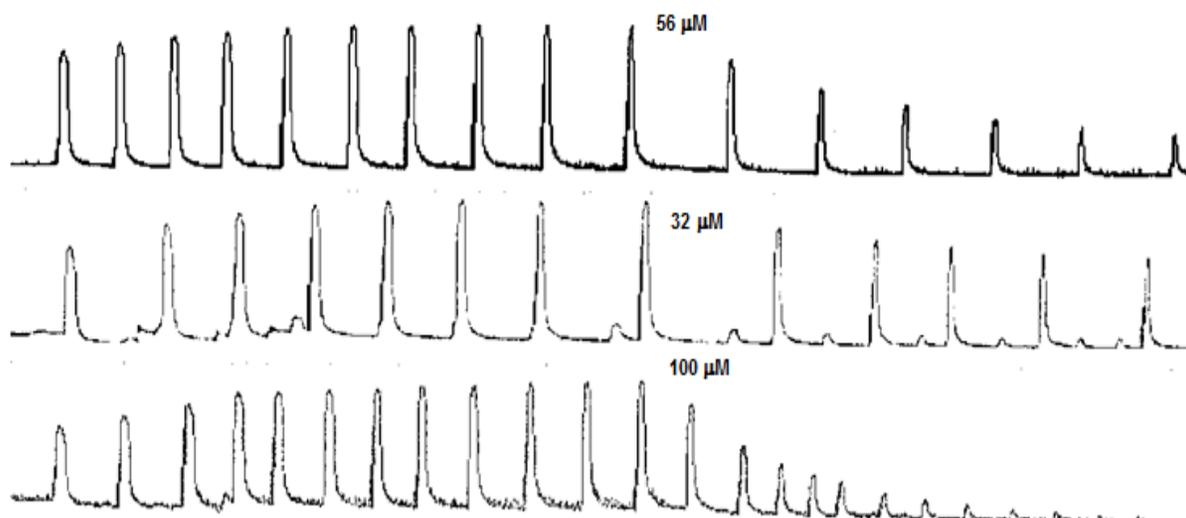


Figura 10. Trazos típicos que representan las contracciones espontáneas del útero humano embarazado y la representación del efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas inducidas por los compuestos ensayados.

En la figura 11 se presenta la primera curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio sobre las contracciones espontáneas de dos de los análogos de talidomida (4AFDPMe y 4NO₂FDPMe) y el rolipram. El resultado obtenido fue que el rolipram presentó un efecto y una potencia mayor sobre la inhibición de las contracciones del tejido uterino en comparación con los dos análogos de talidomida; en segundo lugar de efectividad y

potencia se encontró el análogo 4AFDPM_e, el cual, a pesar de mostrar una diferencia en cuanto a la potencia con el rolipram, resultó ser equiefectivo con éste, así el análogo 4NO₂FDPM_e fue el compuesto con menor potencia y eficacia, ya que al compararlos se observa una diferencia significativa del efecto y la potencia, sin embargo, este análogo mostró inducir la relajación del tejido miometrial.

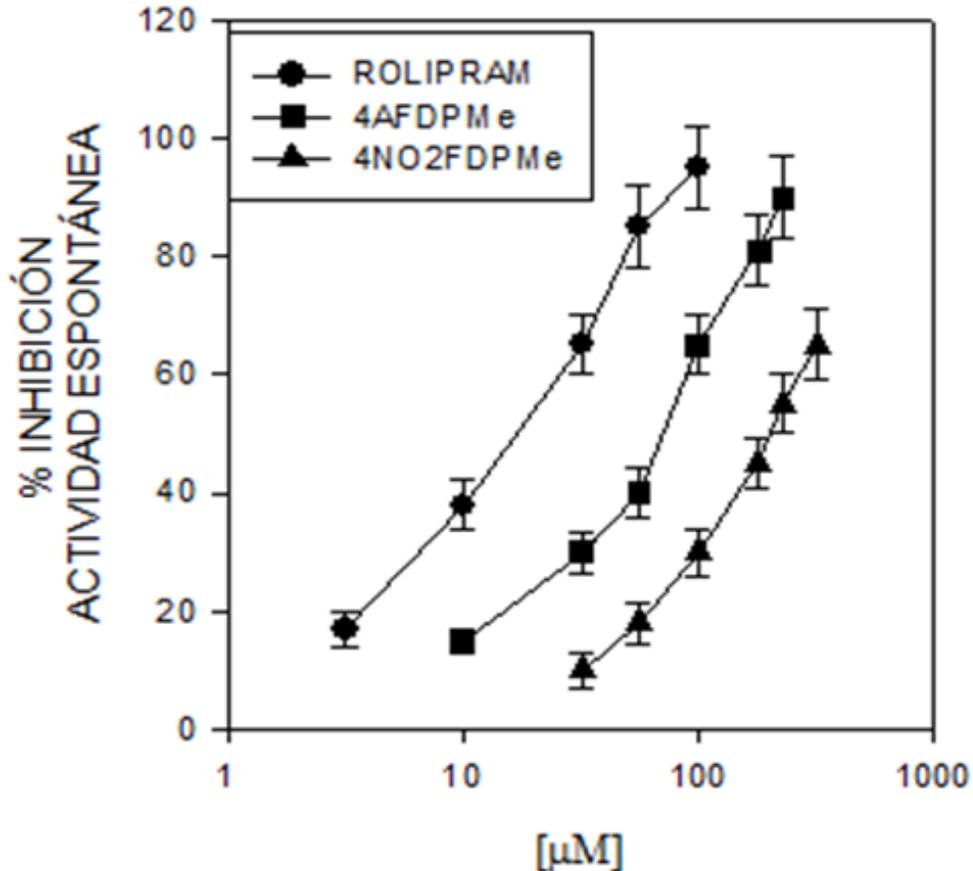


Figura 11. Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas inducido por rolipram, 4NO₂FDPM_e y 4AFDPM_e, en útero humano embarazado.

En la figura 12, se muestra la curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de los otros dos análogos de talidomida TFFDPM_e, FDPM_e y el 8-Br-AMPc sobre las contracciones espontáneas, en donde, el análogo TFFDPM_e resultó ser el compuesto con mayor efectividad y potencia, seguido del análogo del AMPc y en último lugar el FDPM_e. En una comparación entre el TFFDPM_e y el 8-Br-AMPc, a pesar de que se observa una

diferencia en cuanto a la potencia de estos dos compuestos, ambos alcanzan el efecto deseado de relajación miometrial, cuyos valores resultaron ser equiefectivos; en cuanto a la respuesta del FDPMe y el 8-Br-AMPc ambos compuestos evidenciaron ser equipotentes pero no fueron equiefectivos, ya que el FDPMe a pesar de ser también un agente inductor de la relajación del tejido uterino miometrial, no alcanzó el efecto producido por el TFFDPMc y el 8-Br-AMPc.

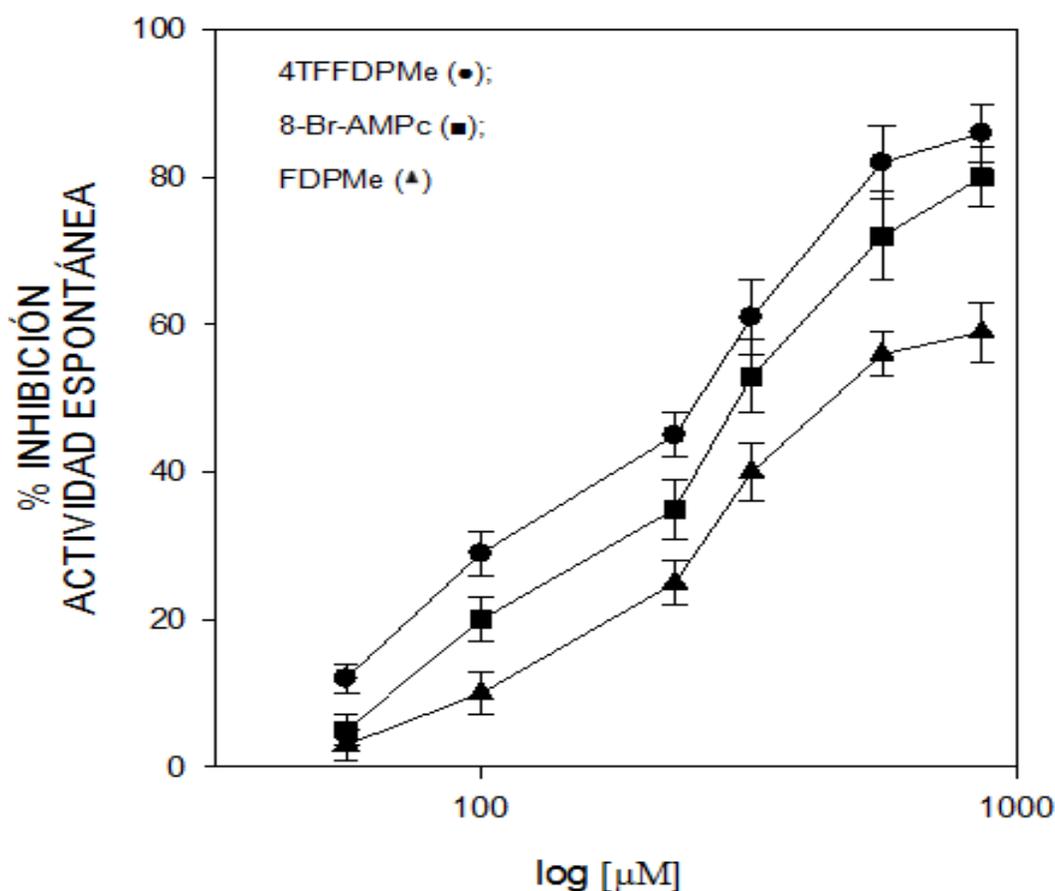


Figura 12. Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas inducido por TFFDPMc, 8-Br-AMPc y FDPMe.

Posterior a la obtención de las curvas de concentración-respuesta para todos los compuestos ensayados, se calculó la concentración inhibitoria cincuenta (CI_{50}) y la respuesta máxima (R_{max}) que se muestran en la Tabla 3. Estos datos exhibieron una diferencia significativa entre el rolipram que requirió de una concentración menor ($22.74 \pm 2.32 \mu\text{M}$) para alcanzar

el 50% de la inhibición de la actividad contráctil espontánea de los tejidos en comparación con los todos los análogos de la talidomida y el análogo del AMPc, lo que colocó al rolipram como el compuesto más potente, seguido del análogo 4AFDPMc (62.17 ± 5.61^a μ M), cuya concentración mostró una diferencia marcada con la concentración del rolipram.

Por otro lado, al analizar los porcentajes de la respuesta máxima, los resultados fueron satisfactorios debido a que la mayoría de compuestos alcanzaron la efectividad deseada para inducir la relajación y no mostraron una diferencia significativa contra el rolipram, a excepción del FDPMe que sí presentó una diferencia significativa, así éste fue el análogo menos potente y efectivo para inhibir las contracciones uterinas.

N = 6	CONTRACCIONES ESPONTÁNEAS	
COMPUESTOS	CI ₅₀ (μ M)	R _{máx} (%)
Rolipram	22.74 \pm 2.32	94.13 \pm 7.53
4AFDPMc	62.17 \pm 5.61 ^a	88.16 \pm 7.93
4NO₂FDPMe	128.30 \pm 14.56 ^a	67.99 \pm 8.15
FDPMe	254.98 \pm 33.02 ^a	58.36 \pm 5.60^a
TFFDPMc	190.90 \pm 24.70 ^a	80.01 \pm 8.80
8-Br-AMPc	259.50 \pm 28.49 ^a	74.11 \pm 6.66

Tabla 3. Valores de la concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀) y de la respuesta máxima (R_{máx}) de los cuatro análogos, rolipram y 8-Br-AMPc.

a= Diferencia significativa vs Rolipram, Student-Newman-Keuls, P < 0.05.

7.2 Resultados del efecto inhibitorio sobre contracciones tónicas sostenidas

Otro de los experimentos realizados para evidenciar la funcionalidad de los análogos como agentes relajantes miometriales, fue mediante una prueba en la que solo se ensayaron los dos análogos de talidomida que mostraron tener los mejores resultados en la prueba anterior y el rolipram como control sobre contracciones tónicas sostenidas inducidas por una solución despolarizante. Se obtuvieron los trazos típicos como se muestra en la figura 13, en donde, una vez equilibrado el tejido, se provocó la contracción tónica sostenida sobre la cual se ensayaron los tres compuestos; el efecto también resultó ser dependiente de la concentración porque al incrementar la concentración de los compuestos, la relajación del tejido uterino igual aumentó.

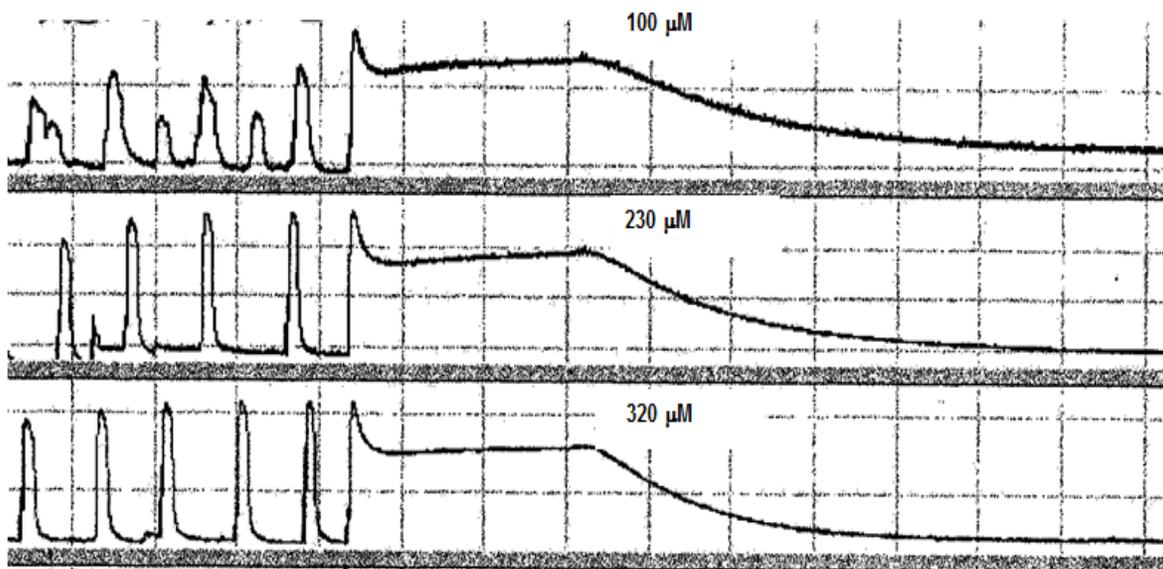


Figura 13. Trazos típicos del modelo experimental utilizado para ensayar el efecto inhibitorio de los compuestos estudiados sobre la contracción tónica sostenida del útero humano embarazado inducida por una solución despolarizante de K^+ 40 mM con Ca^{2+} .

En la construcción de la curva de concentración-respuesta que se muestra en la figura 14, se observó que el rolipram nuevamente tuvo la mejor respuesta para inhibir las contracciones tónicas sostenidas del tejido miometrial, seguido del análogo 4AFPDMe que exhibió un

patrón similar al rolipram, por lo que fueron considerados equipotentes y equiefectivos, mientras que el análogo 4NO₂FDPMe resultó ser el compuesto con la menor respuesta tanto en potencia como en efectividad de inhibición de la contracción con una curva un poco más alejada hacia la derecha en comparación con el rolipram y el 4AFDPMé; a pesar de haber tenido el menor efecto, el compuesto nitro mostró que es un agente causante de la relajación del tejido miometrial sobre las contracciones tónicas sostenidas.

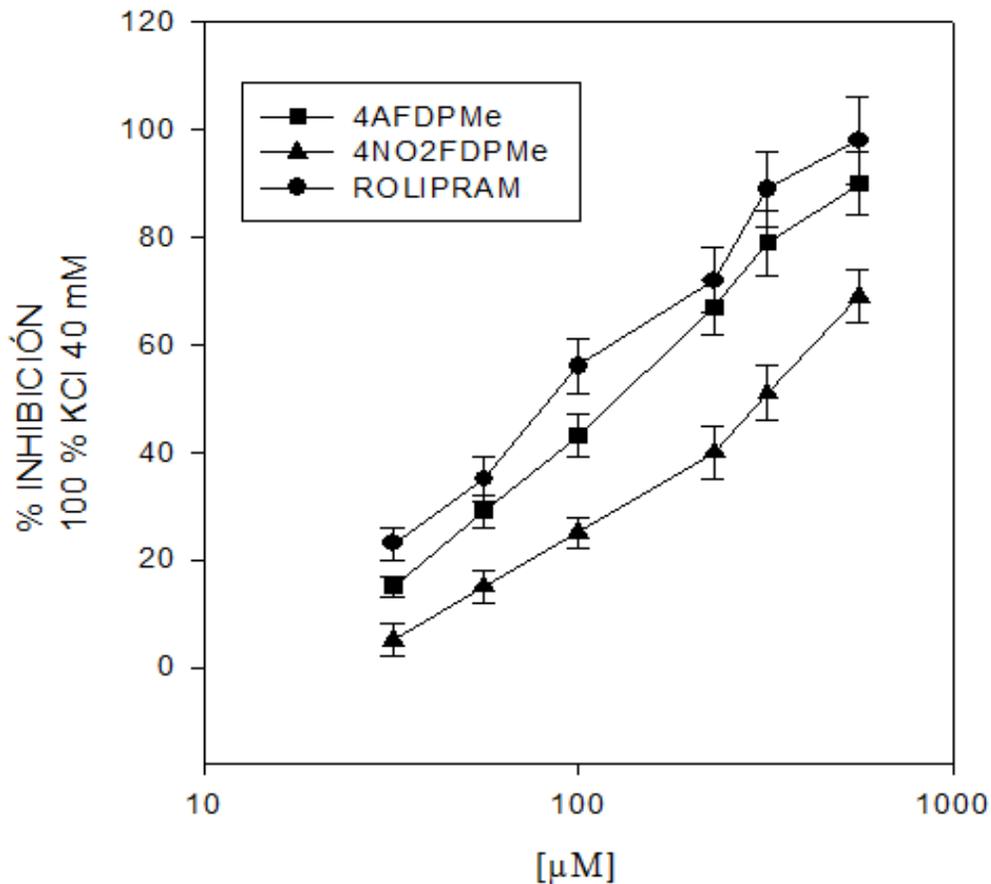


Figura 14. Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de rolipram, 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé sobre la contracción tónica sostenida inducida por la solución despolarizante de K⁺ 40 mM con Ca²⁺

En la tabla 4, se obtuvo la CI₅₀ y la R_{máx} para los tres compuestos ensayados. Todos los compuestos resultaron ser inductores de la relajación miometrial sobre las contracciones tónicas sostenidas. Sin embargo, al realizar una comparación entre cada uno de estos compuestos se pudo determinar que el 4NO₂FDPMé, presentó una diferencia significativa

en comparación con el rolipram y el análogo 4AFDPMe para inhibir el 50 % de la actividad contráctil tónica sostenida del tejido uterino, cuyas concentraciones fueron casi el doble de las requeridas por los otros dos compuestos, mientras que entre el rolipram y el 4AFDPMe no presentaron diferencia significativa entre ellos. En cuanto a la $R_{m\acute{a}x}$ no hubo diferencias significativas para ninguno de los compuestos utilizados en esta parte experimental, evidenciando que los análogos 4AFDPMe y 4NO2FDPMMe son agentes efectivos de la relajación en tejidos de útero humano embarazado.

N = 6	CONTRACCIONES TÓNICAS INDUCIDAS POR KCl 40 mM		
	COMPUESTOS	CI ₅₀ (μM)	R _{máx} (%)
	ROLIPRAM	98.45 ± 8.86	97.10 ± 8.73
	4AFDPMe	125 ± 13.72	88.65 ± 7.09
	4NO2FDPMMe	203.45 ± 18.31 a, b	70.61 ± 6.78

Tabla 4. Valores de la concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀) y la respuesta máxima (R_{máx}).

a= Diferencia significativa vs. Rolipram, Student-Newman-Keuls, P < 0.05.

b= Diferencia significativa vs. 4AFDPMe, Student-Newman-Keuls, P < 0.05.

Por último, en la parte funcional se realizó una comparación con las CI₅₀ del rolipram, 4AFDPMe y 4NO2FDPMMe, que se obtuvieron en los modelos de contracciones tónicas sostenidas y las contracciones espontáneas, y se pudo observar que las fásicas resultan más sensibles que las contracciones inducidas por la solución despolarizante de K⁺ 40 mM, ya que las concentraciones utilizadas para obtener el 50 % del efecto de relajación fueron aproximadamente tres veces menores para las contracciones espontáneas que las requeridas para las contracciones tónicas como se muestra en la tabla 5, lo que marcó una diferencia significativa, y resulta interesante, ya que esta diferencia podría deberse a diferentes mecanismos de relajación involucrados en ambos tipos de contracciones.

N = 6	CONTRACCIONES ESPONTÁNEAS	CONTRACCIONES TÓNICAS SOSTENIDAS
COMPUESTOS	CI ₅₀ (μM)	CI ₅₀ (μM)
Rolipram	22.74 ± 2.32	98.45 ± 8.86
4AFDPMe	62.17 ± 5.61 ^a	125 ± 13.72
4NO2FDPMe	128.30 ± 14.56 ^a	203.45 ± 18.31 a, b

Tabla 5. Valores de la CI₅₀ de las contracciones espontáneas vs. las tónicas sostenidas.

a= Diferencia significativa vs. Rolipram, Student-Newman-Keuls, P < 0.05.

b= Diferencia significativa vs. 4AFDPMe, Student-Newman-Keuls, P < 0.05.

7.3 Resultados del experimento como bloqueadores de canales de calcio

Para determinar si uno de los mecanismos de acción posible de los análogos es mediante el bloqueo de canales de calcio, se evaluó el efecto de dos análogos de talidomida (4AFDPMe y 4NO2FDPMe) y el rolipram. Los trazos obtenidos (Figura 15) en este experimento muestran la funcionalidad del tejido al ser reproducibles las contracciones tónicas sostenidas mediante una solución Ringer despolarizante y la interrupción de la actividad contráctil al colocar una solución Ringer despolarizante sin calcio. El bloqueo de los canales de calcio se observó mediante la adición de CaCl₂ de manera acumulativa en presencia de los tres compuestos evaluados y se utilizó un control el cual no contenía ningún compuesto, esto para observar y comparar la respuesta del tejido al adicionar el CaCl₂. Para el análisis y la comparación del efecto producido por cada uno de los compuestos y el control se realizó una curva de la respuesta contráctil inducida por el CaCl₂ mostrada en la figura 16. Se determinó que uno de los mecanismos de acción de los análogos de talidomida para promover la relajación del tejido uterino es mediante el bloqueo de los canales de calcio, debido a que la curva control exhibió claramente un incremento en la contracción miometrial al aumentar la concentración del CaCl₂ hasta alcanzar la amplitud de la contracción tónica sostenida máxima que se utilizó como el 100 % de la actividad contráctil del tejido; en cambio, los tejidos que fueron incubados con las CI₅₀ obtenidas en el estudio de contracción tónica sostenida, los dos análogos y el rolipram presentaron una actividad contráctil menor al adicionar el CaCl₂, además, de que no

lograron alcanzar la amplitud de la contracción tónica sostenida con las mismas concentraciones de Ca^{2+} del control.

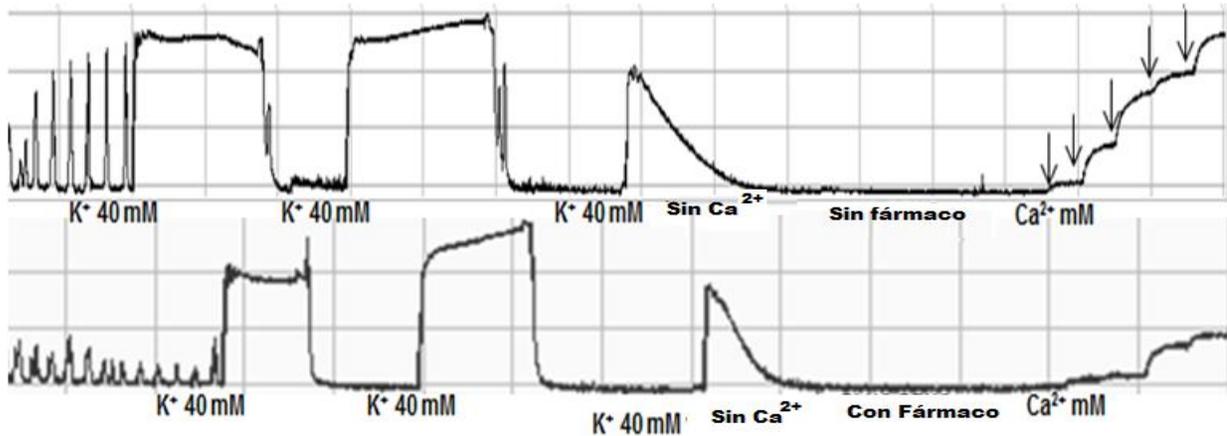


Figura 15. Trazos típicos del modelo experimental utilizado para ensayar el bloqueo de canales de calcio de los compuestos estudiados mediante una curva acumulativa de Ca^{2+} con una solución despolarizante elevada de K^+ sin calcio.

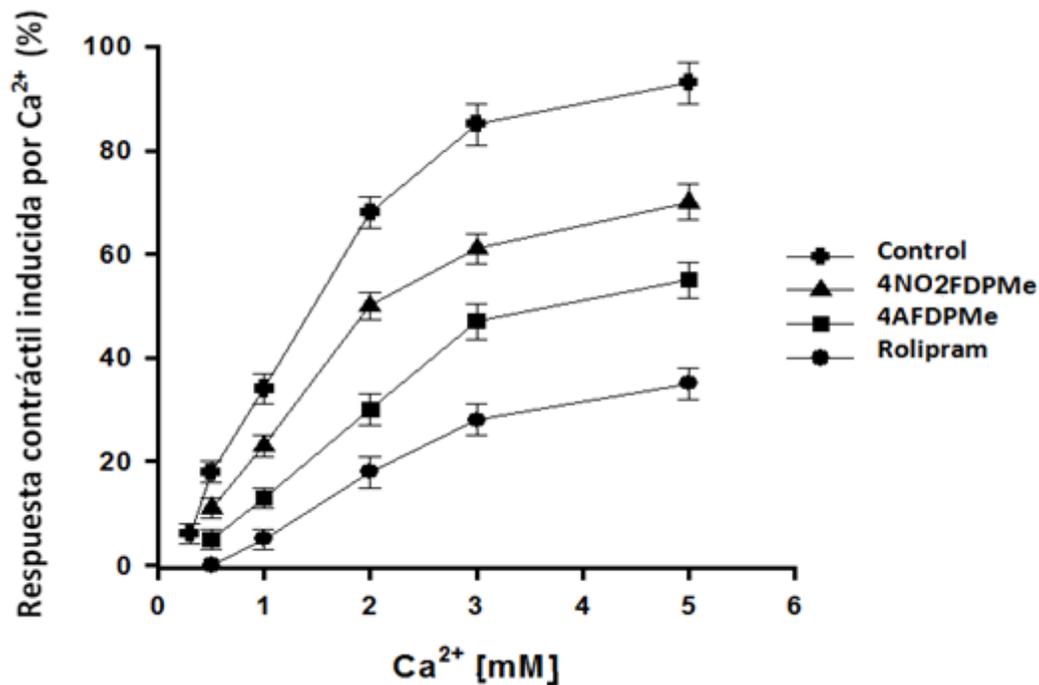


Figura 16. Curva de la respuesta contráctil inducida por el CaCl_2 para evaluar el efecto del bloqueo de canales de calcio de rolipram, 4AFDPM y 4NO2FDPM mediante una curva acumulativa de Ca^{2+} con una solución despolarizante elevada de K^+ sin calcio.

En una comparación entre los dos análogos de talidomida, el compuesto 4AFDPMe tuvo un mejor efecto para evitar la entrada de calcio, cuyo porcentaje con respecto a la respuesta contráctil máxima fue de aproximadamente el 50 %, mientras que el 4NO₂FDPMo obtuvo los valores más cercanos al 100 % de la amplitud del control, por lo que se determinó que fue el compuesto con el menor efecto para evitar la entrada de calcio a las células miometriales. Por último, el fármaco más efectivo para bloquear los canales de calcio fue el rolipram, que como se puede observar, su respuesta de contracción no sobrepasó el 40%, evidenciando que tanto los análogos como el rolipram también inducen la relajación al disminuir la entrada de calcio al medio intracelular.

7.4 Resultados de la cuantificación de AMPc en células HeLa

Estudios recientes han comprobado que la actividad del AMPc y las enzimas PDE-4 juegan un papel importante durante el embarazo con respecto a la actividad uterina (contracción-relajación), cuyo mecanismo de relajación y el estado de quiescencia durante el embarazo se encuentra relacionado con la elevación del AMPc. Para corroborar el mecanismo de acción de los análogos de talidomida para inducir la relajación del tejido uterino de mujeres embarazadas mediante la inhibición de las enzimas PDE-4 reportada en la literatura, se llevó a cabo una cuantificación de AMPc en células HeLa. En esta prueba se evaluaron los dos análogos de talidomida, el 4AFDPMe y 4NO₂FDPMo. Los resultados nuevamente obtenidos en esta parte experimental manifiestan que las células en presencia de los análogos de talidomida incrementan sus niveles de AMPc de forma dependiente de la concentración, como se muestra en la figura 17; en donde, se puede observar que con las tres primeras concentraciones (10, 30 y 100 μ M) solo hubo un ligera elevación de este segundo mensajero, por lo que no se presentó una diferencia significativa con respecto al control (0 μ M), pero al incrementar la concentración (300 y 1000 μ M) de ambos análogos el incremento de los niveles del AMPc fue más evidente y significativo, lo que confirmó que el mecanismo de acción de este grupo de análogos es mediante la inhibición específica de la enzima PDE-4, al no hidrolizar e inactivar específicamente al AMPc.

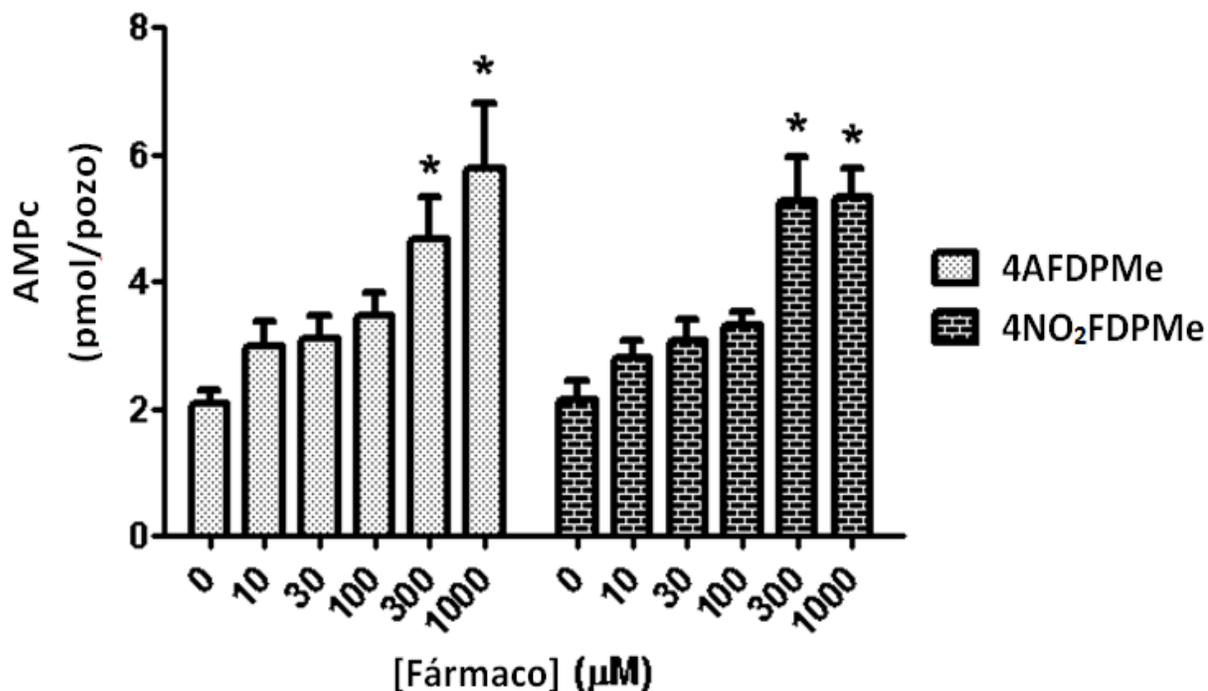


Figura 17. Niveles de AMPc en células HeLa estimuladas con concentraciones crecientes de los análogos de talidomida.

* = Diferente vs. control (0 mM del análogo), $P < 0.05$, Student-Newman-Keuls.

Para determinar la CE_{50} y obtener una comparación más detallada entre estos dos análogos se construyó una curva sigmoide con el logaritmo de la concentración vs. Respuesta; aunque en la figura 18 no se logra apreciar una diferencia significativa entre ambos compuestos en el incremento de los niveles del AMPc, al obtener la CE_{50} se cuantificó que el análogo 4NO₂FDPMe resultó ser el compuesto más potente para inhibir a la enzima PDE-4 con una concentración de 181.7 μM , marcando una diferencia significativa con el análogo 4AFDPMe, que opuestamente a las pruebas anteriores, en este experimento resultó ser el compuesto que requirió de una concentración mayor (448.6 μM) para poder alcanzar el 50 % de la respuesta máxima en cuanto a la elevación de los niveles intracelulares del AMPc; cabe mencionar que la inhibición de la PDE-4 es de forma indirecta al cuantificar la acumulación de su sustrato.

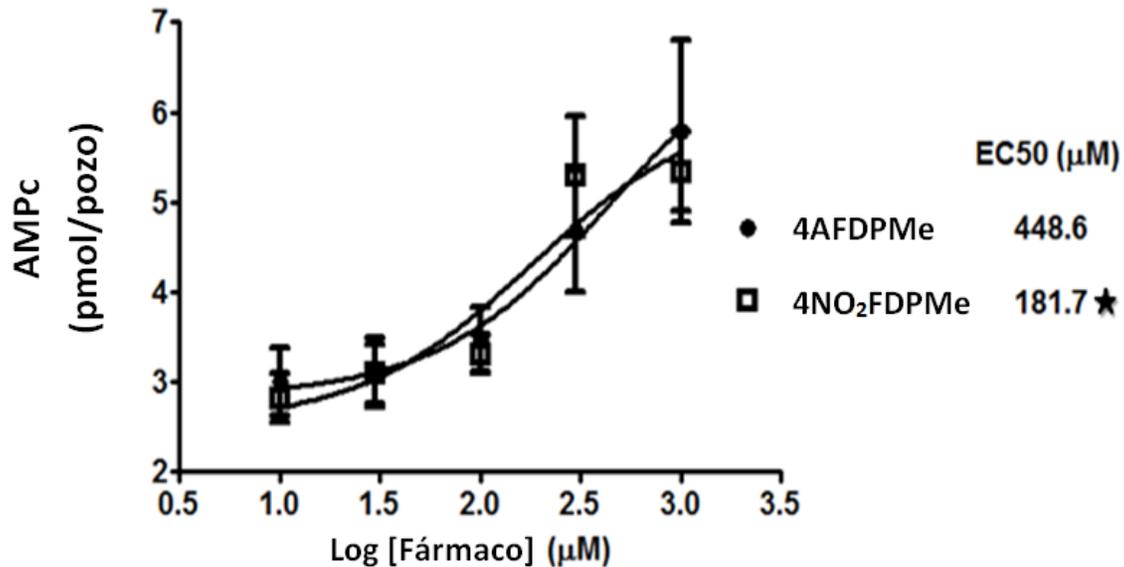


Figura 18. Curva sigmoide log [concentración]-respuesta [AMPC] en células HeLa de dos análogos de talidomida. * = Diferentes, $P < 0.05$, t-Student.

7.5 Inmunocitoquímica

La familia PDE-4 que se encarga de hidrolizar específicamente al AMPc, incluye múltiples isoformas codificadas por cuatro genes (PDE-4A-D), pero la isoforma que se sobreexpresa al término del embarazo es PDE-4B2, la cual se encuentra involucrada en la regulación de la respuesta inflamatoria y la inducción de las contracciones (Meháts et al., 2004; Meháts et al., 2007); por lo tanto, el uso de inhibidores de PDE-4 permiten el incremento de los niveles de AMPc, lo que puede provocar una reducción en la cantidad de la pMLC, que en consecuencia provoca la relajación, ya que se disminuye la afinidad de la MLCK por su sustrato, como se ha comentado anteriormente. Por esta razón, se evaluó la presencia de PDE-4B2 y pMLC en un cultivo de UtSMC antes de evaluar los efectos de ambos análogos, solos o en presencia de OT, en las proteínas del miometrio mediante una prueba de inmunocitoquímica. En la Figura 19, se observa la expresión perinuclear y citosólica en reposo de PDE-4B2 y de la pMLC, los cuales no fueron estimulados por algún fármaco o inductor endógeno, tales como la OT; cabe mencionar que, la expresión de esas proteínas no fue influenciada por el embarazo como el caso de los ensayos funcionales realizados en el presente trabajo.

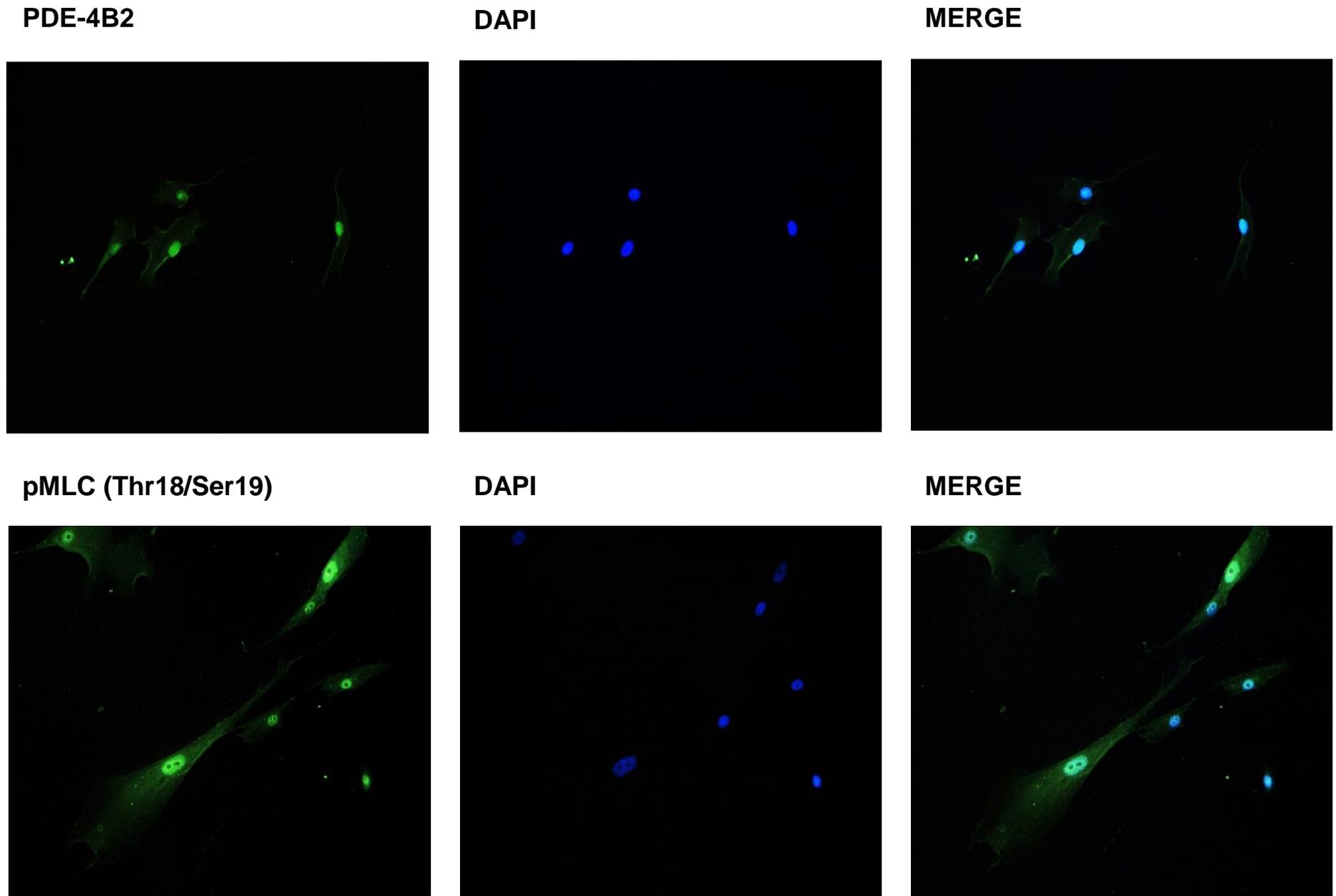


Figura 19. Prueba de inmunocitoquímica en la que se exhibe la presencia de la PDE-4 subtipo-B2 (PDE-4B2) y la fosforilación de la MCL en 55 células UtSMC. En donde, DAPI se refiere a la tinción de los núcleos y MERGE a la sobreposición de PDE-4B2 o la pMCL y DAPI.

En el segundo ensayo que se muestra en la figura 20 se evidenció la consecuente de adicionar OT a las UtSMC, lo que provocó un pequeño aumento en el grado de pMLC tanto nuclear como citoplásmica, en comparación con las células control (sin OT), aunque tal aumento fue más citoplasmático que perinuclear; por otro lado, los ensayos realizados en presencia del 4NO2FDPMo solo causó un cambio en la localización de la pMLC disminuyendo su presencia nuclear habitual intensa, como se vio anteriormente, pero aumentando en el citoplasma; sin embargo, el estímulo concomitante de la OT revirtió ese efecto porque pMLC permaneció más intensa en el núcleo pero sin un aumento significativo en su conjunto de ambos compartimentos subcelulares. Finalmente en la incubación con 4AFDPMo se mostró inicialmente un efecto muy similar en el nivel pMLC citoplásmica a la causada por el análogo anterior, ya que débilmente promovió un incremento mayor; sin embargo, la adición de OT no causó ninguna reversión de la localización de pMLC, es más, su grado de fosforilación y su localización parecían ser casi inalteradas.

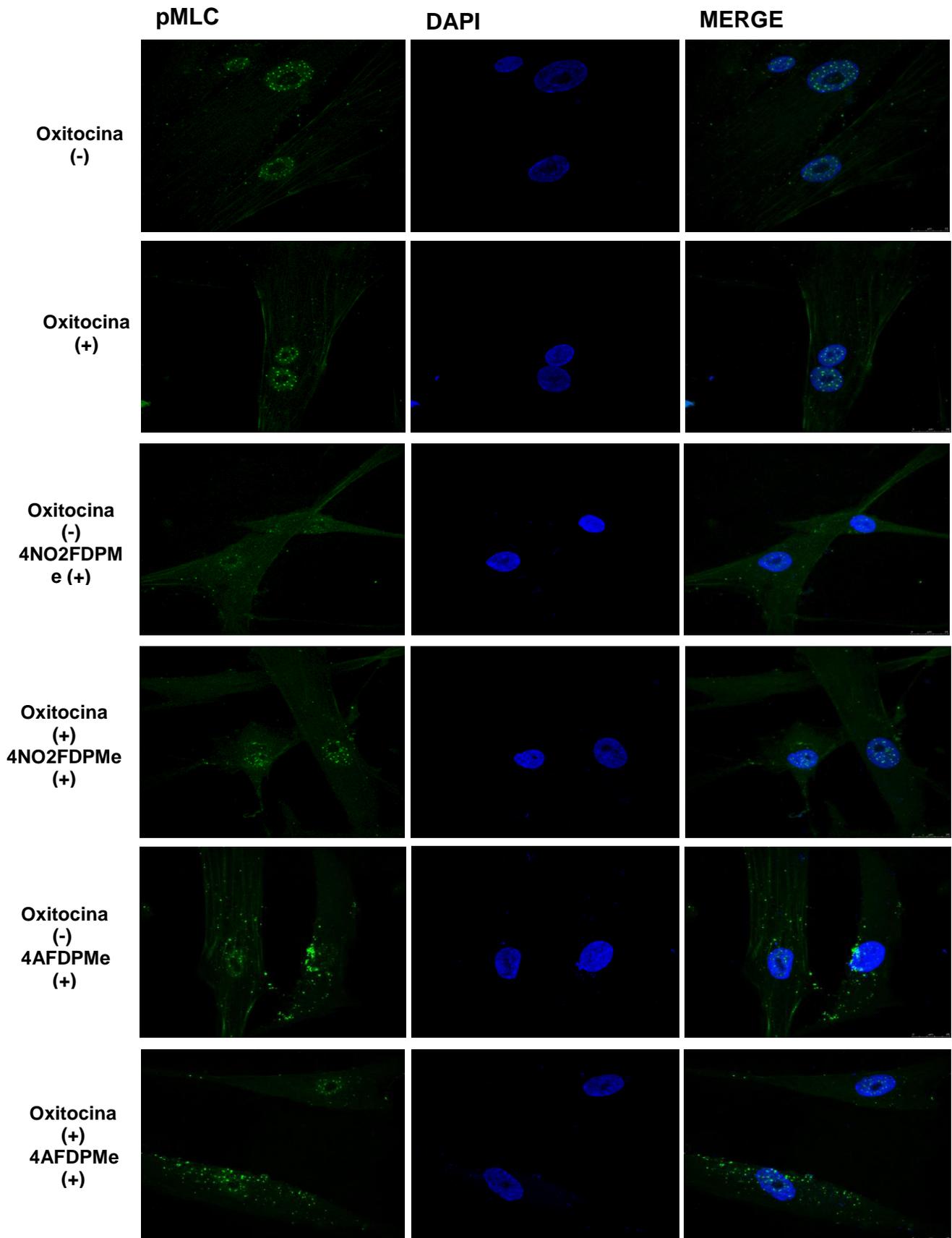


Figura 20. Panel de inmunocitoquímica en la que se presentan los grados de fosforilación de la MLC en células UtSMC en presencia o ausencia de OT, y en presencia o no de dos análogos 4AFDPM e y 4NO2FDPM e. En donde, pMCL se refiere a la fosforilación de la cadena ligera de miosina, DAPI, a la tinción de los núcleos y MERGE a la sobreposición de pMCL y DAPI.

VIII. DISCUSIÓN

El parto prematuro, como ya se mencionó, es una ruptura o desajuste en el mecanismo responsable del mantenimiento de la quiescencia uterina, cuya fisiología es compleja y, hasta la fecha, aún no se ha entendido por completo debido a que las causas que lo inducen pueden ser variadas y multifactoriales (Norwitz y Robinson, 2001; Peltier, 2003; Vause y Johnston, 2000). Por esta razón, el parto prematuro se ha considerado una patología complicada que requiere de alternativas farmacológicas nuevas que brinden un tratamiento más efectivo y seguro, ya que los fármacos utilizados actualmente en la clínica, lejos de ser eficientes y efectivos, la mayoría producen efectos secundarios diversos, tanto para la madre como para el feto, y no logran retrasar el trabajo de parto el tiempo suficiente para que el feto termine de desarrollarse (Tan et al., 2006); por consiguiente, y tomando en cuenta los antecedentes ya descritos, se plantea la búsqueda de opciones farmacológicas nuevas que brinden mejores resultados para retrasar el trabajo de parto por un tiempo más prolongado y que logre reducir la tasa de incidencia de los prematuros, además de buscar que sean seguros y que ayuden a reducir la tasa de morbilidad y mortalidad neonatal.

En investigaciones actuales enfocadas a la determinación y entendimiento de los mecanismos, así como de los factores que influyen en la contracción y la relajación miometrial durante el embarazo, se ha visto que para poder desarrollar tratamientos mejores el incremento del AMPc es una ruta relacionada ampliamente con los mecanismos que gobiernan la relajación del músculo liso y la quiescencia del útero durante el embarazo; por esta razón, recientemente se han considerado a un grupo de compuestos inhibidores de PDE-4 como una alternativa farmacológica nueva, ya que este grupo de enzimas, en particular PDE4-B2 se sobreexpresa al final del embarazo para degradar específicamente al AMPc e inducir la contracción miometrial (Méhats et al., 2000; Méhats et al., 2004; Yuan y López-Bernal, 2007). Entre los inhibidores específicos de PDE-4 se han encontrado un grupo de compuestos que se han sintetizado con base en los productos de hidrólisis de la talidomida que, además de conservar y potencializar las propiedades terapéuticas inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la talidomida, también poseen la característica

de incrementar los niveles de AMPc mediante este mecanismo de regulación novedoso; por ello, en este estudio se eligieron cuatro análogos de la talidomida del grupo de inhibidores específicos de PDE-4: FDPMe, 4AFDPMe, 4NO₂FDPMe y TFFDPMe, de los cuales se llevó a cabo la evaluación farmacológica de su efecto útero-relajante en tejidos miometriales de mujeres embarazadas, se seleccionó a los dos mejores y se determinaron algunos de los mecanismos mediante los cuales podrían inducir su efecto inhibitorio de las contracciones miometriales para proponerlos como alternativas tocolíticas nuevas para retrasar el parto prematuro de manera más eficiente y segura (Fernández-Martínez, 2011; Muller et al., 1996; Muller et al., 1998).

En la evaluación del efecto útero-relajante de los cuatro análogos utilizados en este trabajo se usaron dos modelos de contracción diferente. El primero fue sobre contracciones espontáneas, que con anterioridad se mencionó, se producen debido a que el útero se caracteriza por su actividad contráctil espontánea sin la necesidad de una estimulación externa dándole actividad de células marcapaso, en donde una disminución en el potencial negativo de la membrana se encuentra relacionado con un incremento en la actividad miometrial contráctil espontánea. Estas células marcapaso despolarizan la membrana y los potenciales de acción son los responsables de iniciar una señalización y producir un alto grado de actividad eléctrica que puede ser coordinada y propagada de manera eficiente a las células adyacentes que permiten una sincronía contráctil al final del parto (Bernal, 2006; Botella, 1997; Graves, 1996; Hudson y López-Bernal, 2012; Macintyre et al., 2007; Norwitz y Robinson, 2001); mientras que, el segundo modelo que se utilizó para evaluar el efecto útero-relajante sobre las contracciones tónicas sostenidas fue a través de una despolarización de la membrana con K⁺ 40 mM con Ca²⁺ que permitió la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje y el incremento de la [Ca²⁺]_i. Anteriormente se mencionó que este proceso juega un papel importante en los mecanismos para producir la contracción miometrial, mediante la pMLC catalizada por la MLCK, que responde rápidamente al incremento de la [Ca²⁺]_i, a través de la formación del complejo calcio-calmodulina; mientras que, la desfosforilación de la MLC es catalizada por la MLCP, así como el bloqueo de los canales de calcio y tales elementos conllevan a la relajación miometrial (Carvajal y Weiner, 2003; Hudson y López-Bernal, 2012; Phillippe y Chein,

1995). Con los resultados obtenidos de ambos modelos se pudo concluir que los análogos de talidomida inducen la relajación en tejidos miometriales de mujeres embarazadas, ya que el efecto útero-relajante fue claro y dependiente de la concentración, aunque unos mostraron ser más potentes y efectivos que otros, y de los cuales los que expusieron los mejores resultados fueron el rolipram, el 4AFDPMe, y el 4NO2FDPMe, que a pesar de mostrar diferencias en cuanto a potencia resultaron equiefectivos; esto podría explicarse debido a que a pesar de que tienen una estructura química similar, basada en los productos de hidrólisis de la talidomida, sus grupos funcionales les proporcionan características diferentes a cada una de las moléculas, como son su afinidad a las moléculas receptoras membranales o citoplasmáticas, o su permeabilidad para traspasar la membrana celular, lo cual resulta importante para producir un efecto farmacológico significativo (Muller et al., 1998). De los datos que han sido reportados, hay factores diversos que pueden marcar las diferencias en la funcionalidad de los análogos en modelos *in vivo*, tales como, las vidas medias en el plasma humano a 37 °C, la estabilidad y la solubilidad de cada compuesto, por ejemplo, el FDP que ha mostrado tener una vida media de aproximadamente 8 h, mientras que la del FDPMe ha sido de aproximadamente 3 h y un análogo que se asemeja al 4AFDPMe tiene una vida media de aproximadamente 4 h, estas diferencias entre las vidas medias pueden reflejar la solubilidad y estabilidad de cada compuesto en el organismo, así como su biodisponibilidad; entonces, este es un factor importante porque algunos análogos podrían ser metabolizados o eliminados del tejido o del organismo a diferentes velocidades sin alcanzar un efecto significativo, lo que resulta interesante para demostrar que modificaciones pequeñas en las moléculas pueden conferirle características específicas a cada compuesto, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Corral et al., 1996; Fernández-Martínez, 2004; Marriott et al., 1998).

En ambos modelos funcionales se comprobó la actividad útero-relajante de los análogos y el rolipram, pero también se observó que las CI_{50} de ellos fueron menores en el modelo de contracciones fásicas espontáneas que en el de tónicas sostenidas, lo que indica que las contracciones espontáneas son varias veces más sensibles a los compuestos que las contracciones inducidas por la solución despolarizante de K^+ 40 mM. Esta diferencia importante puede estar relacionada con los mecanismos finos que controlan ambos tipos de

contracciones. La fuerza de contracción del músculo liso miometrial es principalmente generada por la pMLC, cuyo mecanismo se encuentra regulado por la actividad de la MLCK que anteriormente se mencionó que se activa por el complejo calcio-calmodulina al incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ e induce la contracción, mientras que la MLCP se encarga de desfosforilar la cadena e inducir la relajación pero cuando la actividad de esta última enzima es inhibida a través de la fosforilación de una de sus subunidades mediante mecanismos independientes de Ca^{2+} , además de preservar la contracción también puede producir un incremento en los niveles de fosforilación de la MLC y en la fuerza de contracción para una determinada $[Ca^{2+}]_i$, por lo tanto la activación de la MLCK y la inhibición de la MLCP producen un fenómeno conocido como la “sensibilización del calcio” (Aguilar y Mitchel, 2010; Hudson y López-Bernal, 2012). Además, varios experimentos realizados en músculo liso vascular han mostrado que agonistas de los GPCR son capaces de producir mayores incrementos en la fuerza de contracción que el KCl para una determinada $[Ca^{2+}]_i$, ya que las contracciones inducidas por el KCl son impulsadas totalmente por la despolarización de la membrana y la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje, mientras que los agonistas de los GPCR contribuyen a la sensibilización de Ca^{2+} mediante mecanismos que involucran a la vía de señalización de las proteínas Rho (Hudson y López-Bernal, 2012). Por lo tanto, aunque las contracciones fásicas pueden ser más fuertes que las contracciones tónicas inducidas por el KCl, se ha podido observar que las contracciones espontáneas son más sensibles posiblemente por el mecanismo fino que regula su actividad, incluso se han reportado diferencias substanciales entre las contracciones fásicas uterinas y las contracciones tónicas vasculares en consecuencia de la regulación de la pMLC y de la actividad de la MLCP mediada por ROCK (cinasa asociada a Rho) que induce una difosforilación (ppMLC) (Aguilar et al., 2012; Hudson et al., 2012).

De acuerdo con estos datos reportados, se podría considerar para futuros estudios la regulación de la MLCP, que es una holoenzima compuesta por tres subunidades: PP1c que tiene actividad catalítica, MLCPT1 (por sus siglas en inglés) que es una subunidad de unión a la miosina y una pequeña subunidad M20. La regulación de la MLCPT1 es compleja pero la evidencia experimental en músculo liso de humano y rata, y en varios tipos celulares

(epiteliales y musculares) sugieren que su extremo terminal-C es un blanco para varias proteínas cinasas en las que se incluye a ROCK, cuya actividad para regular la contracción del músculo liso se ha reportado a través de dos vías: una mediante un mecanismo de autoinhibición a través de la fosforilación simultánea o independiente de dos sitios diferentes de la MLCPT1 en los residuos Thr853 y Thr696, el cual es un mecanismo independiente del Ca^{2+} que bloquea la actividad de la MLCP y la otra mediante una fosforilación directa del residuo Thr18 de la MLC para inducir la contracción (Aguilar y Mitchel, 2010; Aguilar et al., 2012; Hudson et al., 2012; Hudson y López-Bernal, 2012; Lartey y López-Bernal, 2009). La vía de señalización para activar a ROCK involucra a los agonistas que se unen a receptores acoplados a proteínas G_q y $G_{12/13}$ que son capaces de activar al grupo proteínas pertenecientes a la familia Rho mediante la activación de los Rho-GEFs (factores de intercambio del nucleótido de guanina-Rho); así cuando el GTP se une a RhoA, éste es capaz de activar moléculas efectoras como ROCK (Hudson et al., 2012; Lartey y López-Bernal, 2009). De hecho, la activación de la vía de señalización Rho-ROCK ha sido evidenciada durante las contracciones miométriales fásicas al inicio del parto mediante un incremento de los niveles de RhoA-GTP y su expresión es aún mayor en el parto pretérmino espontáneo (Hudson y López-Bernal, 2012), ya que al inhibir la actividad de la MLCP en consecuencia se incrementa la contracción uterina; por lo tanto, la inhibición de RhoA puede incrementar la actividad de la MLCP y producir la relajación del músculo miométrial, siendo así otro blanco terapéutico que se debe considerar en los mecanismos de contracción-relajación uterina (Hudson et al., 2012; Lartey y López-Bernal, 2009). La inactivación de la vía de RhoA puede ser regulada negativamente por varias familias de proteínas, tales como: las proteínas activadoras de Rho-GTPasa (RhoGAPs) que aceleran la hidrólisis de GTP a GDP, ya que GDP unida a RhoA la mantiene en un estado inactivo mediante la interacción con los inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina-Rho (RhoGDIs) (Patel y Karginov, 2014); otro mecanismo, el cual resulta interesante mencionar para este estudio, ha sido el reportado sobre la regulación negativa a través de la fosforilación del residuo Ser-188 de RhoA producida por la PKA que es activada al incrementar los niveles de AMPc y cuyo incremento de este segundo mensajero ha sido el enfoque central de este trabajo mediante la inhibición de PDE-4 con el uso de algunos análogos de talidomida para inducir la relajación miométrial (Jones y Palmer,

2012; Patel y Karginov, 2014), incluso sería factible la fosforilación de PKA sobre ROCK1 y ROCK 2 que son los efectores río abajo de RhoA e inhibir su actividad, ya que estudios numerosos han identificado 45 sitios de fosforilación para ROCK1 y 43 sitios para ROCK2 en humanos, lo que resultaría interesante evaluar (Julian y Olson, 2014).

El papel importante que juega el AMPc en el mantenimiento de la quiescencia uterina durante el embarazo y la relajación del músculo liso miometrial ha sido muy bien documentando, incluso desde el año de 1978 se reportó que el incremento de su concentración induce la relajación del miometrio humano embarazado, mientras que las enzimas PDE-4 se encargan de regular a la baja estas concentraciones al hidrolizar específicamente a este segundo mensajero (Carvajal y Weiner, 2003; Ferre et al., 1978; Méhats et al., 2004; Yuan y López-Bernal, 2007). Se ha reportado que PDE-4 se sobreexpresa predominantemente en las células inflamatorias y en el músculo liso como el útero, incluso en el miometrio humano se ha observado mediante análisis moleculares los patrones de expresión de los 4 genes que codifican a PDE-4 de manera más específica y se encontró que PDE-4A y PDE-4C no se encuentran involucradas al final del embarazo, en cambio PDE-4B y PDE-4D incrementan sus niveles, principalmente PDE-4B2 que se sobreexpresa al término del embarazo y al comienzo del trabajo de parto, cuya actividad se ha visto incrementada hasta en un 75% en estas etapas (Méhats et al., 2000; Méhats et al., 2004; Oger et al., 2004). Desde entonces, la inhibición de PDE-4 se ha convertido en un blanco terapéutico prometedor para el tratamiento del parto prematuro con el cual se pretende obtener mejores resultados y menos efectos secundarios (Méhats et al., 2004; Méhats et al., 2007), ya que puede inducir la relajación miometrial a través de la modulación de varios mecanismos intracelulares al activar la PKA, la cual se encarga de fosforilar varias proteínas involucradas en la contracción y relajación del músculo liso, y alterar su funcionalidad (Adbel-Latif, 2001; Carvajal y Weiner, 2003; Yuan y López-Bernal, 2007) en las que se incluyen: la fosforilación de la MLCK que produce una disminución en su afinidad para unirse al complejo Ca^{2+} /calmodulina, incluso en presencia de agonistas para incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ (Carvajal y Weiner, 2003; Challis et al., 2000; Word, 1995), inhibe la activación de la fosfolipasa C inducida por agentes contráctiles (Carvajal y Weiner, 2003; Sanborn et al., 1995; Sanborn et al., 1998), inhibe la entrada de

Ca^{2+} a través de los canales de calcio (Carvajal y Weiner, 2003; Keef et al., 2001; Sanborn et al., 1998), activa las bombas de Ca^{2+} (Carvajal y Weiner, 2003; Sanborn et al., 1998) y activan la gran conductancia de los canales de K^+ activados por el Ca^{2+} que conducen a la hiperpolarización de la membrana (Meera et al., 1995; Zhou et al., 2001); también, se ha sugerido que el incremento de los niveles intracelulares de AMPc ha estado relacionado con la expresión de proteínas involucradas en la contracción, tales como: los receptores a OT y COX-2, ya que al disminuir los niveles de AMPc se ha observado una mayor expresión de estos receptores (Carvajal y Weiner, 2003). Además del efecto útero relajante, también se ha reportado que este segundo mensajero se encuentra involucrado en los procesos antiinflamatorios al inhibir la liberación de varias citocinas proinflamatorias, tales como: TNF- α , IL-6 e IL-1 β , implicadas en la activación de la ruta final del parto a término o prematuro inducido por infecciones, mediante una vía común en la que activan el metabolismo de los fosfolípidos, la liberación de AA y el incremento de la expresión de COX-2, importante para la producción de las PGE₂ y PGF_{2 α} , que a su vez activan la vía de la PLC que se encarga de elevar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e inducir las contracciones uterinas (Méhats et al., 2000; Méhats et al., 2004; Oger et al., 2004).

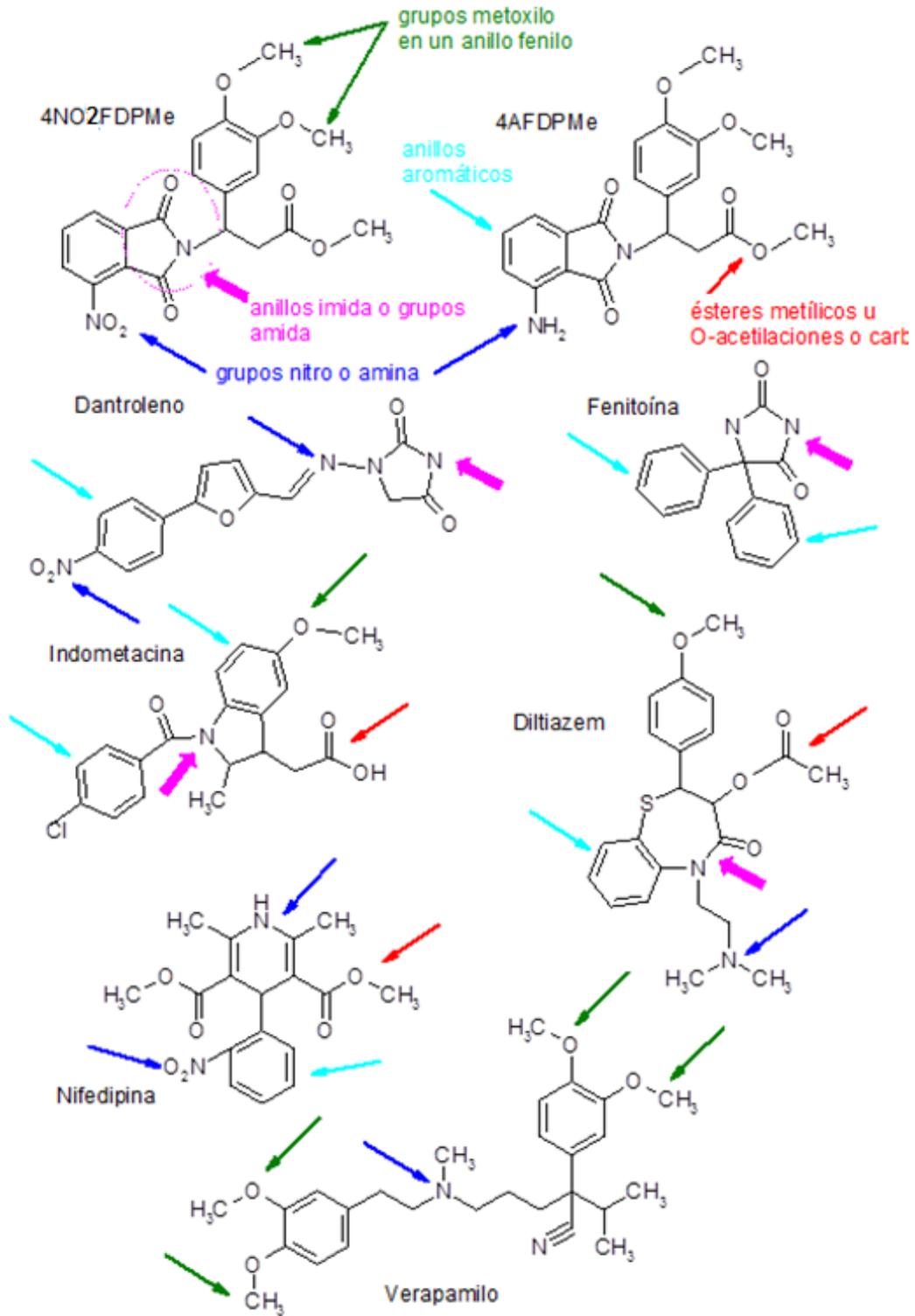
Para determinar la inhibición de los análogos 4AFDPMe y 4NO2FDPMe sobre PDE-4 se utilizó un modelo de medición indirecta mediante la cuantificación del AMPc en células HeLa. Los resultados que se obtuvieron *in vitro* manifestaron que el efecto de inhibición de PDE-4 fue dependiente de la concentración de los compuestos, al elevar los niveles de AMPc. Incluso, una comparación de las curvas de concentración de AMPc obtenidas para ambos análogos resultaron similares a los niveles de este segundo mensajero inducidos por otros inhibidores de PDE-4 y los β -miméticos en tejido miometrial (Craci et al., 2007; Klukovits et al., 2010; Méhats et al., 1999; Verli et al., 2013); sin embargo, con los resultados se pudo observar que la CE₅₀ utilizada para el 4NO2FDPMe fue menor en comparación con la obtenida para el 4AFDPMe (181.7 y 448.6 μM , respectivamente), lo que mostró un resultado diferente en contraste con los modelos funcionales, donde la potencia del 4AFDPMe fue mayor. Esto podría explicarse con trabajos de otros autores donde afirman que los valores de potencia encontrados en estudios funcionales en miometrio humano embarazado no siempre son paralelos a los valores de potencia

determinados en estudios bioquímicos para la selectividad de las PDEs, y tales diferencias pueden estar relacionadas con el tipo de célula y la metodología aplicada (Bardou et al., 1999), así como a la solubilidad y estabilidad química (Fernández-Martínez, 2011). Por otro lado, esta diferencia también podría estar dada por la afinidad de los análogos a las diferentes isoformas de PDE-4 (A, B, C y D) que pueden adoptar más de una configuración activa, los cuales se pueden distinguir farmacológicamente por su sensibilidad relativa hacia el rolipram; en donde, un estado conformacional interactúa con el rolipram con una alta afinidad en el rango nanomolar (HAPDE4), y el otro muestra una menor afinidad en el rango micromolar (LAPDE4); esto ha permitido identificar la correlación de ciertos efectos secundarios con la inhibición de HPDE4, mientras que los efectos terapéuticos están relacionados con la interacción de LPDE4 en los procesos inflamatorios; además, los datos indican que cerca del término del embarazo las PDE-4 involucradas en el proceso contráctil se encuentran en un estado conformacional de LAPDE4 (Méhats et al., 2000). Tales evidencias sugieren que la CE_{50} de los análogos de talidomida en el rango micromolar puede ser también el resultado de su interacción con el conformero LAPDE4. Otra evidencia que podría evidenciar la efectividad de 4AFDPMe y 4NO2FDPMo para inhibir a PDE-4, ha sido dada con el apremilast, que es un fármaco recientemente aceptado por la FDA para su uso en la clínica y el cual pertenece al grupo de compuestos análogos de talidomida que inhibe específicamente a todas las isoformas de PDE-4, con valores de CI_{50} en el rango de 10 a 100 nM, y no inhibe otras PDEs, pero a pesar de que no muestra una diferencia significativa en cuanto a su selectividad entre las isoformas de PDE-4, se ha podido observar que apremilast es un poco más potente para inhibir a la isoforma PDE-4A1A seguida de la forma PDE-4B2 (14 y 27 nM, respectivamente), siendo esta última importante para marcar el término del embarazo y el comienzo del trabajo de parto (Schafer et al., 2014).

A partir de las pruebas funcionales y modelos experimentales en previos similares en músculo liso uterino realizados en el laboratorio donde se desarrolló este trabajo, se observó que la respuesta de los análogos de talidomida era inmediata al colocar diferentes concentraciones de cada uno de ellos, lo que llevó a suponer que otro de los mecanismos de acción de estos análogos era una respuesta membranal, ya que en comparación con las

respuestas obtenidas a través de la activación de la vía de proteínas G y generar una señal intracelular a través de los segundos mensajeros, tal efecto podría ser un poco más lento (López-Bernal, 2003; López-Bernal, 2007; Peltier, 2003). De acuerdo a estas observaciones, además del efecto de los análogos al elevar las concentraciones de AMPc inhibiendo la actividad de PDE4 para inducir la relajación miometrial mediante la regulación de los diversos sustratos de PKA incluyendo a los mecanismos independientes de $[Ca^{2+}]_i$ (Carvajal y Weiner, 2003; Hudson et al., 2012; Woodrum y Brophy, 2001), se consideró otro mecanismo por el cual actúan los análogos de talidomida, éste fue la regulación de la contracción y relajación miometrial tanto de las contracciones espontáneas como de las tónicas sostenidas por el bloqueo de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje (Hudson y López-Bernal, 2012; Hudson et al., 2012). Por esta razón, se empleó otro modelo funcional basado en el bloqueo de estos canales para evidenciar que éste podría ser otro mecanismo por el cual actúan los dos análogos de talidomida como relajantes de los tejidos. Se evaluó el efecto del rolipram, 4AFDPM e y 4NO2FDPM de las CI_{50} sobre tejidos miometriales humanos embarazados y, de acuerdo con los resultados obtenidos, se elaboró una curva acumulativa de Ca^{2+} , esto mostró que los tres compuestos son capaces de inhibir la respuesta contráctil inducida por el Ca^{2+} al no alcanzar la amplitud de la contracción tónica sostenida como lo logró el control, el cual no fue incubado con algún compuesto; a pesar de que el rolipram y el 4AFDPM e tuvieron los mejores efectos, el 4NO2FDPM e no presentó una diferencia significativa en el bloqueo de estos canales. Este efecto interesante probablemente se debe a que los análogos de la talidomida comparten ciertas semejanzas químicas estructurales con los bloqueadores de Ca^{2+} que se utilizan actualmente en la clínica, cuyos grupos funcionales y similitudes moleculares que tienen con los análogos les podrían conferir esta actividad novedosa para acoplarse a los sitios de unión y bloqueo de los canales de calcio de las células miometriales humanas (Manzur, 2014); por ejemplo, como se muestra en la figura 21, el rolipram y los dos análogos comparten el grupo dialcoxifenil (metoxi u otro O-sustituyente) presente también en verapamilo, diltiazem e indometacina; además, la presencia del grupo imida de los análogos de talidomida se asemejan a las amidas cíclicas de rolipram, la indometacina y el diltiazem, así como las aminas secundarias que se encuentran en nifedipina y verapamilo; incluso, los grupos éster de metilo, nitro y amino de los análogos son similares a varios de los

inhibidores de PDE-4 (Houslay et al., 2005) y para las diferentes familias químicas de los bloqueadores de canales de calcio que relajan el músculo liso, independientemente de la contracción estimulada (Yousif y Triggle, 1986). Como ya se mencionó, el flujo de calcio intracelular juega un papel muy importante en el mecanismo de la contracción miometrial por lo que el uso de bloqueadores de canales de calcio ha sido una opción en la clínica para el tratamiento del parto prematuro pero no han sido del todo efectivo debido a su falta de especificidad, sobre todo cuando se emplean fármacos que bloquean los canales del tipo L, que no solo están presentes en células del miometrio, sino también se encuentran en otros tejidos como el músculo liso vascular, por lo que su uso se ha limitado debido a los efectos secundarios que producen como la hipertensión y taquicardia, además pueden actuar sobre el flujo sanguíneo útero-placentario; por otro lado, los canales de calcio del tipo T son más específicos para el miometrio por lo que han mostrado un alto potencial para inhibir las contracciones con menos efectos secundarios, sin embargo, no han resultado tan eficientes para retrasar las contracciones el tiempo suficiente debido a que el mecanismo de contracción-relajación del músculo liso miometrial no solo está gobernado por las $[Ca^{2+}]_i$ (Norwitz y Robinson, 2001; Vause y Johnston, 2000). Por otro lado, cabe mencionar que la actividad del bloqueo de la entrada de Ca^{2+} de 4AFDPM e y 4NO2FDPM e coincidió con su respectivo orden de potencia como agentes relajantes en los otros dos modelos funcionales, así como con su potencia como inhibidores de TNF- α , cuya IC_{50} para 4AFDPM e es de 0.45 μ M y para 4NO2FDPM e es de 64 μ M, que de igual manera se encuentran relacionados con su potencia inhibidora de PDE-4 (Fernández-Martínez, 2011; Muller et al, 1996; Muller et al, 1998). Por lo tanto, ya que los análogos de talidomida son menos potentes que los bloqueadores de canales de calcio conocidos actualmente, se podría sugerir que los análogos carecen de los efectos secundarios cardiovasculares (Vause y Johnston, 2000; Norwitz y Robinson, 2001; López-Bernal, 2007).



Los resultados obtenidos en este estudio dan un sustento prometedor al confirmar que los mecanismos de acción de los análogos de talidomida pueden actuar sobre las dos vías principales que gobiernan la relajación y contracción miometrial (AMPc y el flujo de Ca^{+2} intracelular), ver anexo 1; además de producir efectos inmunomoduladores, puesto que al elevar los niveles de AMPc se ha observado que este segundo mensajero regula a la baja varias citocinas proinflamatorias en las que se incluyen a TNF- α , lo que podría sugerir que los análogos de talidomida serían una buena opción para el tratamiento farmacológico de los nacimientos prematuros, así como proporcionarían mejores efectos para retrasar el parto y de manera más segura al disminuir los efectos secundarios que producen los fármacos actualmente utilizados en la clínica; incluso, también se ha comprobado que este grupo de análogos inhibidores de PDE-4 no son teratogénicos (Fernández-Martínez, 2011; Ito et al., 2011; Méhats et al., 2007; Yuan y López-Bernal, 2007). En los antecedentes se mencionó que este grupo de compuestos fueron sido sintetizados con base en los productos de hidrólisis de la talidomida, cuyas propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias han hecho a este fármaco interesante para el tratamiento de varios desórdenes autoinmunitarios, por lo que se han realizado estudios enfocados en identificar el mecanismo de acción de la talidomida y su blanco directo con el fin de desarrollar moléculas más estables que puedan conservar y potenciar sus propiedades farmacológicas; además de reducir los efectos secundarios y su actividad teratogénica. En trabajos recientes un grupo de investigadores mediante el uso de una técnica de purificación por afinidad, han podido evidenciar e identificar a una proteína llamada cereblon (CRBN) como el blanco directo de talidomida (Ito et al., 2010; Ito et al., 2011).

CRBN es una proteína que forma un complejo de ubiquitina ligasa E3 con una proteína 1 de unión al DNA dañado (DDB1) y Cul4A, importantes para el crecimiento de las extremidades y la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos 8 (Faf8), esto demostrado en peces cebra y pollos; por lo que actualmente, con los trabajos de Ito et al. (2010, 2011) se ha evidenciado que la talidomida inicia sus efectos teratogénicos al unirse a cereblon mediante una interacción del anillo glutarimida del fármaco y esta proteína, y en consecuencia se inhibe su función de ligasa ubiquitina E3 y la subsecuente acumulación de los sustratos lo que resulta en los defectos de desarrollo como las deformidades de orejas y

extremidades, a través de la regulación a la baja de Fgf8 y Fgf10 (Chang y Stewart, 2011; Ito et al., 2010; Ito et al., 2011); sin embargo, no se han descartado otros mecanismos de acción menores de la talidomida, como el estrés oxidativo inducido por esta molécula mediante la formación directa de especies reactivas de oxígeno y su actividad antiangiogénica al inducir la inhibición de la vasculogénesis que procede la inhibición de la expresión de Fgf8 y la muerte celular en las yemas de las extremidades (Ito et al., 2010). Otros reportes de algunos análogos como pomalidomida y lenalidomida, que son estructuralmente similares a talidomida, también han mostrado unirse a la proteína humana cereblon e inhiben su autoubiquitinación mediante la interacción del anillo glutarimida (Lopez-Girona et al., 2012), aunque cabe mencionar que existen diferencias entre las especies en cuanto al efecto de teratogenicidad, ya que lenalidomida no ha mostrado efectos teratogénicos en ratas y conejos, siendo estos últimos una especie sensible a los defectos de nacimiento inducidos por la talidomida, mientras que pomalidomida sí ha mostrado ser un compuesto teratogénico tanto para ratas como para conejos (Lopez-Girona et al., 2012; Teo, 2005). Por otro lado, también en estudios para determinar si el anillo ftalimido era otro blanco de cereblon se pudo corroborar que esta proteína no se une a esta región del anillo ftalimido (Lopez-Girona et al., 2012), lo que da un buen soporte para afirmar que los análogos de talidomida pertenecientes al grupo de inhibidores de PDE-4 ya no presentan esa actividad teratogénica, ya que su síntesis basada en sus productos de hidrólisis solo conserva el anillo ftalimido (Fernández-Martínez, 2011; Muller et al., 1998).

Por último se realizó una prueba de inmunocitoquímica en UtSMC, para corroborar la presencia de PDE-4B2 en el citosol y el núcleo en miocitos uterinos (Méhats et al., 2004; Méhats et al., 2007), debido a que es el blanco farmacológico principal para el uso de 4AFDPMé y 4NO2FDPMé y evaluar el efecto de estos análogos sobre los niveles de fosforilación de la MLC, que es el mediador principal de los mecanismos de contracción, y el cual se ha documentado que se lleva a cabo en la parte nuclear, citosólica y citoesqueletica (Conti et al., 2003; GeneCards, 2014). Los resultados que se obtuvieron en este trabajo evidenciaron la presencia de PDE-4B2, mientras que en la evaluación del efecto de los dos análogos para reducir los niveles de la pMLC no resultó lo que se esperaba; para esta última prueba primero se requirió evidenciar la fosforilación generada

por la estimulación con OT, como se esperaba y tomando en cuenta que las UtSMC tienen un comportamiento diferente que las células de miometrio embarazado (Zhou et al., 2007), la OT indujo un incremento bajo pero evidente de la pMLC (Aguilar et al., 2010), mientras que con la exposición previa de 4AFDPMé y 4NO2FDPMé en las UtSMC incubadas en presencia o ausencia OT, no se observó una disminución significativa en los niveles de pMLC. Este resultado se podría explicar con lo mencionado anteriormente sobre las diferencias entre las contracciones tónicas sostenidas y las contracciones espontáneas en músculo liso; los estudios de Aguilar y colaboradores (2012) soportan fuertemente el concepto de que hay rutas distintas que regulan los mecanismos contráctiles de los miocitos vasculares y uterinos, y cuyas diferencias principales se han basado en que las contracciones fásicas de miocitos uterinos ocurren con una amplitud alta y en episodios de intervalos, en donde la ppMLC en los residuos de Thr18 y Ser19 juega un papel importante para que se lleve a cabo la formación de los puentes cruzados de miosin-actina, y cuyo mecanismo de la ppMLC es dependiente de ROCK e independiente de la $[Ca^{2+}]_i$, por lo tanto la generación de la fuerza producida es tres veces más fuerte que el mecanismo contráctil de los miocitos vasculares, en donde la monofosforilación en el residuo de Ser19 de la MLC parece ser más importante para los patrones contráctiles tónicos. Por otro lado, Woodrum y Brophy (2001) también han reportado que la relajación del músculo liso tónico puede ocurrir por la activación de la vía de señalización dependiente de nucleótidos cíclicos, incluso con la presencia continua de un agente contráctil y el cual es un mecanismo independiente de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ o del estado de la pMLC, lo que quizá refuerza la propuesta de que estos análogos de talidomida son bloqueadores de canales de calcio, además de ser inhibidores potentes de PDE-4 que inducen la relajación miometrial principalmente por el incremento de AMPc. A pesar de que en esta prueba no se observó una disminución de la pMLC, sí se visualizó que con el tratamiento de 4NO2FDPMé o 4AFDPMé, en ausencia o presencia de OT existieron cambios en la localización de la pMLC en cuanto a la zona nuclear, citosólica y citoesquelética inducida por la MLCK; tomando en cuenta que las células de miometrio no embarazado tienen una mayor expresión de la MLC que las células de miometrio embarazado (Riley et al., 2005). Este efecto podría explicarse con algunos trabajos que han reportado que las enzimas que degradan el AMPc, pueden desempeñar un papel importante en la compartimentación de la

señal del AMPc y la fosforilación (Jin et al., 1998). Conti y colaboradores (2003) reportaron que debido a que la difusión del AMPc puede ser impedida por barreras físicas o por la degradación de este segundo mensajero a través de la actividad de las PDEs, se produce un efecto de compartimentación del AMPc en miocitos cardíacos y otros tipos celulares, lo que permite la acumulación del AMPc, y por lo tanto los agonistas β_1 y β_2 adrenérgicos, y las PGEs producen distintos patrones de fosforilación en las células y también producen distintos efectos sobre la contractilidad; por lo tanto, a través de los incrementos de los niveles de AMPc a través de la inhibición de PDE-4 por 4NO2FDPMo o 4AFDPMo y la localización celular de PDE-4B2, se podrían explicar estos cambios consecuentes a la localización de la fosforilación de la MLC. Por otro lado, también se ha documentado que los inhibidores de PDEs incrementan la difusión del AMPc desde el sitio de síntesis, por lo tanto, las PDEs pueden controlar los niveles de AMPc locales, el acceso de este segundo mensajero a la subunidad reguladora de PKA, e inducir la activación de las PKAs, que a su vez pueden fosforilar diversas proteínas blanco, incluyendo la MLCK y otras proteínas antes mencionadas importantes en el mecanismo de contracción y relajación miométrial (Jin et al., 1998).

IX. CONCLUSIONES

- Rolipram mostró ser más potente como inhibidor sobre las contracciones espontáneas del tejido aislado de útero humano embarazado que los 4 análogos de la talidomida (4AFDPM_e, 4NO₂FDPM_e, FDPMe y TFFDPM_e) y el 8-Br-AMPc.
- Los análogos de la talidomida 4AFDPM_e, 4NO₂FDPM_e y TFFDPM_e resultaron ser equiefectivos al compararse con Rolipram y 8-Br-AMPc.
- El Rolipram y el 4AFDPM_e son equipotentes como inhibidores de las contracciones tónicas sostenidas en el tejido aislado de útero humano embarazado.
- Los dos análogos 4AFDPM_e y 4NO₂FDPM_e son equiefectivos con el rolipram como inhibidores de las contracciones tónicas sostenidas.
- Los análogos de talidomida, 4AFDPM_e y 4NO₂FDPM_e redujeron el flujo de calcio intracelular debido a que la respuesta contráctil de los tejidos se vio disminuida en presencia de éstos lo que sugiere que es uno de los mecanismos de acción para inducir la relajación del tejido miometrial.
- Los análogos de talidomida 4AFDPM_e y 4NO₂FDPM_e incrementan significativamente los niveles de AMPc en células HeLa, dependiendo de la concentración. Esto confirma su actividad como inhibidores de la PDE-4 y sugiere ser uno de los mecanismos de acción plausibles como agentes útero-relajantes.
- El 4AFDPM_e y el 4NO₂FDPM_e son los análogos que tuvieron los mejores efectos relajantes sobre las contracciones espontáneas y tónicas sostenidas del útero humano embarazado, que además de incrementar los niveles de AMPc como inhibidores de la PDE-4, también inducen la relajación del tejido miometrial a través del bloqueo de los canales de calcio por lo que podrían ser agentes tocolíticos novedosos.
- En la prueba inmunocitoquímica los análogos 4AFDPM_e y el 4NO₂FDPM_e no mostraron disminuir los niveles de pMCL pero sí generaron cambios en la localización ultracelular, lo que indica que posiblemente el mecanismo principal que induce la relajación miometrial es el incremento de los niveles intracelulares de AMPc a través de un mecanismo independiente de la [Ca²⁺]_i y la pMCL.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Latif AA. Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med.* 2001; 226(3): 153-163.

Aguilar HN, Mitchel BF. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Human Reprod Update.* 2010; 16(6): 725-744.

Aguilar HN, Zielnik B, Tracey CN, Mitchell BF. Quantification of rapid myosin regulatory light chain phosphorylation using high-throughput in-cell western assays: comparison to western immunoblots. *PLoS One.* 2010; 5(4):e9965.

Aguilar HN, Tracey CN, Zielnik B, Mitchell BF. Rho-kinase mediates diphosphorylation of myosin regulatory light chain in cultured uterine, but not vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med.* 2012; 16(12): 2978-2989.

Bardou M, Cortijo J, Loustalot C, Taylor S, Perales-Marín A, Mercier FJ, Dumas M, Deneux-Tharoux C, Frydman R, Morcillo EJ, Advenier C. Pharmacological and biochemical study on the effects of selective phosphodiesterase inhibitors on human term myometrium. *Naunyn Schemiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 360(4):457-463.

Bernal AL. Causas del inicio del parto prematuro. En: Roura LC, editor. *Parto prematuro.* España: Médica panamericana, S. A.; 2006. p. 33-45.

Botella J. *El útero: Fisiología y Patología.* 1aed. España: Díaz de Santos Editores; 1997.

Buhimschi IA, Kramer WB, Buhimschi CS, Thompson LP, Weiner CP. Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 182 (2):458-464.

Carvajal JA, Weiner CP. Mechanisms underlying miometrial quiescence during pregnancy. *Fetal Matern Med Rev.* 2003; 14 (03):209-237.

Challis JR, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev.* 2000; 21(5):514-550.

Chang X, Stewart AK. What is the functional role of the thalidomide binding protein cereblon?. *Int J Biochem Biol.* 2011; 2(3):287-294.

Conti M, Jin SL. The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1999; 63:1-38.

Conti M, Richter W, Méhats C, Livera G, Park JY, Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem.* 2003; 278(8):5493-5496.

Croci T, Cecchi R, Marini P, Rouget C, Viviani N, Germain G, Guagnini F, Fradin Y, Descamps L, Pascal M, Advenier C, Breuiller-Fouché M, Leroy MJ, Bardou M. *In vitro* and *in vivo* pharmacological characterization of ethyl-4-[trans-4-[[[(2S)-2-hydroxy-3-[4-hydroxy-3[(methylsulfonyl) amino]-phenoxy] propyl) amino] cyclohexyl] benzoate hydrochloride (SAR150640), a new potent and selective human beta3-adrenoceptor agonist for the treatment of preterm labor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321(3):1118-1126.

Elovitz MA, Mrinalini C. Animal models of preterm birth. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15(10):479-487.

Farina L, Winkelman C. A review of the role of proinflammatory cytokines in labor and noninfectious preterm labor. *Biol Res Nurs.* 2005; 6(3):230-238.

Fernández-Martínez E, Morales-Ríos MS, Pérez-Álvarez V, Muriel P. Effects of thalidomide and 3-phthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanamide on bile duct obstruction-induced cirrhosis in the rat. *Drug Dev Res.* 2001; 54:209-218.

Fernández-Martínez E, Morales-Ríos MS, Pérez-Álvarez V, Muriel P. Immunomodulatory effects of thalidomide analogs on LPS-induced plasma and hepatic cytokines in the rat. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68(7):340-347.

Fernández-Martínez E. Thalidomide and its analogs: a potential immunomodulatory alternative for treating liver diseases and cirrhosis. In *Liver Cirrhosis: Causes, Diagnosis and Treatment*. Edited by Michelli ML. New York: Nova Science Publishers; 2011:1-30.

Ferre F, De pariente D, Breuiller M, Cedard L. Inhibition of human myometrial cyclic AMP phosphodiesterase by uterine relaxant drugs. *Biochem Pharmacol.* 1978; 7:1292-1294.

Ganong WF. *Fisiología Médica*. 20aed. México: El Manual Moderno, S. A. de C. V. Editores; 2006.

GeneCards the human gene database, Weizmann Insitute of Science. 2014. <http://www.genecards.org>. Consultado el 16 de Junio 2015.

Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000; 342:1500-1507.

Granger SE, Hollingsworth M, Weston AH. Effects of calcium entry blockers on tension development and calcium influx in rat uterus. *Br J Pharmacol.* 1986; 87:147-156.

Graves CR. Fármacos que contraen o relajan el útero. En: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RM, Gilman AG, editors. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México: McGraw-Hill, Interamericana; 1996. p. 1005-1013.

Gutiérrez F, Pareja M. Parto prematuro y bajo peso al nacer y su relación con la enfermedad periodontal. *Revista Kiru*. 2010; 7(1):43-49.

Hasbun J, Hasbun A. Infección y parto prematuro: Enlace epidemiológico y bioquímico. *Rev Chil Infect*. 2000; 17(1):7-17.

Houslay MD, Sullivan M, Bolger GB. The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: Intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and anti-depressant actions. *Adv Pharmacol*. 1998; 44:225-342.

Houslay MD, Schafer P, Zhang KYJ. Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today*. 2005; 10:1503-1519.

Hudson CA, López-Bernal A. The regulation of myosin phosphatase in pregnant human myometrium. *Biochem Soc Trans*. 2012; 40(1):262-267.

Hudson CA, Heesom KJ, López-Bernal A. Phasic contractions of isolated human myometrium are associated with Rho-kinase (ROCK)-dependent phosphorylation of myosin phosphatase-targeting subunit (MYPTI). *Mol Hum Reprod*. 2012; 18(5):265-279.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*. 2010; 237:1345-1350.

Ito T, Ando H, Handa H. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68:1569-1579.

Jin SL, Bushnik T, Lan L, Conti M. Subcellular localization of rolipram-sensitive, cAMP specific phosphodiesterases. Differential targeting and activation of the splicing variants derived from the PDE4D gene. *J Biol Chem.* 1998; 273(31):19672-19678.

Jones SE, Palmer TM. Protein kinase A-mediated phosphorylation of RhoA on serine 188 triggers the rapid induction of a neuroendocrine-like phenotype in prostate cancer epithelial cells. *Cell Signal.* 2012; 24(8):1504-1515.

Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK). Structure, regulation, and functions. *Small GTPases.* 2014; 5(e29846):1-12.

Keef KD, Hume JR, Zhong J. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca²⁺ channels (Ca_v1.2a,b) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281:C1743-C1756.

Kinney MV, Howson CP, McDougall L, Lawn JE. Nacidos demasiado pronto: Informe de acción global sobre nacimientos prematuros. PMNCH, Save the Children, Organización Mundial. 2012; 1-8.

Klukovits A, Verli J, Falkay G, Gáspár R. Improving the relaxing effect of terbutaline with phosphodiesterase inhibitors: studies on pregnant rat uteri *in vitro*. *Life Sci.* 2010; 87(23-26):733-737.

Lartey J, López-Bernal A. Rho protein regulation of contraction in the human uterus. *Reproduction.* 2009; 138(3):407-424.

Lenz W. Kindliche misbildungen nach medicament-einnehmen während de gravidität. *Dtsch Med Wochenschr.* 1961; 86:2555-2556.

Lenz W. A personal perspective on the thalidomide tragedy. *Teratology*. 1992; 46:417-418.

López-Bernal A. Mechanisms of labour-biochemical aspects. *BGOJ*. 2003; 110(Suppl 20):39-45.

López-Bernal A. Overview. Preterm labour: mechanisms and management. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2007; 7(Suppl 1):1-7.

Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, Miller K, Gandhi AK, Kang J, Karasawa S, Carmel G, Jackson P, Abbasian M, Mahmoudi A, Cathers B, Rychak E, Gaidarova S, Chen R, Schafer PH, Handa H, Daniel TO, Evans JF, Chopra R. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia*. 2012; 26(11):2326-2335.

Macintyre DA, Chan EC, Smith R. Myometrial activation-coordination, connectivity and contractility. *Fetal Matern Med Rev*. 2007; 18(4):333-354.

Manzur Y. Estudio del efecto de dos análogos de talidomida 4AFDPMe y 4NO₂FDPMe sobre la contracción tónica-sostenida del útero aislado de rata [Tesis]. Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Licenciatura en Biología; 2014.

Meera P, Anwer K, Monga M, Oberti C, Stefani E, Toro L, Sanborn BM. Relaxin stimulates myometrial calcium-activated potassium channel activity via protein kinase A. *Am J Physiol*. 1995; 269(2):C312-C317.

Méhats C, Tanguy G, Dallot E, Robert B, Rebourcet R, Ferré F, Leroy MJ. Selective up-regulation of phosphodiesterase-4 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP)-specific phosphodiesterase variants by elevated cAMP content in human myometrial cells in culture. *Endocrinology*. 1999; 140(7):3228-3237.

Méhats C, Tanguy G, Paris B, Robert B, Pernin N, Ferré F, Leroy MJ. Pregnancy induces a modulation of the cAMP phosphodiesterase 4-conformers ratio in human myometium: consequences for the utero-relaxant effect of PDE4-selective inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292(2):817-823.

Méhats C, Oger S, Leroy MJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterase-4 inhibitors: a promising therapeutic approach to premature birth?. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; 117S:S15-S17.

Méhats C, Schmitz T, Oger S, Hervé R, Cabrol D, Leroy MJ. PDE4 as a target in preterm labour. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2007; 7:1-5.

Muller GW, Corral LG, Shire MG, Wang H, Moreira A. Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. *J Med Chem.* 1996; 39(17):3238-3240.

Muller GW, Shire MG, Wong LM, Corral LG, Patterson RT, Chen Y, Stirling DI. Thalidomide analogs and PDE4 inhibition. 1998; 8:2669-2674.

Norwitz ER, Robinson JN. A systematic approach to the management of preterm labor. *Semin Perinatol.* 2001; 25(4):223-235.

Oger S, Méhats C, Barnette MS, Ferré F, Cabrol D, Leroy MJ. Anti-inflammatory and utero-relaxant effect in human myometrium of new generation phosphodiesterase-4 inhibitors. *Biol Reprod.* 2004; (70):458-464.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Referencia en línea, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/es/>, 2013, recuperado el 21/10/2014.

Palencia A. Parto Prematuro. Programa de educación continua en pediatría PRECOP [revista en internet] 2011 [5 de octubre de 2012]; 9:10-19. Disponible en: http://www.scp.com.co/precop/precop_files/modulo_9_vin_4/Precop_9-4-B.pdf.

Patel M, Karginov AV. Phosphorylation-mediated regulation of GEFs for RhoA. *Cell Adh Migr.* 2014; 8(1):1-18.

Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1(122):1-11.

Phillippe M, Chein KE. Pottassium chloride effects on hormonal signal transduction mechanism underlying phasic miometrial contractions. *J Endocrinol.* 1995; 146:485-493.

Price SA, López-Bernal A. Uterine quiescence: the role of cyclic AMP. *Exp Physiol.* 2012; 86(2):265-272.

¿Qué es la endometriosis? Síntomas y tratamientos. 2014. www.clinicadefertilidadpuebla.com. Consultado el 14 de Noviembre 2014.

Riley M, Baker PN, Tribe RM, Taggart MJ. Expression of scaffolding, signaling and contractile-filament proteins in human myometria: effects of pregnancy and labour. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(1):122-134.

Sanborn BM, Qian A, Ku CY, Wen Y, Anwer K, Monga M, Singh SP. Mechanisms regulating oxytocin receptor coupling to phospholipase-C in rat and human myometrium. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 395:469-479.

Sanborn BM, Yue C, Wang W, Dodge KL. G protein pathways in myometrium: affecting the balance between contraction and relaxation. *Rev Reprod.* 1998; 3(3):196-205.

Schett G, Sloan VS, Stevens RM, Schafer P. Apremilast: a novel PDE4 inhibitor in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Ther Adv Musculoskel Dis.* 2010; 2(5):271-278.

Schafer PH, Parton A, Capone L, Cedzik D, Brady H, Evans JF, Man HW, Muller, Stirling DI, Chopra R. Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. *Cellular Signalling.* 2014; 26(9):2016-2029.

Sheskin J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 1965; 6:303-306.

Simpson KJ, Lukacs NW, Colleti L, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokines and the liver. *J Hepatol.* 1997; 27: 1120-1132.

Somers GF. Pharmacological properties of thalidomide (α -phthalimidoglutarimide), a new sedative hypnotic drug. *Br J Pharmacol.* 1960; 15: 111-116.

Stanfield CL, Germann WL. Muscle Physiology. In *Principles of human physiology.* Edited by Preston WH. Alabama: Pearson Education; 2011: 782 p.

Stryer L. Contracción muscular y motilidad celular. En: Stryer L, editor. *Bioquímica.* España: Reverté S. A.; 1990. p. 927-954.

Tan TC, Devendra K, Tan LK, Tan HK. Tocolytic treatment for the management of preterm labour: a systematic review. *Singapore Med J.* 2006; 47(5):361-366.

Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: Implications for anticancer therapy. *The AAPS Journal.* 2005; 7(1):E14-E19.

Vasta V, Beavo J. Functions and pharmacological inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Cell transmissions*. 2004; 20(1):2-8.

Vause S, Johnston T. Management of preterm labour. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2000; 83:F79-F85.

Verli J, Klukovits A, Kormányos Z, Hajagos-Tóth J, Ducza E, Seres AB, Falkay G, Gáspár R. Uterus-relaxing effect of β_2 -agonists in combination with phosphodiesterase inhibitors: studies on pregnant rat *in vivo* and on pregnant human myometrium *in vitro*. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013; 39(1):31-39.

Villanueva LA, Contreras AK, Pichardo M, Rosales J. Perfil epidemiológico del parto prematuro. *Ginecol Obstet Mex*. 2008; 76(9):542-548.

Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*. 2003; 27(4):201-206.

Woodrum DA, Brophy CM. The paradox of smooth muscle physiology. *Mol Cell Endocrinol*. 2001; 177:135-143.

Word RA. Myosin phosphorylation and the control of myometrial contraction/relaxation. *Semin Perinatol*. 1995; 19(1):3-14.

Yousif FB, Triggle DJ. Inhibitory actions of a series of Ca^{2+} channel antagonists against agonist and K^+ depolarization induced responses in smooth muscle: an assessment of selectivity of action. *Can J Physiol Pharmacol*. 1986;64:273-283.

Yuan W, López-Bernal A. Cyclic AMP signaling pathways in the regulation of uterine relaxation. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2007; 7(Suppl 1):S10.

Zheng S, Kaur G, Wang H, Li M, Macnaughtan M, Yang X, Reid S, Prestegard J, Wang B, Ke H. Design, synthesis, and structure-activity relationship, molecular modeling, and NMR studies of a series of phenyl alkyl ketones as highly potent and selective phosphodiesterase-4 inhibitors. *J Med Chem.* 2008; 51(24):7673-7688.

Zhou XB, Arntz C, Kamm S, Motejlek K, Sausbier U, Wang GX, Ruth P, Korth M. A molecular switch for specific stimulation of the BK_{Ca} channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem.* 2001; 276(46):43239-43245.

Zhou XB, Lutz S, Steffens F, Korth M, Wieland. Oxytocin receptors differentially signal via G_q and G_i proteins in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes: implications for miometrial contractility. *Mol Endocrinol.* 2007; 21(3):740-752.

XII. GLOSARIO DE TÉRMINOS

1, 4, 5-Trisfosfato de Inositol (IP₃): Es un segundo mensajero que se produce junto con el diacilglicerol por hidrólisis catalizada mediante la fosfolipasa C del 4,5-difosfato de fosfatidilinositol (PIP₂). Su efecto en el entorno celular es la movilización del Ca²⁺, almacenado en orgánulos como el retículo endoplasmático.

Ácido araquidónico: Es un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-6, formado por una cadena de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces “cis” en las posiciones 5, 8, 11 y 14.

Actina: Proteína estructural del músculo que participa en los procesos de contracción y relajación.

Adenilato ciclasa: Enzima que forma parte de la cascada de señalización de la proteína G que transmite señales químicas desde el exterior de la célula a su interior a través de la membrana celular. Convierte trifosfato de adenosina (ATP) a 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc).

AMPc: Es un nucleótido que funciona como segundo mensajero en varios procesos biológicos. Es empleado en las rutas de transducción de la señal en las células como respuesta a un estímulo externo o interno. Suele estar relacionado con la activación de cinasas.

Calcio: Se encuentra en el medio interno de los organismos como ion calcio (Ca²⁺) o formando parte de otras moléculas, actúa como mediador intracelular cumpliendo una función de segundo mensajero; por ejemplo, el ion Ca²⁺ interviene en la contracción de los músculos.

Calmodulina: Es una proteína intracelular, reguladora en la transducción de la señal de calcio en la célula. Actúa como receptor para Ca²⁺, gracias a que presenta cuatro sitios de unión al ion Ca²⁺ con una alta afinidad, pero siempre de forma reversible.

Canales de calcio: Son canales iónicos (estructuras macromoleculares) proteínas transmembranales, provistas de un poro y situadas en la membrana plasmática de las células) que permiten la entrada de iones Ca^{2+} al citosol y por tanto, hacen que aumente la concentración intracelular de este ion, produciendo una despolarización, lo que constituye una señal para la activación de muchas funciones celulares.

CI₅₀: Es la concentración o proporción de una sustancia en un medio que origina la inhibición del 50 % una respuesta determinada.

Ciclooxigenasa: Enzima que produce prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Es inhibida por los antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

Cinasa: Enzima que activa o desactiva a otras proteínas, mediante la fosforilación.

Cinasa de la cadena ligera de miosina: Es una cinasa de proteína en el residuo serina/treonina, específico y dependiente del complejo calcio/calmodulina, está implicada en la contracción del músculo liso mediante la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina.

Citocinas: Son proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunitaria específica.

Diacilglicerol: Es una molécula del espacio intracelular que actúa como mediador de comunicación celular y opera como segundo mensajero. Se produce por hidrólisis catalizada mediante la fosfolipasa C del 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂).

Dimetilsulfóxido (DMSO): Es un líquido orgánico sin color que contiene sulfóxido, usado como disolvente orgánico. Por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares el DMSO sirve también como acarreador de drogas o fármacos.

Enzima: Moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas, generando reacciones termodinámicas. Estas enzimas actúan sobre moléculas denominadas sustrato convirtiéndose dichas moléculas en productos.

Fosfatasa de la cadena ligera de miosina: Enzima del grupo de las esterasas que cataliza la eliminación del grupo fosfato de la miosina.

Fosfodiesterasas: Son enzimas hidrolasas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster, como por ejemplo, los que se establecen en los ácidos nucleicos entre la pentosa de un nucleótido y el grupo fosfato de otro.

Fosfolipasa-C: Es una familia de enzimas intracelulares y de membrana en organismos eucariotas que participa en los procesos de transducción de señales. Participa en el metabolismo de los fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) y las vías de calcio-dependientes de la señalización celular relacionadas con lípidos.

Fosforilación: Proceso metabólico que consiste en la introducción de un grupo fosfato en una molécula orgánica.

GMPc: Es un derivado cíclico del nucleótido trifosfato GTP, generado por mediación de la enzima guanilato ciclasa también conocida como guanililciclasa e implicado como segundo mensajero en las rutas de transducción de señales celulares.

HeLa: Son un tipo particular de células de cultivo celular, usadas en investigación científica. Es el linaje celular humano que deriva de una muestra de cáncer cérvico-uterino.

Hormonas: Son sustancias secretadas por células especializadas, localizadas en glándulas de secreción interna o glándulas endócrinas (carentes de conductos), o también por células epiteliales e intersticiales cuyo fin es el de influir en la función de otras células.

Inhibidor enzimático: Son moléculas que se unen a las enzimas y disminuyen su actividad. Existen inhibidores enzimáticos irreversibles y reversibles, los irreversibles se unen en forma covalente a la enzima y modifican su conformación estructural, mientras que los inhibidores enzimáticos reversibles se unen a la enzima mediante un enlace no covalente.

Inmunocitoquímica: Es una técnica para la localización de moléculas en las células mediante el empleo de anticuerpos.

Inmunomodulador: Sustancia que modifica (puede aumentar o disminuir) la capacidad del sistema inmune de ejercer una o más de sus funciones, como la producción de anticuerpos, el reconocimiento antigénico, o la secreción de mediadores inflamatorios.

Interferón: Proteína de bajo peso molecular producida por células de los animales vertebrados, que, al entrar en contacto con un virus, actúa impidiendo la entrada y la proliferación de cualquier otro virus.

Interleucinas: Son un conjunto de citocinas que son sintetizadas principalmente por los leucocitos. Su principal función es regular los eventos que atañen a las funciones de estas poblaciones de células del sistema inmunitario, como la activación, diferenciación o proliferación, la secreción de anticuerpos, la regulación de otras citocinas y factores, entre otras. Se conocen en la actualidad no menos de 33 interleucinas, las cuales difieren entre sí tanto desde el punto de vista químico como del biológico. Mientras algunas de ellas (IL-4, IL-10, IL-11) presentan esencialmente efectos favorables, otras (IL-1, IL-6, IL-8), paralelamente a su función defensiva, pueden también ser deletéreas para el organismo.

Metaloproteasas: Es una enzima que genera proteólisis (proteasas), y que en su funcionamiento es necesaria la presencia de metales como átomos de zinc o cobalto.

Mieloperoxidasa: Es la proteína más abundante en los neutrófilos y es la única peroxidasa que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso.

Miometrio o miocito uterino: Es la capa muscular intermedia, entre la serosa peritoneal y la mucosa glandular, que constituye el grueso del espesor de la pared del cuerpo uterino.

Miosina: Proteína fibrosa implicada en la contracción muscular, por interacción con la actina. La miosina está compuesta de 2 cadenas pesadas idénticas y 4 cadenas livianas. La molécula tiene una región globular de doble cabeza unida a una larga cadena helicoidal de doble hebra. Cada cabeza se une a dos diferentes cadenas ligeras.

NF- κ B: Es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN y se encuentra en la mayoría de tipos de células animales y está implicada en las respuestas celulares frente a estímulos como el estrés. Regula la respuesta inmunitaria y el proceso inflamatorio mediante su unión a regiones promotoras reguladoras del ADN permitiendo la expresión de ciertos genes o inhibiendo a los mismos.

Nucleótido: Compuesto químico orgánico fundamental de los ácidos nucleicos, constituido por una base nitrogenada, un azúcar y una molécula de ácido fosfórico.

Nucleótido cíclico: El ácido fosfórico es capaz de formar ésteres con una misma molécula de Ribosa en las posiciones 3' y 5'. Los nucleótidos así formados reciben el nombre de nucleótidos cíclicos, como el AMPc o el GMPc. La función fisiológica de estos nucleótidos es la de servir de segundos mensajeros celulares.

Oxitocina: Hormona de naturaleza peptídica, secretada por la hipófisis encargada de producir las contracciones uterinas durante el parto así como controlar distintos patrones sexuales, conducta materna y facilita la lactancia.

Proteínas-G: Son transductores de señales que llevan información desde el receptor hasta una o más proteínas efectoras. Estas proteínas se encuentran activadas cuando poseen GTP en su estructura, e inactivadas cuando se trata de GDP. Se clasifican en dos tipos,

heterotriméricas (constituidas por tres subunidades distintas, denominadas $\alpha\beta\gamma$) y monoméricas con una única subunidad.

PKA: Es una holoenzima tetramérica que consiste en dos unidades catalizadoras, y dos unidades reguladoras. El AMPc se une a lugares específicos en las unidades reguladoras de la proteína quinasa, y causa la disociación entre las subunidades reguladoras y catalizadoras, activando así las unidades catalizadoras y permitiéndoles que fosforilen los sustratos de las proteínas.

Prostaglandinas: Sustancias endógenas de naturaleza lipídica, derivados de ácidos grasos de 20 carbonos. Las prostaglandinas tienen efectos diversos y participan en el sistema nervioso, reproductor así como otros tipos de músculo liso. Juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea, coagulación, respuestas inflamatorias y etc.

Quimiotaxis: Es un tipo de fenómeno en el cual las bacterias y otras células de organismos uni o pluricelulares dirigen sus movimientos de acuerdo con la concentración de ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.

Repolarización: Es el proceso por el cual la membrana celular regresar a su nivel electroquímico normal llegando a su estado de reposo.

Rho-cinasa: Cinasa específica de la proteína enzimática Rho.

$R_{m\acute{a}x}$: es la concentración o proporción necesaria para alcanzar el mayor efecto de una sustancia dada.

Segundo mensajero: Es toda molécula que traduce señales extracelulares corriendo abajo en la célula hasta inducir un cambio fisiológico en un efector. Alterando las concentraciones de diversos sustancia en la célula.

TNF- α : Es una proteína de grupo de la citocinas liberada por células del sistema inmunitario que intervienen en la inflamación favorecen la expresión de otras citosinas y factores uterotónicos.

Ubiquitina: Es una pequeña proteína reguladora que ha sido encontrada en la mayoría de los tejidos de los organismos eucariotas. Una de sus muchas funciones es dirigir el reciclaje de proteínas.

Uterotónicos: Son agentes que generan o desencadenan las contracciones del músculo liso uterino (por ejemplo oxitocina, prostaglandina F 2α).

XII. ANEXO 1

