



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**Estudio del efecto de dos análogos de talidomida
4AFDPMe Y 4NO₂FDPMe sobre la contracción
tónica-sostenida del útero aislado de rata.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
PRESENTA:

YUDH MANZUR LASES.

DIRECTOR:

DR. TOMÁS EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ.

CO-DIRECTOR:

DR. HÉCTOR ANTONIO PONCE MONTER.

Pachuca Hgo. Diciembre, 2014

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología del Centro de Investigación en Biología de la Reproducción (CIBIOR), del Área Académica de Medicina del Instituto de Ciencias de la Salud, UAEH, bajo la dirección del Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez y del Dr. Héctor Antonio Ponce Monter. Para su realización se contó con recursos financieros del proyecto “Efecto de dos análogos de talidomida sobre: la contracción uterina, la conducta sexual, el parto prematuro y la inflamación en la rata”, Red-PROMEPA 2012-2013: Farmacología de la reproducción.

AGRADECIMIENTOS.

Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez, le agradezco de manera muy especial y sincera su gran apoyo, la motivación para culminar este trabajo, pero sobre todo por su nobleza, sus consejos, comprensión y su entrega en mi aprendizaje.

Dr. Héctor Antonio Ponce Monter, mis más sinceros agradecimientos por su apoyo, paciencia, pero sobre todo, por su confianza y por ser una de las personas que me ha orientado y guiado.

Dr. Luis Enrique Soria Jasso, por el apoyo, los consejos a lo largo de mi formación profesional y su aporte para el enriquecimiento y culminación de este trabajo.

Quim. Blanca Estela Pérez Escandón, por las facilidades mostradas para la conclusión y enriquecimiento de este trabajo.

Biól. María del Carmen González Rodríguez, por su nobleza y cariño mostrado durante mi formación profesional y particularmente por todo el tiempo que me ha brindado.

M. en C. Mario Segura Almaraz, por formarme a lo largo de mis estudios, por permitirme conocer una persona respetable y sincera, así como por la contribución en el mejoramiento de mi tesis.

M. en C. Othón Enrique Straffon Muris, por el tiempo dedicado para la revisión y las facilidades mostradas para la culminación de este trabajo. .

A mi novia Karina Ordóñez Vázquez y cada uno de mis amigos, compañeros y catedráticos que fueron parte importante en mi formación personal y profesional.

DEDICATORIAS.

A mi padre Miguel Ángel, que le hubiera encantado compartir este día conmigo y el cual dedico toda su vida a cuidarme, protegerme y formarme como persona. Le dedico de manera muy especial este trabajo.

A mi querida madre Mercedes, que ha luchado de manera incansable por darme todo lo necesario y por su cariño incondicional, por ser la razón de mi vida y por toda la alegría y la felicidad que me ha brindado.

A mi hermano Miguel, que me ha aconsejado y me ha enseñado a enfrentar cada reto de la vida, por ser la persona que guía mis pasos y por todo su apoyo.

A mi novia Karina Ordóñez Vázquez, por ser la razón de mi vida, por hacerme la persona más feliz del mundo, por su cariño, por su nobleza y particularmente por ser la mujer que me ha inspirado durante todos estos años, te dedico este trabajo porque eres la persona que tiene todo mi amor. ¡Te amo mucho!.

Al Dr. Eduardo y al Dr. Héctor, porque para mí han llegado a ser parte de mi familia, ganándose mi admiración, gratitud y estimación.

A cada uno de mis amigos, por ser parte de mi vida, por ser como mis hermanos, por las locuras, los buenos y los malos ratos.

ÍNDICE TEMÁTICO

	PÁGINA
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN.	5
1.1. PARTO PREMATURO Y SU EPIDEMIOLOGÍA.	
1.2. FISIOLÓGÍA DEL PARTO PREMATURO.	7
1.2.1 MÚSCULO LISO UTERINO.	
1.2.2. CICLO DE CONTRACCIÓN-RELAJACIÓN UTERINA.	8
1.2.2.1. FUENTES DE CALCIO EN EL ÚTERO	10
1.2.2.2. RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO UTERINO INDUCIDA POR EL AMPc.	11
1.3. TOCOLÍTICOS: FÁRMACOS RELAJANTES DEL ÚTERO.	14
1.3.1. TOCOLÍTICOS NOVEDOSOS: INHIBIDORES DE PDE4.	17
1.4. ANÁLOGOS DE TALIDOMIDA Y SUS APLICACIONES.	18
2. JUSTIFICACIÓN.	21
3. HIPÓTESIS.	22
4. OBJETIVOS.	
4.1. OBJETIVO GENERAL	
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	
5. MATERIAL Y MÉTODOS	23
5.1. MODELO I	24
5.2. MODELO II	26
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.	27
6. RESULTADOS.	28
6.1. EFECTO DEL 4AFDPME, EL 4NO ₂ FDPME Y LA PAPAVERINA SOBRE LA CONTRACCIÓN TÓNICA SOSTENIDA INDUCIDA POR LA SOLUCIÓN DESPOLARIZANTE DE KCL (60 MM).	
6.2 EFECTO DEL 4AFDPME Y EL 4NO ₂ FDPME SOBRE LA CONTRACCIÓN TÓNICA-SOSTENIDA INDUCIDA POR CA ²⁺ 1 MM.	30
7. DISCUSIÓN	32
8. CONCLUSIONES	37
9. BIBLIOGRAFÍA.	38
10. GLOSARIO	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1.	7
FIGURA 2.	9
FIGURA 3.	10
FIGURA 4.	12
FIGURA 5.	13
FIGURA 6.	14
FIGURA 7.	15
FIGURA 8.	20
FIGURA 9.	29
FIGURA 10.	29
FIGURA 11.	31
FIGURA 12.	31
FIGURA 13.	34

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
TABLA 1.	16
TABLA 2.	30
TABLA 3.	32

ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Calcio intracelular
4AFDPMe	3-(4-aminoftalimido)-3-(3, 4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo
4NO ₂ FDPMe	3-(4-nitroftalimido)-3-(3, 4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo
AC	Adenilato ciclase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
ATOSB	Atosiban
Ca ²⁺	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
CH ₃ O	Metoxi
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria-50
CO ₂	Dióxido de Carbono
COX	Ciclooxigenasa
VOC	Canales de calcio operados por el voltaje
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EG	Edad gestacional
EtOH	Etanol
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina

FDA	Food and Drug Administration
PLC	Fosfolipasa C
GMPc	3',5'-monofosfato cíclico de guanosina
GTP	5'-trifosfato de guanosina
IP ₂	4,5-Difosfato de fosfatidilinositol
IP ₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IMiDs	Fármacos inmunomoduladores
INF-γ	Interferón-γ
KCl	Cloruro de potasio
L	Lavado
Mg ²⁺	Magnesio
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
N	Número de muestras
Na ⁺	Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
NF-κB	Factor de transcripción nuclear-κB
NH ₂	Amino
NIF	Nifedipina
NO	Óxido nítrico

NO ₂	Nitro
NOS	Sintasa del óxido nítrico
NTG	Trinitrato de glicerina
O ₂	Oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPC	Obstrucción pulmonar crónica
OT	Oxitocina
PKA	Cinasa de proteína dependiente de AMPc
PDE4	Fofodiesterasa-4
PG's	Prostaglandinas (sustancias uterotónicas)
PGF _{2α}	Prostaglandina-F _{2α}
GPCR	Proteínas-G
RIT	Clorhidrato de ritrodina
R _{máx}	Respuesta máxima
RS	Retículo sarcoplásmico
rβ ₂	Receptores β ₂ aderenérgicos
s.c.	Subcutánea
SD	Solución despolarizante
SDR	Síndrome de dificultad respiratoria
SeICiDs	Inhibidores selectivos de las citocinas
SRN	Solución Ringer Normal
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
\bar{X}	Promedio

RESUMEN

El parto prematuro es el nacimiento antes de la semana 37 de gestación o cuando el neonato pesa ≤ 500 g. La labor prematura es una de las causas mayores de fallecimientos en los recién nacidos. Ya que anualmente de 13-15 millones de nacimientos en el mundo son prematuros y más de 1 millón fallecen por complicaciones diversas asociadas al nacimiento temprano. En Latinoamérica la frecuencia de los nacimiento prematuros es del 10 %, mientras que en México es del 5-10 %; la frecuencia de nacimientos pretérmino en los países latinoamericanos es menor que en los países desarrollados, sin embargo la tasa de sobrevivencia de neonatos <28 semanas es 90:10 % para países desarrollados y en vías de desarrollo respectivamente. Para el tratamiento del parto prematuro se utilizan fármacos tocolíticos que inhiben las contracciones uterinas, tales como el sulfato magnesio, los betamiméticos, las progestinas, los antagonistas de los receptores a oxitocina, inhibidores de las ciclooxigenasa, los donadores de óxido nítrico y los bloqueadores del canal de calcio; sin embargo, éstos producen varios efectos adversos y en ocasiones son poco efectivos.

Por lo anterior, es necesario desarrollar fármacos tocolíticos nuevos que sean más seguros y que produzcan menos efectos adversos a la madre y al producto. Una alternativa novedosa son los inhibidores de la enzima fosfodiesterasa-4 (PDE4, por sus siglas en ingles) que desactiva por hidrólisis al segundo mensajero 3',5'- monofosfato cíclico de adenosina (por sus siglas en ingles AMPc), que regula el acoplamiento contracción/relajación del músculo liso uterino. Existen evidencias en la literatura que indican que la PDE4 se halla en el útero de rata y el humano, por lo que la inhibición de ésta incrementa los niveles de AMPc e inducen, la relajación del músculo liso uterino; además, tal mecanismo de acción promueve la inmunomodulación y efectos antiinflamatorios.

En el laboratorio donde se llevó a cabo esta tesis se sintetizaron dos análogos de talidomida, no comerciales, que son inhibidores de la PDE4 e inmunomoduladores; en estudios preliminares esos dos análogos, el 4AFDPMe y el 4NO₂FDPMe, relajaron rápidamente al músculo liso uterino, por lo que el objetivo de este trabajo fue investigar si los dos análogos de la talidomida inhiben las contracciones tónicas, inducidas por la despolarización del útero aislado de rata, así como también, si este efecto rápido está relacionado con el bloqueo de los canales de calcio en las células miometriales. El 4AFDPMe y el 4NO₂FDPMe inhibieron rápidamente en forma dependiente de la concentración las contracciones tónicas inducidas por el estímulo electromecánico de KCl 60 mM en útero aislado de rata, de acuerdo con los resultados este efecto puede ser debido al bloqueo de los canales de calcio.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Parto prematuro y su epidemiología.

Uno de los problemas de la salud reproductiva de la reproducción, resulta ser el parto prematuro que ocurre antes de la semana 37 de gestación (Yuan *et al.*, 2007; Kinney *et al.*, 2012). En este caso, la mujer embarazada presenta contracciones uterinas prematuras que adelantan el parto, en estas condiciones, la inhibición de las contracciones uterinas es necesaria para dar tiempo de transportar a la paciente a un centro especializado de perinatología, donde un especialista atiende el parto prematuro, así como a la madre y al producto prematuro, evitando los daños posibles que puedan sufrir ambos (Tan *et al.*, 2006).

Estudios epidemiológicos han mostrado que el parto prematuro es la causa más importante de morbilidad y mortalidad perinatal, 13 a 15 millones de bebés nacen prematuramente cada año en el mundo (Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group, 2001) y más de 1 millón de ellos fallecen por complicaciones derivadas de su nacimiento. Cerca del 75% de los bebés prematuros que mueren podría sobrevivir sin una atención costosa, si estuvieran disponibles en todo el mundo una serie de tratamientos simples, comprobados y económicos, así como medidas preventivas. (Kinney *et al.*, 2012)

Los nacimientos prematuros representan el 11.1 % de todos lo que acontecen en el mundo, de los que el 60% ocurren en el sur de Asia y en el África subsahariana, donde se concentran los once países con un índice mayor al 15 %. Sin embargo, el problema de los nacimientos prematuros no afecta simplemente a los más pobres y entre los diez países con mayor número de esos nacimientos están incluso Estados Unidos y economías emergentes como Brasil. Mientras que los países latinoamericanos se sitúan por debajo del 10 % en nacimientos prematuros (Kinney *et al.*, 2012) como por ejemplo en México que es del 5-10 % (Guillen *et al.*, 2005). Esa cifra elevada se traduce en que actualmente uno de cada diez bebés llega al mundo con 37 o menos semanas de gestación (Kinney *et al.*, 2012). Los nacimientos prematuros son los responsables de casi la mitad de muertes entre recién nacidos en todo el mundo (bebés en las primeras 4 semanas de vida) y ahora son la segunda causa de mortalidad entre los menores de 5 años sólo por detrás de la neumonía (Kinney *et al.*, 2012).

La morbilidad neonatal de los prematuros es de magnitud variable, dependiendo principalmente del peso de nacimiento y de la edad gestacional al nacer, así como de las intervenciones terapéuticas realizadas (Wex *et al.*, 2009). Las complicaciones más frecuentes son: depresión al nacer, síndrome de dificultad respiratoria, hemorragia intracraneana, sepsis, trastornos metabólicos, enterocolitis necrotizante, ductus arterioso persistente, displasia broncopulmonar, apneas y fibroplasia retrolental. Adicionalmente, pueden presentar morbilidad neurológica a largo plazo, tales como anomalías de las funciones cognitivas y parálisis cerebral (Crowther *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2003; Schmitz *et al.*, 2007; Luu *et al.*, 2009).

En los países desarrollados el aumento del número de nacimientos prematuros se debe al número mayor de mujeres de edad avanzada que dan a luz, a un aumento del uso de tratamientos de fertilidad y como resultado de embarazos múltiples. En los países con tasas más bajas, las causas principales de los alumbramientos prematuros son las infecciones intrauterinas, la malaria, el VIH-sida y los índices altos de embarazos entre adolescentes. (Kinney *et al.*, 2012). Existe una dramática brecha de supervivencia para los bebés prematuros dependiendo de dónde nacen, por ejemplo, más del 90% de los bebés extremadamente prematuros (<28 semanas) nacidos en países de bajos ingresos mueren dentro de los primeros días de vida; sin embargo, menos del 10% de los bebés en la misma edad gestacional mueren en sitios de altos ingresos, una brecha de supervivencia de 10:90. La mayoría de países latinoamericanos se sitúa por debajo del 10% (Kinney *et al.*, 2012).

Otras causas del parto prematuro son el alcoholismo, la drogadicción y, como se ha mencionado las infecciones intrauterinas (Vause y Johnston, 2006). Uno de los factores más frecuentes del parto prematuro son las infecciones intrauterinas que promueven la liberación de mediadores proinflamatorios y uterotónicos (Dudley, 1997; Méhats *et al.*, 2004).

1.2. Fisiología del parto prematuro.

1.2.1 Músculo liso uterino.

El músculo liso uterino se clasifica como unitario o fásico, está formado por células fusiformes y uninucleadas, que carecen de estriaciones transversales, aunque muestran ligeramente estrías longitudinales y se localiza en el sistema reproductor. El músculo liso uterino se contrae en forma espontánea por la actividad miogénica generada por las células marcapasos y también puede contraerse por la acción de agentes uterotónicos (oxitocina, prostagladina $F_{2\alpha}$, endotelina, angiotensina II, etc.). Las células marcapaso generan potenciales de acción que se propagan través de las uniones estrechas de un miocito a otro, ver Fig. 1 (Stein y Driska, 1984; Beyer, 1993; Riemer y Heymann, 1998; Döring *et al.*, 2006; Taggart *et al.*, 2008; Fetalvero *et al.*, 2008).

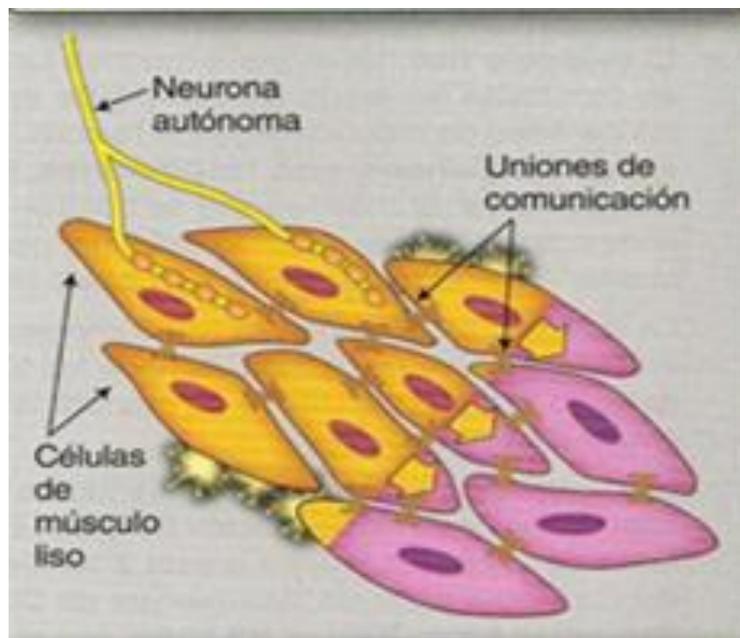


Figura 1. Uniones comunicantes entre las células del músculo liso uterino que permiten distribuir el potencial de acción generado por las células marcapaso (tomada de Preston y Wilson, 2013).

1.2.2. Ciclo de contracción-relajación uterina.

La función del músculo liso uterino es regulada por los acoplamiento electromecánico y farmacomecánico. La contracción inducida por el acoplamiento electromecánico *in vitro* consiste, en la despolarización de la membrana, con soluciones de cloruro de potasio (KCl) alto (30, 40 y 60 mM) lo que induce la apertura de los canales de calcio (Ca^{2+}) operados o dependientes de voltaje (VOC, por sus siglas en inglés), el aumento del calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la consecuente contracción (Granger *et al.*, 1986; Aaronson *et al.*, 2006).

En el caso del acoplamiento farmacomecánico la contracción puede ser inducida por varios agonistas (neurotransmisores, hormonas, péptidos, etc.) los que activan a receptores membranales específicos acoplados a proteínas-G (GPCR, por sus siglas en inglés) para inducir la contracción uterina (Huey-Chuan *et al.*, 2009). Por ejemplo, el agente útero-tónico oxitocina (OT), prostaglandina activan GPCR (Coleman *et al.*, 1994; Al-Matubsi *et al.*, 2001) y genera los segundos mensajeros 1, 4, 5-trisfosfato inositol (IP_3 , por sus siglas en inglés) y diacilglicerol (DAG), liberando Ca^{2+} del retículo endoplásmico y activando las vías de entrada de calcio operadas por el receptor, de esta manera aumenta la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e induce la contracción. Tanto en la contracción inducida por el acoplamiento electromecánico como por el farmacomecánico, la relajación uterina se produce cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuye y el complejo calcio-calmodulina se disocia así como también el complejo actinmiosínico (Somlyo y Somlyo, 1994).

Existe otra vía para la contracción uterina, esta vía, depende de unas proteínas de bajo peso molecular y acopladas a 5`-trifosfato de guanosina (GTP, por sus siglas en inglés), dichas proteínas son: RhoA y Rac-1, subfamilia de las Ras, las cuales regulan los filamentos de actina no muscular, estas proteínas activan a la cinasa Rho que media a la activación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP, por sus siglas en inglés), inhibiendo a la subunidad que causa la regulación a la baja de la fosfatasa, aumentando la actividad de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK, por sus siglas en inglés) e incrementando la contracción. Se ha visto tanto en útero humano embarazado y en útero de rata embarazado, estimulados con KCl y OT, que se incrementa la traslocación de RhoA del sarcómero al citoesqueleto, sugiriendo que la

vía de señalización de RhoA aumentó las contracciones a término (Riemer y Heymann, 1998) (Figura 2).

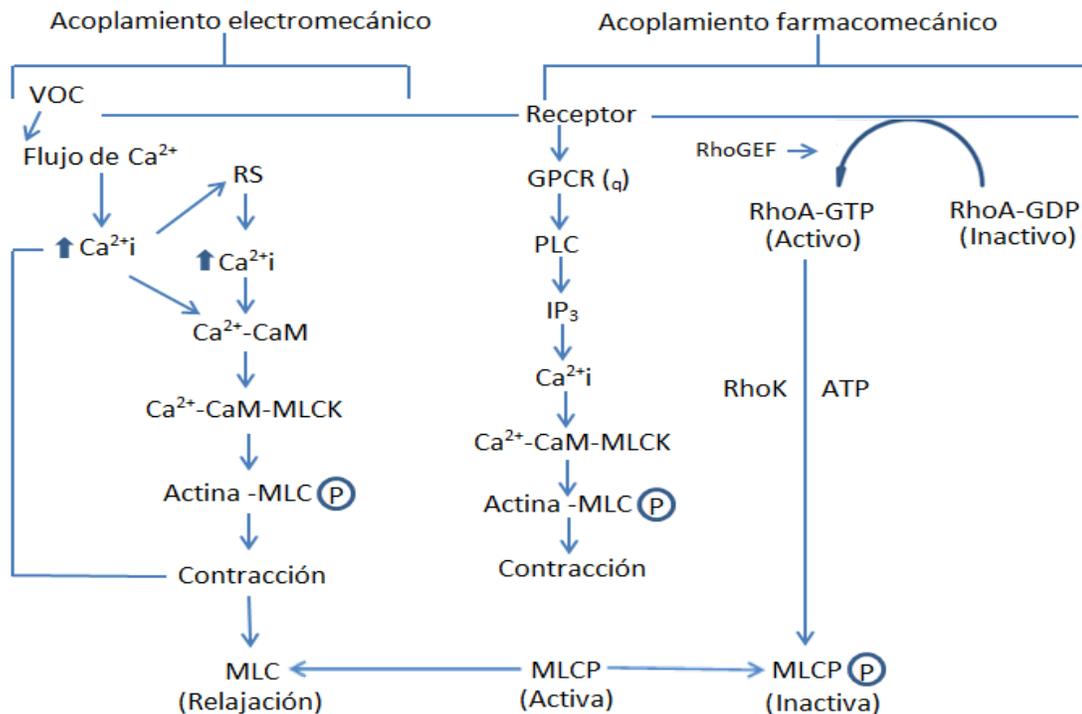


Figura 2. Vía electromecánica y farmacomecánica del acoplamiento excitación-contracción.

El estímulo electromecánico de 60 mM de KCl despolariza la membrana y abre VOC. Estos canales de calcio permiten el incremento de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ que genera liberación Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS). El calcio se une con la proteína calmodulina (Ca^{2+} -CaM) activando a la MLCK que fosforila a la cadena ligera miosina (por sus siglas en inglés MLC). Al estar fosforilada la MLC se une a la actina, formando el complejo actinomiosínico y produciendo la contracción uterina. En el caso del estímulo farmacomecánico abre los canales de calcio operados por el receptor e incrementa el $[Ca^{2+}]_i$, un agonista se une con su receptor membranal que está acoplado a una GPCR(α) la subunidad α de la proteína activa a la fosfolipasa-C (PLC, por sus siglas en inglés) que toma fosfolípidos de membrana y los convierte en dos segundos mensajeros 1-4-5 trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 se une a su receptor en el RS y genera la liberación de calcio, el suministro de calcio extracelular y calcio del RS siguen la misma vía que la del estímulo electromecánico. Sin embargo, las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ en las células miométriales es transitoria, y la respuesta contráctil es mantenida por un mecanismo de sensibilización de calcio provocada por la inhibición de la fosfatasa de la miosina por la Rho cinasa (RhoK, por sus siglas en inglés). El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ activa a la proteína cianasa C (PKC, por sus siglas en inglés), e implica la activación de la proteína de unión al GTP (RhoA). La naturaleza precisa de la activación de RhoA por GPCR aún no es clara pero involucran el factor intercambiador del nucleótido guanosina (RhoGEF, por sus siglas en inglés) y la migración de RhoA a la membrana plasmática. El incremento de RhoA activa la RhoK, que fosforila a la fosfatasa inactivándola. Esto promueve el estado de contracción, evitando que la MLC se desfosfore (modificada de Somlyo y Somlyo, 1994).

La actividad contráctil espontánea e inducida del músculo liso uterino, el músculo liso uterino aislado de rata presenta contracciones tónicas-sostenidas cuando se le estimula con una solución isotónica despolarizante de KCl 60 mM, estas contracciones son dependientes del calcio extracelular (Fig. 3) (Somlyo y Somlyo, 1994; Aaronson *et al.*, 2006) y son inhibidas por los bloqueadores de los VOC, como la nifedipina o el verapamilo (Conde-Agudelo *et al.*, 2012; Nikbakht *et al.*, 2014).

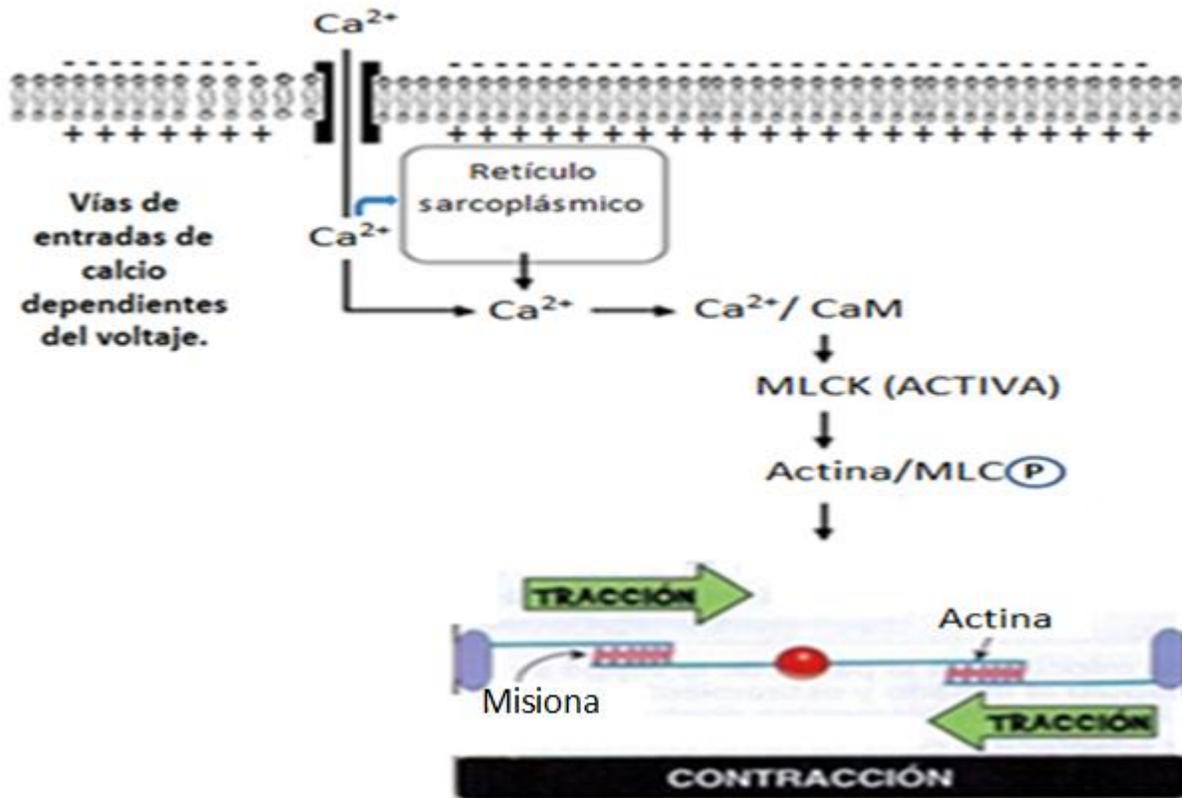


Figura 3. El estímulo electromecánico inducido por KCl 60 mM despolariza la membrana abriendo las vías de entrada de calcio dependientes del voltaje; el incremento del calcio intracelular induce la contracción tónica-sostenida (modificada de Webb, 2003).

1.2.2.1. Fuentes de calcio en el útero

Existen tres mecanismos para el incremento de $[Ca^{2+}]_i$: a) a través de los VOC, b) canales de Ca^{2+} operados por receptor y c) liberación de Ca^{2+} del RS inducido por IP_3 . En la primera vía, la despolarización de la membrana del miocito del músculo liso uterino provoca la apertura de los canales de calcio sensible al voltaje y, por consiguiente, el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en el útero (Bootman y Berridge, 1995) la segunda vía es activada por los agonistas uterotónicos, como la prostaglandina- $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), OT, endotelina-1, angiotensina-2 entre otras (Lynn *et al.*, 1995). La $PGF_{2\alpha}$,

también es de naturaleza endógena y juega un papel protagónico durante el parto. Aunque se sabe, que los niveles de OT no varían durante toda la etapa de embarazo, ni en la fase final de éste, se ha visto que la presencia de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sensibiliza al útero ante el estímulo de OT, esto se debe a que existe un incremento la densidad de receptores, por lo que es importante controlar la expresión de estos dos agentes endógenos. Cuando se unen a su receptor lo activan produciendo dos respuestas fisiológicas: la apertura de los canales de calcio operados por el receptor y la activación de la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés) que induce la hidrólisis del 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (IP_2 , por sus siglas en inglés) produciendo dos segundos mensajeros: el DAG y IP_3 , este último al unirse a su receptor en el RS produce la liberación de Ca^{2+} (Riemer *et al.*, 1986).

La relajación del músculo uterino se produce por la activación de la adenilato ciclasa (AC), como ocurre con los receptores β_2 -adrenérgicos estimulados con agentes útero-relajantes inhibición de estímulos contráctiles, inactivando al receptor o bloqueando la activación de las GPCR o incrementando la concentración de AMPc, ya que éste produce la relajación miometrial a través de la activación de proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA, por sus siglas en inglés) la cual activa por fosforilación una fosfatasa que desfosforila e inhibe a la MLCK. Además, bloquea el estímulo de los receptores acoplados a la PLC reduciendo la afinidad del Ca^{2+} por la calmodulina y produciendo una disminución en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bootman y Berridge, 1995; Riemer y Heymann, 1998; Webb RC, 2003; Franova *et al.*, 2008).

1.2.2.2. Relajación del músculo liso uterino inducida por el AMPc.

Las etapas que conllevan a la relajación de músculo uterino, comienzan con la extracción del calcio intracelular y la repolarización de la membrana celular. La disminución de la concentración del calcio intracelular induce la relajación muscular; en este proceso están involucradas las ATPasas de Ca^{2+} - Mg^{2+} tanto la de la membrana plasmática como la de la membrana del RS y también el intercambiador Na/Ca^{2+} principalmente (Fig. 4).

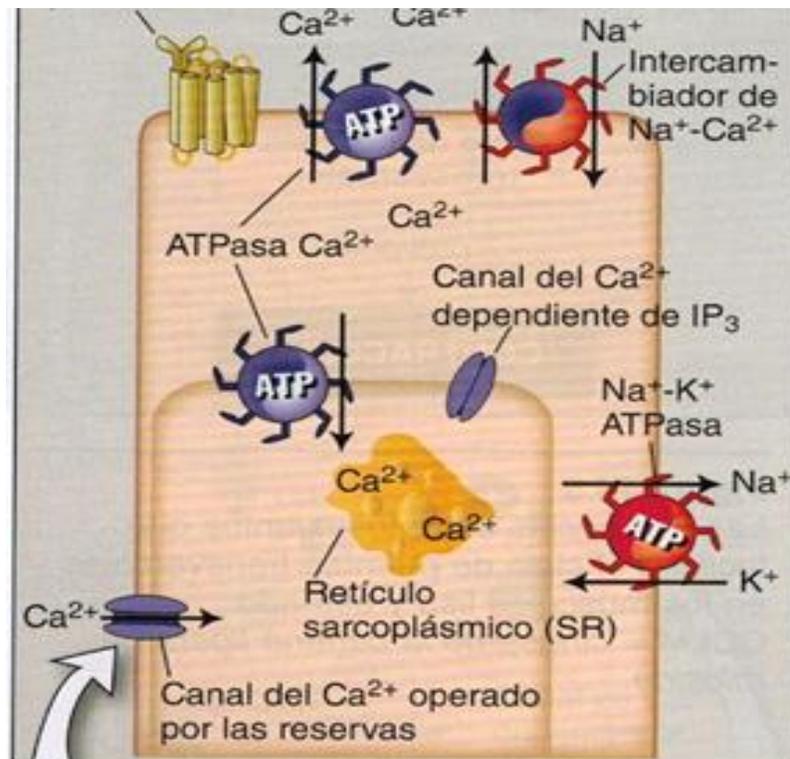


Figura 4. Ilustra el manejo de calcio durante la relajación del músculo uterino. Los transportadores superficiales de la membrana extraen calcio del interior del miocito, estos son: el intercambiador Na/Ca²⁺, ATPasa Mg²⁺/Ca²⁺ membranal y del retículo sarcoplásmico (tomada de Preston y Wilson, 2013).

Durante la repolarización celular, el cambio eléctrico favorece que la parte externa de la célula se cargue positivamente y se produzca el cierre de los canales de calcio dependientes del voltaje, lo que reduce la concentración de calcio intracelular disponible (Somlyo y Somlyo, 1994; Preston *et al.*, 2013); algunos fármacos como los bloqueadores de canales de calcio, se han utilizado en la clínica para el tratamiento de la labor prematura. Las fases subsecuentes son el rompimiento del complejo actinmiosínico por parte de la MLCP que es activada con la fosforilación por la PKA (Figura 5).

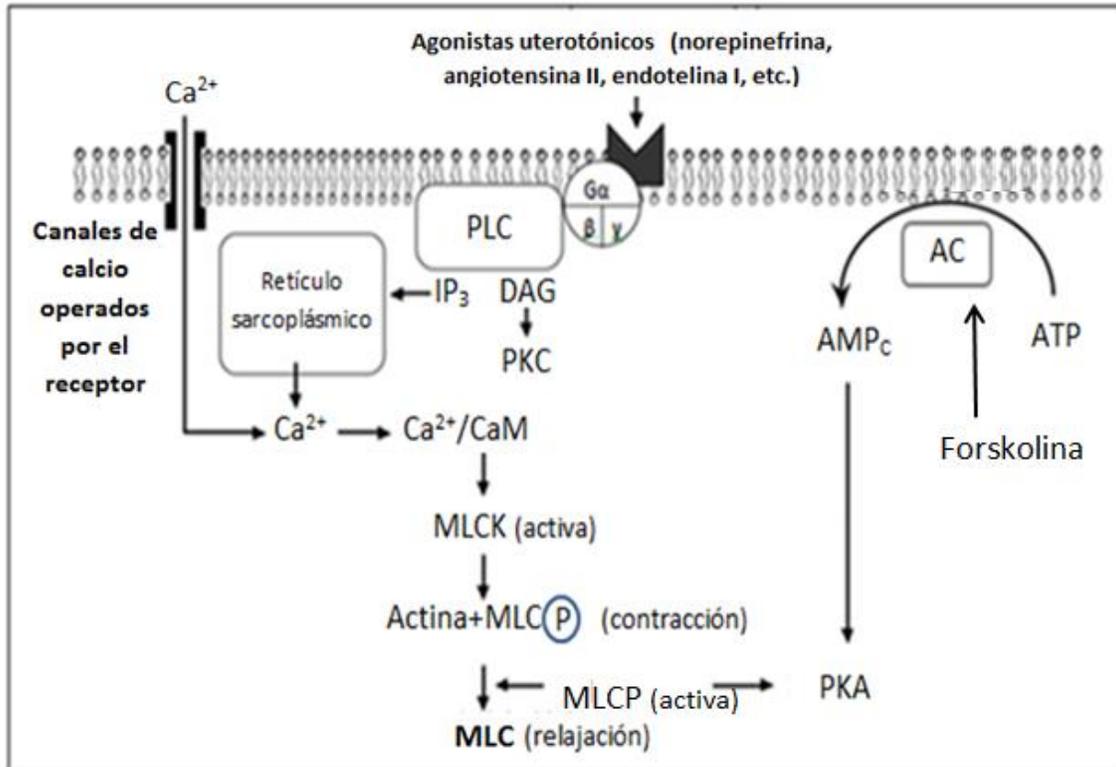


Figura 5. Ilustra el mecanismo fisiológico de la contracción y relajación en músculo liso uterino.

El esquema siguiente explica el proceso de la contracción generado por tres de los agonistas útero-tónicos (noradrenalina, angiotensina II y endotelina I), así mismo ejemplifica el uso de un fármaco activador de adenilato ciclasa (forskolina) que conlleva a la formación de AMPc mediante la hidrólisis de ATP, causando el desacoplamiento del complejo actino-miosínico y por tanto la relajación uterina. Imagen modificada de Web RC, 2003

Como ya se ha visto el AMPc es de suma importancia para la generación de la relajación uterina, éste es producido por la AC (ver página 11) y es inactivado por la hidrólisis de su ciclo intramolecular por medio de las PDE's, en particular la PDE4 que es muy selectiva para desactivar al AMPc (Figura 6). De hecho, existen fármacos tocolíticos que bloquean las contracciones uterinas mediante el incremento del AMPc como los β-miméticos y/o mediante la inactivación de las PDE's como lo hace el inhibidor no selectivo teofilina que es un fármaco utilizado para el tratamiento de la labor prematura (Mosler *et al.*, 1974; Berg *et al.*, 1983).

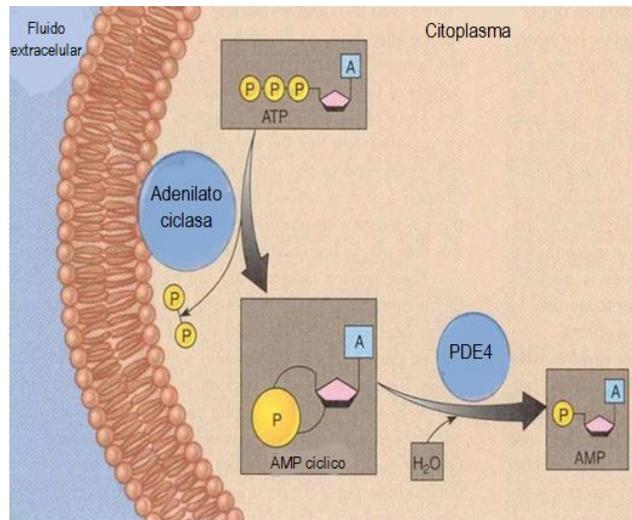


Figura 6. Ilustra la producción del AMPc por medio de la AC a partir de ATP y su hidrólisis a través de la PDE4 (tomada y modificada de internet en buscador Google-Chrome, 2013).

1.3. Tocolíticos: fármacos relajantes del útero.

La meta del uso de tocolíticos a corto plazo es inhibir las contracciones uterinas prematuras por un periodo aproximado de ± 48 h después de administrar el fármaco tocolítico para posteriormente administrar las hormonas esteroides para que se alcance el efecto máximo del mismos y el objetivo a largo plazo es continuar el embarazo hasta después de las 34 a 37 semanas, momento en el cual la morbilidad y mortalidad neonatal disminuye drásticamente (DeCherney y Nathan, 2002). Sin embargo, las dificultades para diagnosticar con precisión el parto prematuro complican la elección de agentes verdaderamente eficaces, y el diseño de los ensayos clínicos más preciso. Además, los agentes disponibles no tienen un grado de selectividad alto uterino y su uso se limita por sus efectos sobre el miocardio y el sistema vascular entre otros, incluyendo los efectos secundarios en el feto (Riemer y Heyman, 1998). La administración de corticosteroides permite la maduración pulmonar fetal, ésta se convirtió en estándar de atención en EUA para todas las mujeres con riesgo de parto prematuro entre las 24 y 34 semanas de edad gestacional estimada, ya que se demostró que esta medida reduce la morbilidad y mortalidad neonatal. (DeCherney y Nathan, 2002).

En la actualidad, existen fármacos denominados tocolíticos que tienen como finalidad inhibir las contracciones uterinas que se presentan en forma prematura (Dudley *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2006). Sin embargo, estos fármacos tocolíticos producen varios efectos adversos tanto a la madre como al neonato. Por esta razón, es necesario desarrollar nuevos fármacos tocolíticos más seguros y eficaces (figura 7 y tabla 1).

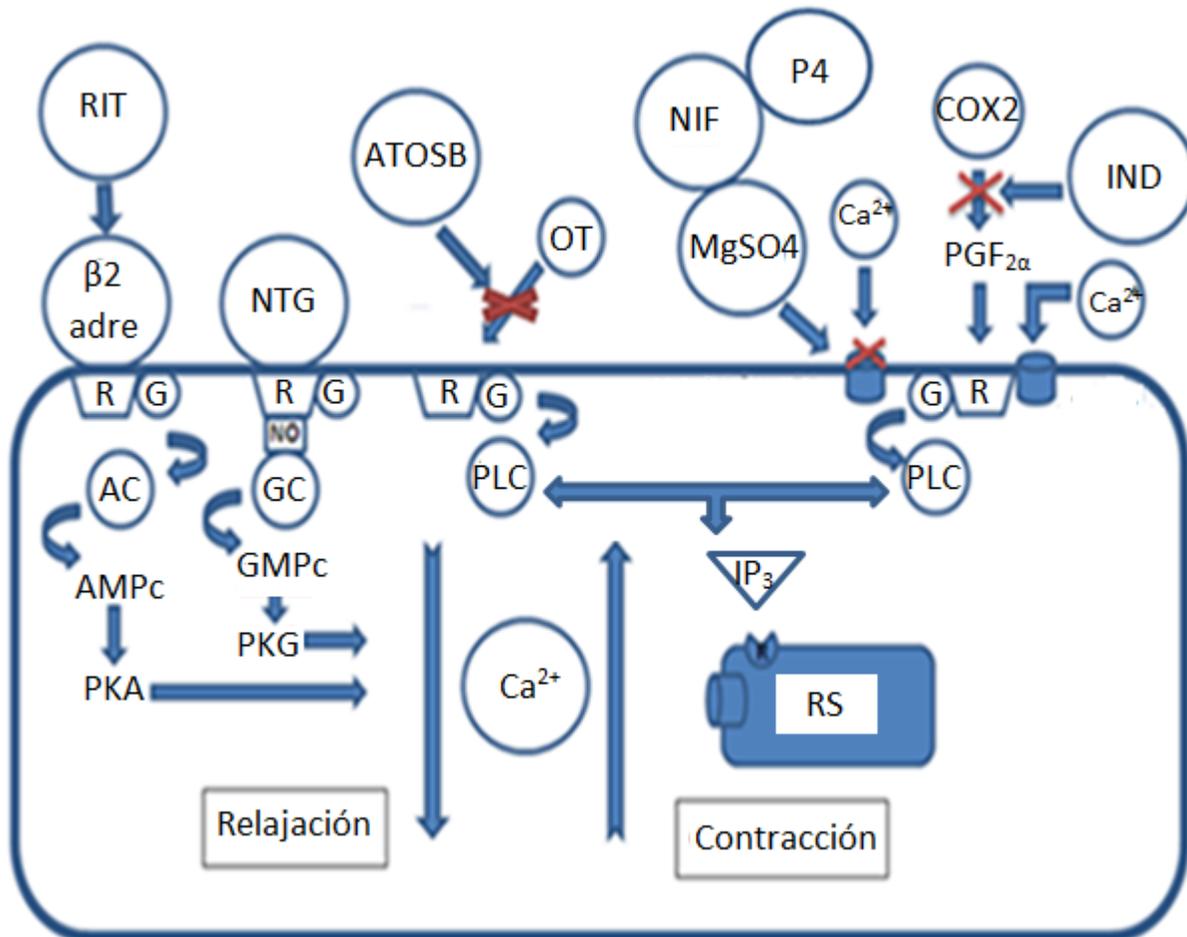


Figura 7. Mecanismos de acción propuestos para los diferentes fármacos tocolíticos. El clorhidrato de ritrodina (RIT) perteneciente a Ca^{2+} en células miométricas; la progesterona (P4), un fármaco que bloquea las vías de entrada de Ca^{2+} ; la nifedipina (NIF), un fármaco que bloquea las vías de entrada de calcio y la indometacina, un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa 2 (COX2), enzima que se encarga de la formación de prostaglandina- $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (Buhimschi *et al.*, 1996; Sladek *et al.*, 1997; Riemer y Heymann, 1998 ; Norwitz y Robison, 2001; Buxton, 2004; Vause y Johnston, 2006; Tan *et al.*, 2006; Ijjaali *et al.*, 2007 ; Wex *et al.*, 2009; Grześk *et al.*, 2014) (imagen creada propia).

Tabla 1. Tocolíticos principales utilizados en la clínica ginecológica para el tratamiento de la labor prematura, los efectos adversos maternos y neonatales de los tocolíticos y su mecanismo de acción.

Efectos colaterales ,complicaciones de los tocolíticos más comunes y mecanismo de acción				
Tocolíticos	Fármacos más usados y/o más estudiados	Efectos maternos	Efectos neonatales	Mecanismo de acción
Sulfato de magnesio		Náuseas y vómito Cefalea Debilidad muscular generalizada Depresión respiratoria	Letargo Hipotonía Depresión respiratoria	Desconocido, se ha propuesto la inhibición de la transmisión nerviosa al útero y bloqueo de la entrada de calcio al competir por la entrada en sus canales
Betamiméticos	Ritrodina, terbutalina y salbutamol	Taquicardia Náuseas y vómito Hiperglucemia	Taquicardia Hiperglucemia Hipoglucemia Hemorragia intraventricular	Incremento de AMPc mediante activación de β_2 .
Progestinas	Progesterona	Riesgo cardiovascular, tromboembolismo, carcinoma mamario		Efectos no genómicos sobre la fluidez de la membrana plasmática, bloqueando las vías de entrada de calcio.
Antagonistas de los receptores de oxitocina	Atosiban	Malestar gastrointestinal		Antagonista competitivo de los receptores de oxitocina.
Inhibidores de la ciclooxigenasa (COX´s)	Indometacina y sulindaco	Náuseas y vómito. Insuficiencia renal Hepatitis	Disfunción renal. Hipertensión pulmonar Cierre del conducto arterioso. Hemorragia intraventricular	Inhibición de la enzima COX y de la síntesis de prostaglandinas.
Donadores de óxido nítrico	Trinitrato de glicerina	Hipotensión Taquicardia Cefalea	Taquicardia Hipotensión	Activación de la sintasa de óxido nítrico; incremento de GMPc por la guanilato ciclasa
Bloqueadores de canales de calcio.	Nifedipina y nicardipina	Hipotensión Taquicardia Cefalea	Taquicardia Hipotensión	Bloqueo de las vía de entrada de calcio de las células miometriales.

Fuentes: Riemer y Heymann, 1998; The European Atosiban Study Group, 2001; Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group, 2001; Norwitz y Robinson, 2001; Parra-Ruiz, 2004; Guillen *et al.*, 2005; Than *et al.*, 2006; Franova *et al.*, 2009; How y Sibai, 2009; Wex *et al.*, 2009; Hass, *et al.* 2014.

1.3.1. Tocolíticos novedosos: inhibidores de PDE4.

Las primeras evidencias que se tienen del uso de los inhibidores de PDE's, datan de 1930 en China, donde se administraban infusiones de un té para el tratamiento de la obstrucción crónica pulmonar (OCP), y para el asma. La teofilina contenida en este té ha sido administrada conjuntamente con glucocorticoesteroides para el tratamiento del asma con un efecto anti-asmático, y en combinación con un medicamento de actividad broncodilatadora para el tratamiento de OCP (Spina *et al.*, 2008). Años después, se empezó a investigar la importancia de las PDE's no sólo en enfermedades respiratorias, sino también en trastornos cardiovasculares, disfunción eréctil e hipertensión pulmonar (Vasta *et al.*, 2004; Beavo *et al.*, 2014). Investigaciones posteriores demostraron que esta familia de isoenzimas hidrolizan a los nucleótidos cíclicos, la PDE4 degradan de manera selectiva al AMPc, que es un componente vital en la regulación de la motilidad uterina durante el parto y los procesos inflamatorios derivados de las infecciones intrauterinas, por lo tanto, este mecanismo ha sido de interés para proponerlo por varios autores como un blanco terapéutico para la obtención de fármacos tocolíticos, al ser los inhibidores de la PDE4 agentes que inducen el incremento intracelular del AMPc (Méhats *et al.*, 2004; Méhats *et al.*, 2007); cabe mencionar que la PDE4 está codificada en 4 genes (A, B, C y D) y distribuidas en diversos tejidos, de éstos la isoenzima PDE4B2 es la más abundante durante el trabajo de parto (Méhats *et al.*, 2007).

Se han sintetizado una gran variedad de inhibidores de PDE4, el rolipram es un inhibidor específico de estas enzimas y es conocido por ser eficaz en el tratamiento de la depresión, por tener efectos antiinflamatorios, antitumorales e inmunosupresores, aunque su uso hasta la fecha se ha limitado por su efecto emetogénico (Vasta *et al.*, 2004). Recientemente, los inhibidores PDE4 han recibido mucha atención por sus propiedades miorelajantes (Méhats *et al.*, 2000), pues como se ha mencionado los inhibidores de PDE4 están implicados en los procesos de relajación uterina, así el rolipram ejerce un efecto relajante potente *in vitro* en tiras uterinas de mujeres embarazadas (Leroy *et al.*, 1989). Sin embargo, por sus efectos indeseables descritos en modelos experimentales con animales y en la clínica (Texeira *et al.*, 1997; Torphy, 1998; Méhats *et al.*, 2004; Méhats *et al.*, 2007; Hervé *et al.*, 2008), su uso queda restringido como método de comparación con otros fármacos y para el desarrollo de

nuevos tocolíticos sin los efectos secundarios del rolipram. Finalmente la PDE4 es un blanco de importancia farmacológica para la aplicación de tocolíticos prometedores como inhibidores de PDE4, ya que se distribuye en el músculo uterino humano y de rata, regulando las contracciones prematuras mediante la degradación del AMPc (Marriott *et al.* 2002; Oger *et al.*, 2004; Schmitz *et al.*, 2007).

Otros inhibidores de la PDE4 como el roflumilast y cilomilast tienen aplicaciones terapéuticas en el tratamiento del asma y la OCP, disminuyendo la inflamación y contractilidad de las vías respiratorias y ya han sido evaluados como tocolíticos probables efectivos (Ratcliffe y Dougall, 2012; Oger *et al.*, 2004; Méhats *et al.*, 2000; Méhats *et al.*, 2004; Méhats *et al.*, 2007; Klukovits *et al.*, 2009).

1.4. Análogos de talidomida y sus aplicaciones.

La talidomida es una sustancia química (ftalimido-3-dioxo-2,6 piperidina o N ftalimido-glutarimida), derivada del ácido glutámico. Tiene dos anillos, del lado izquierdo una ftalimido, responsable de varios efectos biológicos y del lado derecho un glutarimido similar en estructura a otros hipnóticos, responsable de la sedación, con un átomo de carbón asimétrico (Figura 8). Este fármaco fue retirado del mercado debido a su efecto teratogénico, sin embargo en 1965 el interés en la talidomida resurgió, por sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antiangiogénicas (Sánchez-Saldaña, 2008). Por lo que en 1966 se comenzó a realizar modificaciones en su estructura química, éstos cambios se hicieron en el anillo ftalimido y el anillo glutarimido, dando como resultado moléculas análogas sin efectos teratogénicos, con más estabilidad química y mayor potencia como antiinflamatorios e inmunomoduladores (Fernández-Martínez, 2011).

Existen dos grupos principales de análogos de talidomida, separados por su mecanismo de acción y por su potencial clínico; el grupo I está formado por los inmunomoduladores (IMiDs) que son inhibidores potentes de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , por sus siglas en inglés), la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6) e interleucina-12 (IL-12), así mismo favorecen la síntesis de citocinas antiinflamatorias como la interleucina-10 (IL-10), interferón- γ (INF- γ) e interleucina-2 (IL-2) que inducen la regulación positiva favorable en muchas enfermedades autoinmunes (Teo *et al.*, 2005) y en otras como asma, artritis

reumatoide, psoriasis, etc (Housley *et al.*, 2005). Dos análogos pertenecientes a esta familia son lenalidomida (CC-5013, Revlimid™) y pomalidomida (CC-4047, Actimid™); ambos fármacos presentan una modificación en el anillo ftalimido al agregar un grupo amino (Marriott *et al.*, 2002). La lenalidomida y pomalidomida fueron aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) para de pacientes con mieloma múltiple, ya que poseen propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antiangiogénicas, antiproliferativas y efectos inmunomoduladores (List, 2006; Morrow, 2014; Clark *et al.*, 2014).

El grupo II constituido por análogos de talidomida más selectivos y potentes como inhibidores del TNF- α (SelCiDs), sin embargo, su efectividad sobre otras citocinas es menor y son menos eficientes como promotores de la producción de IL-10. Una característica particular de los SelCiDs es que son inhibidores potentes de la PDE4 y a eso se debe su efecto inmunomodulador y antiinflamatorio (Muller *et al.*, 1998; Marriott *et al.*, 1998; Marriott *et al.*, 2002; Houslay *et al.*, 2005). Adicionalmente, como ya se ha mencionado, está documentado que el incremento de AMPc, por la inhibición de la PDE4, regula la síntesis de citocinas proinflamatorias e induce la relajación del músculo uterino, mediante la activación de las PKA y la desfosforilación de la MLC por la MLCP. Aún más, otras alternativas para incrementar el AMPc intracelular son la activación de la AC, como lo hace de forma directa la forskolina o la tercera vía por medio de la incorporación de análogos del AMPc, como el análogo permeable 8-Br-AMPc; también, se ha encontrado que el incremento del AMPc, por medio de los inhibidores de PDE4, disminuye la actividad del factor nuclear- κ B (por sus siglas en inglés NF- κ B), proteína involucrado en la transcripción de ADN y producida como respuesta al estrés, infecciones y oxidación) y, en consecuencia, decrecen los niveles de citocinas proinflamatorias incluyendo a TNF- α (Méhats *et al.*, 2004; Oger *et al.*, 2004). Es importante recordar que la síntesis de citocinas proinflamatorias y sustancias uterotónicas como las prostaglandinas (PG's) aumenta en presencia de infecciones intrauterinas que activan al sistema inmunitario y desencadenan el parto prematuro (Méhats *et al.*, 2007).

Algunos compuestos análogos de talidomida inhibidores de PDE4 son el: 3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4NO₂FDPMe) y el 3-(4-aminoftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4AFDPM) (Fig. 8). Otro ejemplo de los SelCiDs es el medicamento que contiene el apremilast (Otezla), éste ha

sido aprobado por la FDA para el tratamiento de la artritis psoriásica, es comercializado por la compañía farmacéutica Celgene y es el primer medicamento en la categoría de fármacos inhibidores de PDE4. Como el 4AFDPMe y 4NO₂FDPMe, el apremilast es un análogo de la talidomida (Morrow, 2014; Schafer et al., 2014). Así entonces, tomando todos estos antecedentes juntos se plantea que dos análogos no teratogénicos de talidomida, el 4AFDPMe y 4NO₂FDPMe que son inhibidores potentes de la PDE4 y del TNF- α , sean evaluados como agentes relajantes del músculo liso uterino de rata en modelos de órgano aislado y evidenciar farmacológicamente algunas otras rutas probables de relajación de ese músculo con estos compuestos.

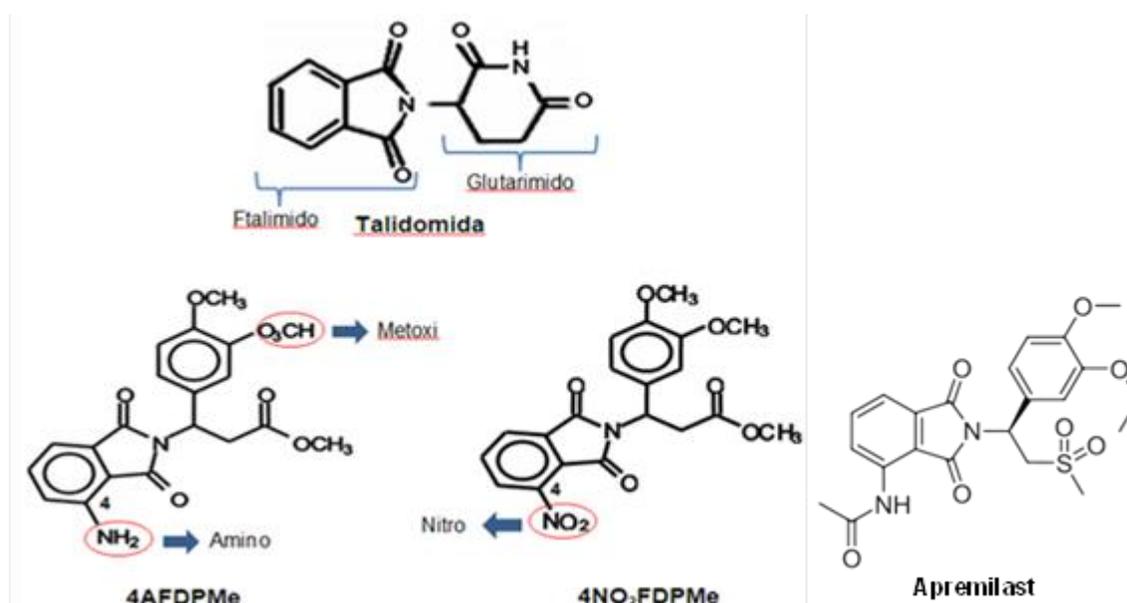


Figura 8. Muestra la talidomida y tres de sus análogos, obtenidos a partir de modificaciones estructurales de la talidomida, tales como el 4NO₂FDPMe, el 4AFDPMe y el apremilast una diferencia importante en estas moléculas es la presencia de grupos funcionales metoxilo y etoxilo (R-OCH_3 y $\text{R-CH}_2\text{CH}_3$). Las moléculas son semejantes, sin embargo, en la posición 4 del 4NO₂FDPMe se introdujo un grupo nitro (R-NO_2) a diferencia del 4AFDPMe con un grupo amino (R-NH_2) y su N-acetilación (R-NHCOCH_3) en el apremilast. Estos análogos carecen de teratogenicidad, son más estables químicamente, más potentes como inmunomoduladores y antiinflamatorios por ser inhibidores potentes de la PDE4 y del TNF- α (Muller et al., 1998; Schafer et al., 2014). Imagen modificada de Fernández-Martínez, 2011

2. JUSTIFICACIÓN.

La OMS reporta que al año aproximadamente 15 millones de neonatos son prematuros en todo el mundo, de los cuales 1 millón fallece por causas diversas asociadas al nacimiento temprano, y los que sobreviven presentan problemas permanentes de aprendizaje, visuales, auditivos, etc. Además en la actualidad los fármacos utilizados para el tratamiento del parto prematuro son poco eficaces y seguros (Buxton, 2004). Debido a que la labor prematura es un problema de salud reproductiva que causa morbilidad perinatal y mortalidad neonatal (Chanrachakul *et al.*, 2005; Yuan y Bernal, 2007) y que se cuenta con pocas alternativas farmacológicas para su tratamiento, es necesario desarrollar fármacos tocolíticos nuevos más eficaces y seguros (Bardou *et al.*, 1999), que produzcan menos efectos adversos tanto a la madre como al producto.

Una alternativa para el desarrollo de fármacos tocolíticos nuevos son los inhibidores de la enzima PDE4 que inactiva al segundo mensajero AMPc, esta molécula es el agente relajante principal del músculo liso, ya que si se inhibe a la PDE4 se incrementa la concentración de AMPc y se induce la relajación del músculo liso, disminuyendo la fuerza y la frecuencia de las contracciones del útero así como se promueven efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios que disminuyen el establecimiento del parto prematuro (Bernal., 2007; Méhats *et al.*, 2004).

Se han desarrollado varios análogos de talidomida que no son teratogénicos y sí más estables, eficaces y potentes como inhibidores de la PDE4, lo que les confiere propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Teo *et al.*, 2005; Fernández-Martínez *et al.*, 2011). Por esto, se propuso investigar si dos análogos nuevos de la talidomida (4NO₂FDPMe y 4AFDPMe), mismos que no son comerciales y fueron sintetizados en nuestro laboratorio, tienen efectos útero-relajantes en un modelo de tejidos aislados de rata.

3. HIPÓTESIS.

El 4NO₂FDPMe y 4AFDPMMe que son análogos de la talidomida son capaces de inhibir la contracción tónica-sostenida inducida por KCl 60 mM.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general:

- Estudiar el efecto útero-relajante de los análogos de la talidomida 4NO₂FDPMe y 4AFDPMMe, sobre la contracción tónica-sostenida del útero aislado de rata.

4.2. Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto de concentraciones diversas de los análogos de la talidomida 4NO₂FDPMe y 4AFDPMMe sobre la amplitud de la contracción tónica-sostenida inducida por un estímulo electromecánico KCl 60 mM en útero aislado de rata para evaluar su actividad útero-relajante.
- Construir las curvas de concentración-respuesta de los análogos 4NO₂FDPMe y 4AFDPMMe para determinar y comparar los parámetros farmacológicos de concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) y respuesta máxima (R_{máx}).
- Evidenciar si el efecto útero-relajante de los análogos de la talidomida 4NO₂FDPMe y 4AFDPMMe es bloqueado por fármacos de actividad farmacológica conocida para dilucidar algún mecanismo de acción alterna.
- Determinar el efecto de los análogos de talidomida 4NO₂FDPMe y 4AFDPMMe sobre la entrada de Ca²⁺ para evaluar si el efecto útero-relajante se debe al bloqueo de los canales de Ca²⁺.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se utilizaron tiras uterinas aisladas de 36 ratas hembras adultas vírgenes de (200-250 g) de la cepa Wistar, tratadas 48 h antes del sacrificio con 40 µg/kg por vía s.c. con benzoato de estradio con el objetivo de que el animal. Los animales se mantuvieron a temperatura ambiente ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), bajo un ciclo de luz oscuridad de 12 por 12, con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Los animales recibieron trato humanitario de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1969) referente a la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, el útero se extrajo por medio de una incisión abdominal y se colocó en una caja de Petri llena de solución Ringer a temperatura ambiente (Ponce-Monter *et al.*, 2008.). Los cuernos uterinos se disecaron separando el tejido adiposo y el tejido conjuntivo; cada cuerno uterino se cortó por la zona de la región mesometrial y de cada cuerno uterino se obtuvieron 6 tiras de 10 mm x 3 mm (con orientación longitudinal) obteniendo un total de 12 tiras por rata.

Las tiras uterinas se colocaron verticalmente en las cámaras para tejidos aislados de un volumen de 3 mL. Una punta de las tiras se sujeta a la base de las cámaras para tejidos aislados con hilo de seda de 6 ceros y la otra punta se une a un transductor de tensión FT03 (Grass) también con hilo de seda de 6 ceros. Los tejidos colocados en las cámaras se incubaron con 3 mL de la solución Ringer normal (SRN) con la siguiente composición (mM): NaCl 118, NaHCO_3 5.95, MgSO_4 2.10, KCl 5.63, CaCl_2 2.16, y glucosa 5.55 pH de 7.4, a 37°C , y burbujeados constantemente con una mezcla gaseosa de 5% de CO_2 y 95% de O_2 . Los tejidos se sometieron a la tensión de 1 g, y esta tensión se mantuvo durante todo el experimento, y está se consideró como la línea basal. El registro de la función contráctil de los tejidos se realizó con un transductor de tensión FT03 Grass, un polígrafo GrassTelefactor RPS312 acoplado a una PC que tiene incorporado el programa de software PolyVIEW, que permite ver la actividad contráctil de los tejidos en un monitor.

5.1. Modelo I

Modelo experimental de la contracción tónica-sostenida de músculo liso uterino.

Como ya se mencionó la solución isotónica de KCl 60 mM produce una rápida contracción tónica, seguida de una meseta sostenida y prolongada producto de la despolarización de las células miométriales y de la activación de las vías de entrada de calcio operadas por el voltaje. Este modelo experimental se ha utilizado ampliamente para evaluar el efecto útero relajante de sustancias espasmolíticas, como varios agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES), hormonas sexuales como progesterona, flavonoides como quercetina, bloqueadores de la entrada de calcio extracelular como nifedipina, etc. De manera que este modelo experimental ha sido reconocido internacionalmente, para estudiar el mecanismo de acción de tipos de sustancias espasmolíticas diversas, como lo demuestra la literatura (Pérez *et al.*, 1995; Trujillo *et al.*, 2000; Meckes *et al.*, 2002; Pérez-Hernández *et al.*, 2007; Ponce-Monter *et al.*, 2008).

Entonces para investigar el efecto de los compuestos sobre la contracción tónica-sostenida se utilizó el **modelo I**, que consiste en lo siguiente: los tejidos, se estimularon electromecánicamente con una solución isotónica despolarizante de KCl (60 mM) con Ca^{2+} ; la viabilidad y la reproducibilidad de la respuesta tónica-sostenida inducida por la solución isotónica despolarizante de KCl (60 mM) con Ca^{2+} se comprobó después de obtener dos respuestas con la misma amplitud, las tiras que no cumplían con este requisito fueron desechadas. La solución despolarizante de KCl 60 mM con Ca^{2+} se preparó sustituyendo equimolecularmente al NaCl por KCl para mantener la isotonicidad (Ponce-Monter *et al.*, 2010).

Los dos análogos de la talidomida son insolubles en la solución Ringer por lo que para disolverlos y mantenerlos solubles en la solución de incubación de los tejidos se utilizó como disolvente una solución que contenía 2 partes de etanol (EtOH) y 1 parte de dimetil sulfóxido (DMSO), se utilizó un volumen de disolvente constante (10 μL) para las diferentes concentraciones de los compuestos ensayados. Este volumen del disolvente no modifica la amplitud de la contracción tónica-sostenida inducida por la solución despolarizante. Después de que la contracción tónica-sostenida inducida por KCl 60 mM tenía una amplitud constante, los compuestos se adicionaron a la solución de

incubación en las siguientes concentraciones 1, 3.2, 5.6, 10, 32, 56, 100 y 180 μM 4NO₂FDPMe, y 1, 3.2, 5.6, 10, 32, 42 y 58 μM 4AFDPMe. La papaverina, fue utilizada como compuesto de comparación, ya que es un inhibidor inespecífico de las PDE, en las siguientes concentraciones 3, 10, 30, 100 y 300 μM , cada compuesto fue adicionado de manera no acumulativa en un volumen que no excedió más de 10 μL . El DMSO: EtOH también se adicionó en este volumen y fue usado como control negativo.

Para examinar si el efecto útero-relajante del 4NO₂FDPMe y el 4AFDPMe no se debía a la activación de los receptores β_2 -adrenérgicos, los tejidos se preincubaron por 20 min en 10 μM de propanolol (un antagonista de los receptores β_2 -adrenérgicos que generan relajación). Después de la incubación con el propanolol las tiras uterinas fueron estimuladas electromecánicamente con la solución despolarizante KCl 60 mM con Ca²⁺, los análogos de talidomida se adicionaron a la solución de incubación en las siguientes concentraciones mencionados antes.

Para examinar si el efecto útero-relajante del 4NO₂FDPMe y el 4AFDPMe no se debía a la activación de la sintasa del óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés) que produce al óxido nítrico (ON) que es un agente relajante potente, se realizó el siguiente procedimiento: verificar viabilidad y reproducibilidad del tejido uterino ante el estímulo de la solución despolarizante KCl 60 mM con Ca²⁺ (SD/Ca²⁺ KCl 60 mM). Posteriormente las tiras uterinas se incubaron por 20 min en 100 μM de L-NAME (un inhibidor de la NOS). Después de la incubación con el L-NAME, las tiras uterinas fueron estimuladas electromecánicamente con la solución despolarizante KCl 60 mM con Ca²⁺ hasta alcanzar una amplitud constante, los análogos de talidomida se adicionaron a la solución de incubación en las siguientes concentraciones 1, 3.2, 5.6, 10, 32, 56, 100 y 180 μM de 4NO₂FDPMe, y 1, 3.2, 5.6, 10, 32, 42 y 58 μM de 4AFDPMe.

Para examinar si el efecto útero-relajante del 4NO₂FDPMe y el 4AFDPMe no se debía a la activación de los receptores de histamina H₂, se procedió a verificar viabilidad y reproducibilidad del tejido uterino ante el estímulo de la solución despolarizante KCl 60 mM con Ca²⁺ (SD/Ca²⁺ KCl 60 mM). Posteriormente las tiras uterinas se incubaron por 20 min en 10 μM de cimetidina (un antagonista de los receptores H₂). Después de la incubación con la cimetidina las tiras uterinas fueron estimuladas electromecánicamente con la solución despolarizante KCl 60 mM con Ca²⁺ hasta alcanzar una amplitud constante, los compuestos se adicionaron a la solución de incubación en las siguientes

concentraciones 1, 3.2, 5.6, 10, 32, 56, 100 y 180 μM de 4NO₂FDPMe, y 1, 3.2, 5.6, 10, 32, 42 y 58 μM de 4AFDPMe.

5.2. Modelo II

Para examinar si el efecto útero-relajante del 4NO₂FDPMe y el 4AFDPMe, se debía al bloqueo de los canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje se realizó el **modelo II**, el cual consiste en el procedimiento siguiente: primero se verificó la viabilidad de los tejidos así como su reproducibilidad ante el estímulo de la solución despolarizante KCl 60 mM (SD/Ca²⁺ KCl 60 mM).

Una vez verificada la viabilidad de los tejidos y reproducibilidad de la respuesta uterina, los tejidos fueron incubados en una solución despolarizante sin Ca²⁺ con la composición siguiente (mM): NaCl 63.63, NaHCO₃ 5.95, MgSO₄ 2.10, KCl 60, EDTA 1.00, y glucosa 5.55, la solución fue preparada por sustitución equimolar de NaCl por KCl y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fue usado como quelante del Ca²⁺ (Trujillo *et al.*, 2000). Después de haber sido lavados los tejidos continuamente con la solución fresca despolarizante sin Ca²⁺ (SD/EDTA sin Ca²⁺), cuando el tejido regresó a su tensión basal se estimuló con 1mM de CaCl₂ y la amplitud de esta respuesta se consideró como el 100%. Enseguida, los tejidos fueron lavados varias veces con la solución despolarizante sin Ca²⁺ hasta regresar a su basal; en estas condiciones los tejidos se incubaron con diferentes concentraciones de los análogos de la talidomida.

En cada una las tiras uterinas, mantenidas en la solución fresca, se le adicionaron los dos análogos de la talidomida en las siguientes concentraciones: 3.2, 5.6, 10, 32, 56, 100 y 230 μM , dejándolos incubar durante 40 min (Perusquía *et al.*, 2005). Al cumplirse el tiempo requerido de incubación, para cada uno de los análogos de talidomida, se adicionó la solución despolarizante con 1mM CaCl₂ (SD/Ca²⁺ 1 mM) para poder calcular el % de inhibición de cada análogo de talidomida usado (Perusquía *et al.*, 2005).

5.3. Análisis estadístico de los datos.

Los datos presentados son el resultado del valor promedio de cada grupo de determinaciones (con su n correspondiente) \pm el error estándar (EEM) indicado. Para determinar las diferencias estadísticas de los parámetros estudiados (CI_{50} y $R_{m\acute{a}x}$) se utilizó la prueba de t- Student para comparar dos valores y para la comparación de más de dos valores se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, llevando a cabo la comparación de todos los grupos contra todos, es la llamada comparación múltiple pareada total del método de Student-Newman-Keuls; esta prueba proporciona la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$. Las pruebas se corrieron en un paquete de Sigma-Stat versión 10.0 (Systat Software, USA).

6. RESULTADOS.

6.1. Efecto del 4AFDPM_e, el 4NO₂FDPM_e y la papaverina sobre la contracción tónica sostenida inducida por la solución despolarizante de KCl (60 mM).

Los resultados de este trabajo muestran por vez primera que los dos análogos de talidomida (4AFDPM_e y el 4NO₂FDPM_e) ejercen un efecto útero-relajante profundo sobre la contracción tónica-sostenida del músculo liso uterino aislado de rata estrogenizada no embarazada, inducida por una solución despolarizante de KCl 60 mM con Ca²⁺ (SD/Ca²⁺ de KCl 60 mM). El efecto útero-relajante fue dependiente de la concentración para cada uno de los compuestos estudiados. Los dos análogos de talidomida y el compuesto de testigo (papaverina), alcanzaron la respuesta máxima útero-relajante. Sin embargo, de acuerdo con los resultados el derivado 4AFDPM_e resultó más potente que la papaverina y el 4NO₂FDPM_e. La figura 9 ilustra el registro de la contracción tónica-sostenida inducida por SD/Ca²⁺ de 60 mM KCl y el modelo I utilizado para el estudio del efecto inhibitorio inducido por los análogos de talidomida: (A) disolvente o testigo negativo, (B) 4AFDPM_e 230 μM, (C) 4NO₂FDPM_e 56 μM y (D) el compuesto testigo (papaverina) 56 μM en útero aislado de rata. *Solución despolarizante con calcio 60 mM KCl y **lavado.

La figura 10 muestra las curvas concentración-respuesta del efecto inhibitorio de dos análogos de talidomida (4AFDPM_e y el 4NO₂FDPM_e) y el compuesto testigo positivo (papaverina), en útero de rata precontracturado con SD/Ca²⁺ de KCl 60 mM, en escala aritmética (A) y logarítmica (B). Como se ilustra en las gráficas los tres compuestos tienen la misma respuesta máxima. Sin embargo, el 4AFDPM_e resultó significativamente más potente que el 4NO₂FDPM_e y la papaverina como se muestra en la tabla 2.

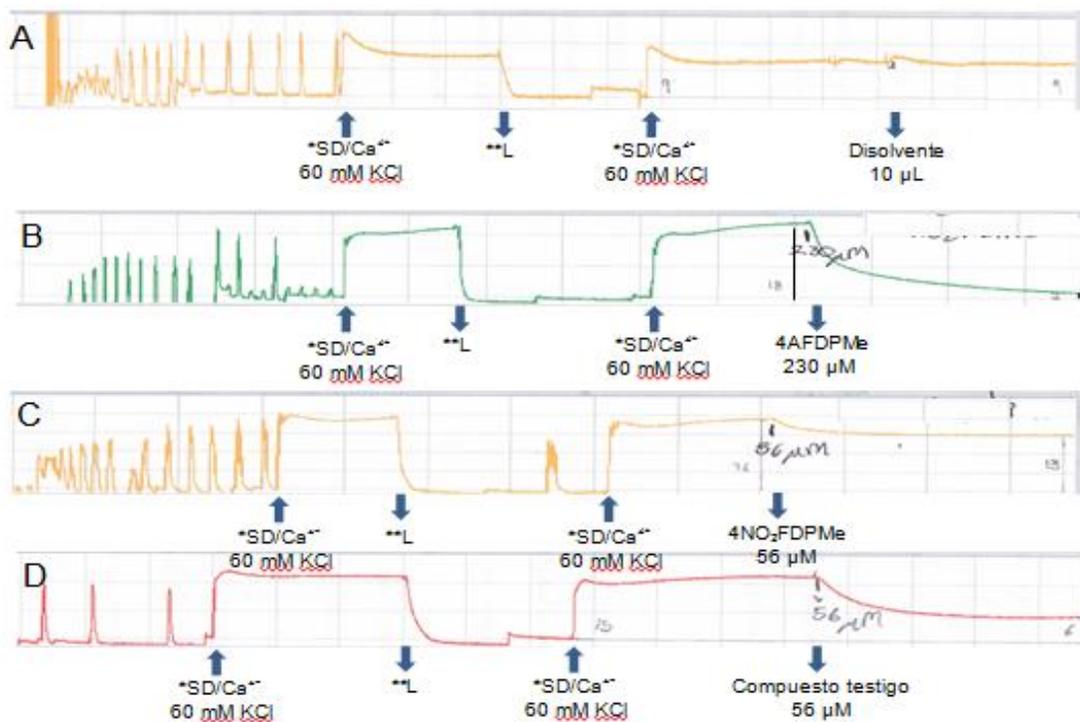


Figura 9. Trazo típico de la contracción uterina y el efecto inhibitorio de los derivados de talidomida (4AFDPMe y 4NO₂FDPMe) y el compuesto testigo (papaverina). Además se representa la figura del solvente.

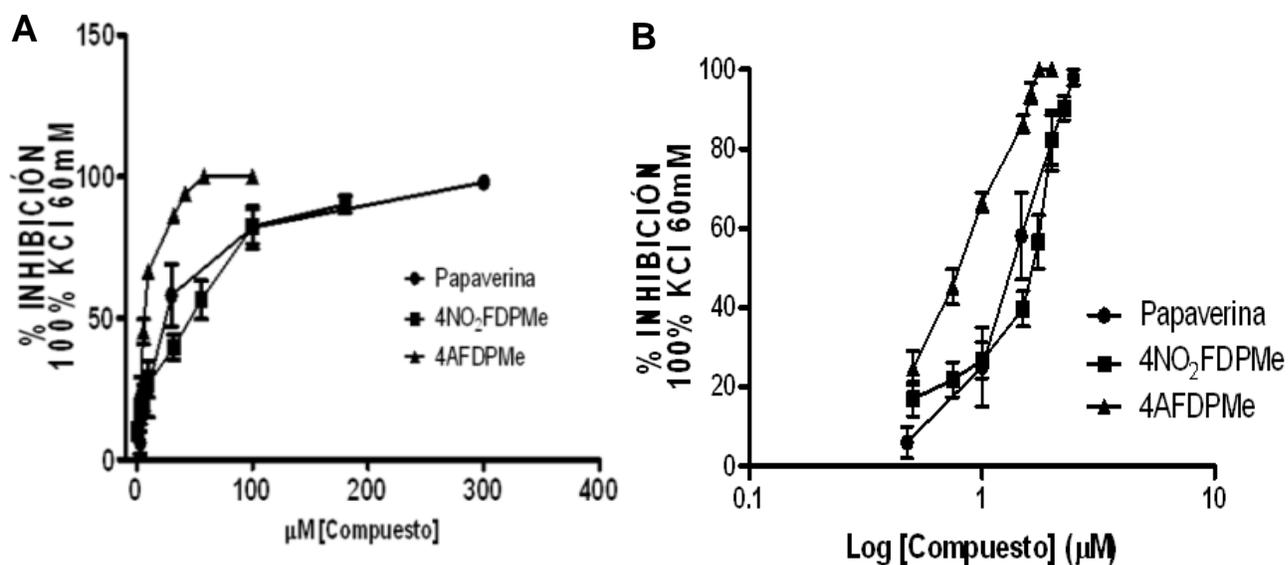


Figura 10. Efecto relajante del 4AFDPMe, 4NO₂FDPMe y la papaverina sobre la contracción tónica-sostenida inducida por la SD/Ca^{2+} de 60mM KCl. En ambas figuras, cada punto es el valor promedio de 6 experimentos y la barra vertical representa el EEM.

Tabla 2. Muestra los valores de CI_{50} (μM) y $R_{m\acute{a}x}(\%)$ del 4AFDPMe, 4NO₂FDPMe y papaverina, sobre la contracción tónica-sostenida del útero aislado de rata, inducida por 60 mM de KCl.

Compuesto	CI_{50} μM	$R_{m\acute{a}x}(\%)$	N
4AFDPMe	6.79 \pm 0.88*	100	8
4NO ₂ FDPMe	88.03 \pm 7.92	90.16 \pm 7.21	8
Papaverina	23.32 \pm 1.86**	100	8

Cada valor representa el promedio \pm el EEM. * $p < 0.05$ entre 4AFDPMe vs 4NO₂FDPMe; ** $p < 0.05$ entre Papaverina vs 4NO₂FDPMe

La incubación por 20 min con propanolol (10 μM), el L-NAME (100 μM) y la cimetidina (10 μM) en tiras uterinas aisladas de rata, no mostraron inhibir el efecto útero-relajante de los dos compuestos (4AFDPMe Y el 4NO₂FDPMe) sobre el estímulo electromecánico 60 mM de KCl (Datos no mostrados).

6.2 Efecto del 4AFDPMe Y el 4NO₂FDPMe sobre la contracción tónica-sostenida inducida por Ca²⁺ 1 mM.

El 4AFDPMe y el 4NO₂FDPMe ejercen un efecto útero-relajante sobre la contracción tónica-sostenida inducida por Ca²⁺ 1mM, en músculo liso uterino aislado de rata estrogenizada no embarazada, su efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración para cada uno de los compuestos. Estos resultados son de interés e importancia, ya que no existen antecedentes en la literatura donde se mencione a los análogos de la talidomida como bloqueadores de las vías de entrada de Ca²⁺. En este respecto el 4AFDPMe y el 4NO₂FDPMe fueron igual de eficientes para bloquear la entrada de calcio, sin embargo el 4AFDPMe mostró ser el compuesto más potente para inhibir la contracción inducida por la solución despolarizante con Ca²⁺ 1mM (SD/Ca²⁺ con 1mM), seguido del 4NO₂FDPMe.

La figura 11 ilustra el registro de la contracción tónica-sostenida inducida por SD/Ca²⁺ con 1mM y el modelo II utilizado para el estudio del bloqueo de las vías de entrada de calcio en músculo liso de rata inducido por los análogos de talidomida: (A) 4AFDPMe 13.49 μM y (B) 4NO₂FDPMe 31.15 μM en útero aislado de rata. *Solución despolarizante con calcio 60 mM KCl, **lavado y ***solución despolarizante con 1mM de calcio.

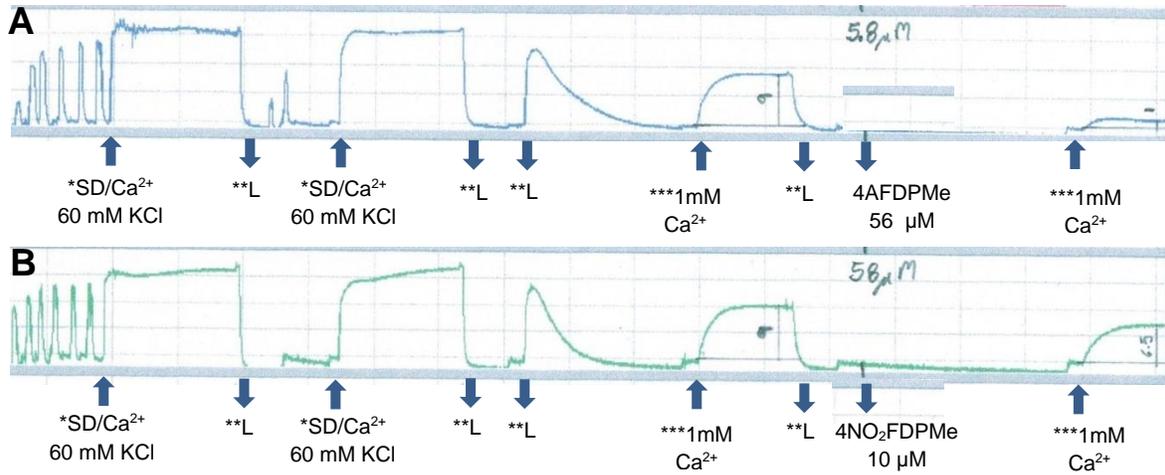


Figura 11. Trazos típicos del efecto útero-relajante del (A) 4AFDPMe y (B) 4NO₂FDPMe; esto sugiere el bloqueo de las vías de entrada de Ca²⁺ en tejido aislado de rata adulta no embarazada.

En la figura 12 se muestran las curvas concentración-respuesta del efecto bloqueador de las vías de entrada de calcio sensibles al voltaje de los análogos 4AFDPMe y el 4NO₂FDPMe, en útero de rata estimulado electromecánicamente con SD/Ca²⁺ de 1 mM, en escala aritmética (A) y logarítmica (B). Como se ilustra en las gráficas los dos compuestos alcanzan la respuesta máxima; sin embargo, el 4AFDPMe resultó significativamente más potente que el 4NO₂FDPMe, como se muestra en la tabla 3.

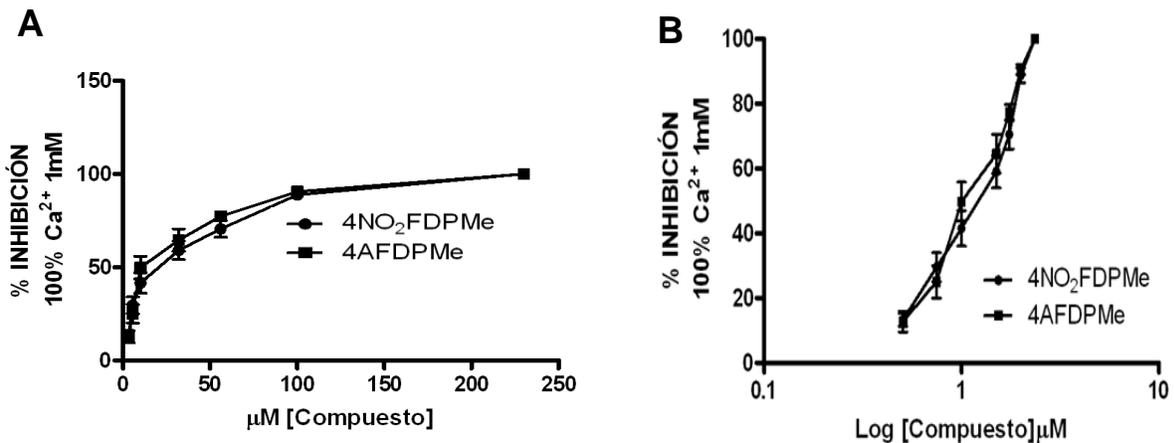


Figura 12. Efecto relajante del 4AFDPMe, 4NO₂FDPMe mediante el bloqueo de las vías de entrada de calcio sobre la contracción tónica-sostenida inducida por la SD/Ca²⁺ 1 mM. En ambas figuras, cada punto es el valor promedio de 12 experimentos y la barra vertical representa el EEM.

Tabla 3. Valores de Cl_{50} (μM) y $R_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}(\%)$ del 4AFDPM e y 4NO₂FDPM e, sobre la contracci3n t3nica-sostenida del 3tero aislado de rata, inducida por por 1 mM de Ca²⁺

Compuesto	Cl_{50} μM	$R_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}(\%)$	N
4AFDPM e	13.49 \pm 1.48*	100	8
4NO ₂ FDPM e	31.15 \pm 2.86	100	8

Cada valor representa el promedio y \pm el EEM. * $p < 0.05$, diferencia estadisticamente significativa.

7. DISCUSI3N

El est3mulo de 60 mM de KCl con Ca²⁺ provoca la despolarizaci3n de la membrana celular y la apertura de los canales de Ca²⁺ que participan en la contracci3n del miometrial. La contracci3n del miometrio depende de la activaci3n de canales i3nicos, por cual la apertura de los canales de calcio es el mecanismo central de la contracci3n miometrial y el bloqueo de los mismos produce la relajaci3n uterina (Granger *et al.*, 1986; Phillippe y Chien, 1995; Trujillo *et.*, 2000; Carvajal y Weiner 2003).

Hay varios tipos distintos de antagonistas que bloquean el mecanismo central de la contracci3n miometrial, algunos de estos bloqueadores han sido usados en cl3nica para el retraso del nacimiento prematuro por ejemplo la nifedipina que es un bloqueador espec3fico de los canales de Ca²⁺ tipo L (G3sp3r y Hajagos-T3th, 2013); los canales de Ca²⁺ tipo L son los m3s abundantes en el m3sculo liso y card3aco, sus bloqueadores exhiben estereoespecificidad y parece ser que son reconocidos por estructuras espec3ficas en el canal de Ca²⁺, se sabe que contiene sitios de fijaci3n para los distintos bloqueadores del canal de Ca²⁺, por lo tanto, se cree que tiene varios receptores de f3rmacos en la misma prote3na que inhiben el flujo de Ca²⁺ de forma r3pida y potente (Kalant y Roschlau, 2002).

Estudios previos en modelos experimentales similares en m3sculo liso uterino, llevados a cabo en el laboratorio donde se desarroll3 este trabajo, han mostrado un efecto relajante r3pido y dependiente de la concentraci3n de los an3logos de talidomida aplicados, lo que llev3 a suponer un efecto membranal como lo es el bloqueo de canales de Ca²⁺; m3s a3n, el efecto relajante desaparece gradualmente y la contracci3n

miometrial se recupera casi totalmente con varios lavados del tejido, esto refuerza la idea de que el efecto útero-relajante es ocasionado, en buena medida, por el bloqueo membranar de estos canales. Los modelos empleados en este trabajo mostraron que los dos análogos 4AFDPMe y el 4NO₂FDPMe inhiben en forma dependiente de la concentración la contracción tónica-sostenida inducida por una solución despolarizante de KCl 60 mM en el útero aislado de rata, lo que permite suponer que estos compuestos relajan al útero mediante mecanismos membranales, dada la rapidez del efecto en minutos, comparativamente con hormonas cuyo efecto genómico es lento (Parra *et al.*, 2000, Perrusquía y Navarrete, 2005) y con la inhibición misma de la PDE4, que es una enzima citosólica. De hecho, es bien conocido que el músculo liso uterino aislado de rata estrogenizada con BE₂ responde con una contracción tónica-sostenida cuando se incuba en una solución despolarizante de KCl 60 mM con Ca²⁺ (Granger *et al.*, 1986; Phillippe y Chien, 1995; Trujillo *et.*, 2000) y que la contracción inducida de esta manera es dependiente del Ca²⁺ extracelular, como se ha demostrado en varios reportes (Somlyo y Somlyo, 1994; Webb, 2003; Matthew *et al.*, 2004).

De acuerdo con los resultados, los compuestos estudiados inhibieron la contracción tónica inducida por 1 mM de CaCl₂ en tejidos inmersos en una solución despolarizante sin CaCl₂ en forma dependiente de la concentración. Una explicación probable es que el efecto útero-relajante rápido de los análogos 4FDPMe y 4NO₂FDPMe se debe al bloqueo de los canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje; así, estos resultados fueron consistentes con el modelo I, en primer lugar porque el compuesto 4AFDPMe en este modelo también fue el más potente para inhibir las contracciones uterinas (CI₅₀ = 13.49 ± 1.48) y en segundo lugar se demostró que el efecto útero-relajante del 4FDPMe y 4NO₂FDPMe se debe a la reducción del [Ca²⁺]_i en el miocito a través del bloqueo de los canales de Ca²⁺ operados por el voltaje, como lo hacen los bloqueadores usados en la clínica pero con una potencia mucho mayor que los análogos de talidomida evaluados (Kalant y Roschlau, 2002; Gáspár y Hajagos-Tóth, 2013). Este efecto probablemente se debe a que los análogos de talidomida comparten semejanzas en los grupos funcionales y similitudes moleculares con los bloqueadores de Ca²⁺, que podrían conferirle tal actividad novedosa y acoplarse a los sitios múltiples de unión y bloqueo de los canales (Figura 13).

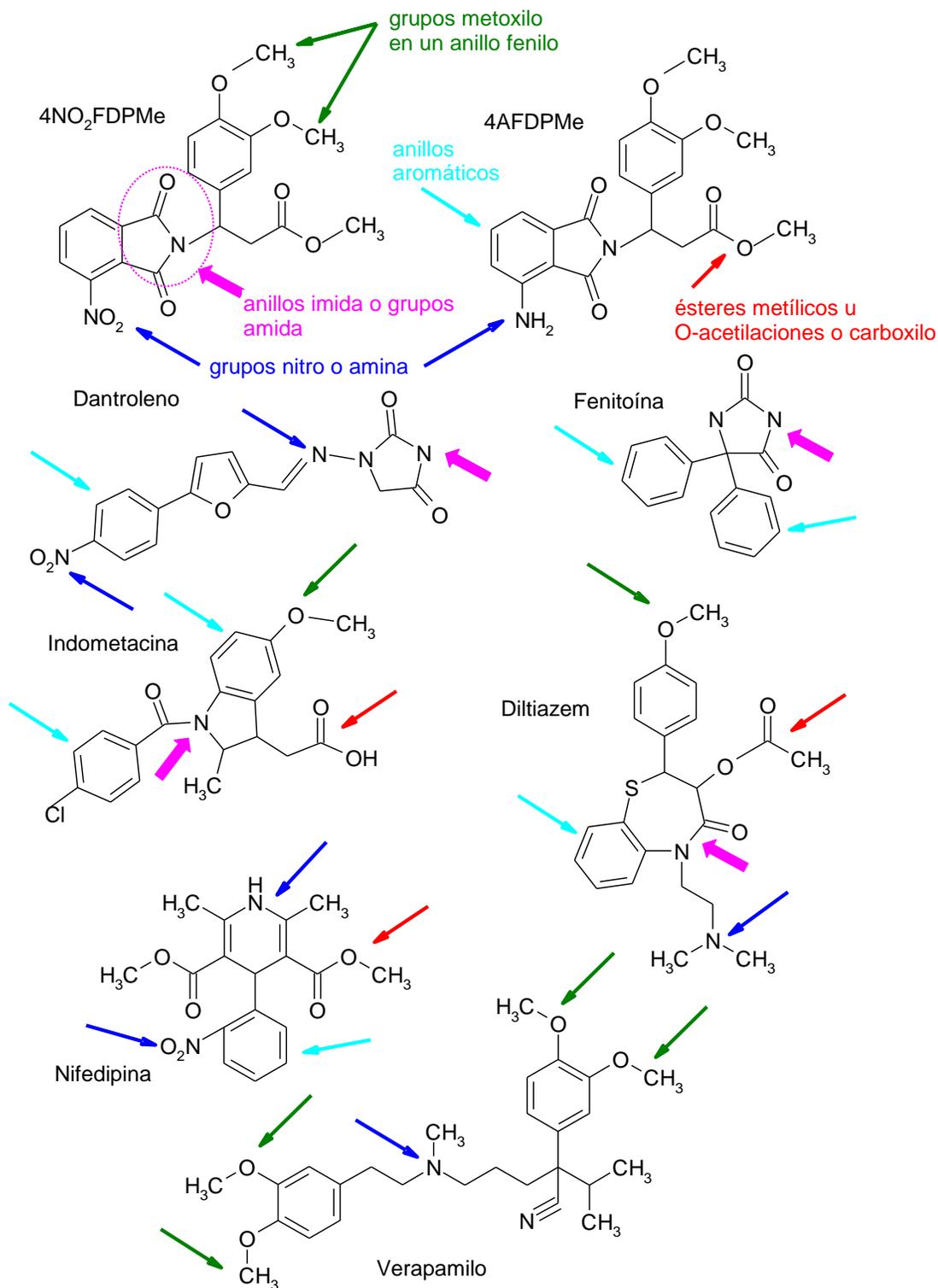


Figura 13. Estructuras químicas de los análogos de talidomida y varios fármacos bloqueadores de canales de calcio, donde se muestran los grupos funcionales y similitudes moleculares que podrían conferirle tal actividad novedosa

Muchas hormonas y mediadores parácrinos han sido estudiados como tocolíticos o relajantes del músculo uterino y se propone que estos mediadores pueden actuar sobre las células miometriales mediante varias rutas para inducir su relajación, una de ellas es la ruta de activación del AMPc, este segundo mensajero modula muchos mecanismos intracelulares mediante la activación de la PKA. La PKA fosforila y altera la actividad de muchas proteínas involucradas en el ciclo contracción/relajación del músculo liso, por ejemplo: a) la fosforilación de la MLCK por la PKA que induce el desacoplamiento de esa enzima con el complejo Ca^{2+} /calmodulina al reducir su afinidad, b) el rompimiento de complejo actinmiosínico mediante la activación de la MLCP al fosforilar con la PKA a la RhoK y así inhibirla (Carvajal y Weiner 2003; Webb, 2003). Además, se ha propuesto que el AMPc modifica la expresión de otras proteínas relacionadas a la contracción, tales como los receptores α -OT y COX2, entre otras; de hecho, el papel del AMPc en la relajación miometrial ha sido probado, ya que muchas hormonas que promueven la relajación están relacionadas a la vía de activación del AMPc (Carvajal y Weiner 2003).

Como se evidenció en este trabajo, se sugiere fuertemente que el mecanismo de relajación rápida inducida por los dos análogos de talidomida se debe al bloqueo de los canales de Ca^{2+} , pero también por el incremento intracelular del AMPc, dado por su efecto como inhibidores de PDE4, ya que el AMPc también posee la capacidad de regular la concentración e ingreso del Ca^{2+} a los miocitos uterinos, y se ha observado que mediante la activación de la PKA: a) se inhibe la activación de la PLC inducida por agentes contráctiles, b) se inhibe la entrada de Ca^{2+} por medio de la fosforilación de los canales de Ca^{2+} , c) se activan las bombas membranales de Ca^{2+} , y d) se activan los canales de K^+ activados por la conductancia grande de Ca^{2+} , lo que genera una hiperpolarización de la membrana (Carvajal y Weiner 2003).

Haciendo hincapié en la importancia del uso potencial y futuro de los inhibidores de PDE4, tales como los dos análogos de talidomida aquí evaluados, en trabajos diversos se ha demostrado que el aumento del AMPc inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y IL-1 en monocitos y macrófagos, lo que les confiere su efecto inmunomodulador y antiinflamatorio (Marriott *et al.*, 2002; Meháts *et al.*, 2004, 2007; Oger *et al.*, 2004; Klukovits *et al.*, 2009; Schafer *et al.*, 2014). Como se ha mencionado, la PDE4 es una enzima que está presente en el útero de rata y humano

que metaboliza al AMPc transformándolo en 5'-AMP inactivo (Meháts *et al.*, 2004, 2007; Morrow, 2014), además participa de manera activa en el ciclo de contracción/relajación del útero (Wex *et al.*, 2009); este hecho condujo a tomar a la PDE4 como un blanco farmacológico para regular la actividad del AMPc (Meháts *et al.*, 2004, 2007; Franova *et al.*, 2009; Klukovits *et al.*, 2009). De esta manera, la evaluación de los análogos de la talidomida que no son teratogénicos, ya que carecen del anillo glutarimida el cual favorece la unión a cereblón (proteína diana asociada a la teratogenicidad) (Ito *et al.*, 2010; Chang y Stewart, 2011; López-Girona *et al.*, 2012), y que son inhibidores de la PDE4, toma relevancia como una propuesta importante para el tratamiento del parto prematuro por sus acciones útero-relajantes e inmunomoduladoras, como sugieren autores diversos que han evaluado a otros inhibidores de esa enzima (Meháts *et al.*, 2004, 2007).

Finalmente, el 4AFDPMe fue el compuesto más potente ($IC_{50} = 6.79 \pm 0.88^* \mu M$) para inhibir la contracción tónica-sostenida inducida por una solución isotónica despolarizante de 60 mM de KCl, esto quizá se debió a que el grupo amino se une con mayor afinidad al sitio catalítico de la PDE4, lo que coincide con su potencia como inhibidor del TNF- α y dado su parecido al apremilast que es muy potente y tiene un grupo N-acetilado (Muller *et al.*, 1998; Schafer *et al.*, 2014); por lo tanto, se propone que el efecto útero-relajante de los compuestos aquí estudiados se debe en parte a: a) la inhibición de la PDE4 (Dredge *et al.*, 2002) que conlleva al incremento del AMPc, por lo tanto, a la relajación uterina por diversas vías (Carvajal y Weiner 2003; Oger *et al.*, 2004; Méhats *et al.*, 2007; Klukovits *et al.*, 2009), b) de forma muy importante y novedosa al bloqueo de los canales de Ca^{2+} por las rutas ya comentadas y su parecido a los bloqueadores selectivos de esos canales (Kalant y Roschlau, 2002; Carvajal y Weiner 2003) y c) porque el propanolol, el L-NAME y la cimetidina no mostraron inhibir el efecto útero-relajante de los compuestos 4AFDPMe y 4NO₂FDPMe sobre contracciones tónicas-sostenidas KCl 60 Mm, lo que refuerza lo ya propuesto.

8. CONCLUSIONES

1.- Los análogos de talidomida (4AFDPM_e y 4NO₂FDPM_e) mostraron inhibir rápidamente la contracción tónica-sostenida inducida por el estímulo electromecánico de KCl 60 mM en útero de rata aislado, este efecto fue dependiente de la concentración para cada uno de los compuestos. Sin embargo, el 4AFDPM_e fue el más potente para relajar al útero, una explicación posible es que el grupo amino se una con mayor afinidad y es más potente como inhibidor de la PDE4, así como se sugiere que es el mejor bloqueador de la entrada de Ca²⁺ por los resultados obtenidos en modelo II.

2.- El propanolol, la cimetidina y el L-NAME permitieron descartar farmacológicamente que el efecto útero-relajante del 4AFDMPMe y 4NO₂FDPM_e no se debe a la activación de los receptores β₂-adrenérgicos, H₂, ni a la NOS.

3.- Los resultados obtenidos en el modelo II sugieren fuertemente que el efecto relajante rápido se debe al bloqueo de los canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje; sin embargo, es posible que estos dos análogos de la talidomida, también puedan estar afectando otras vías de señalización en los procesos de la contracción uterina, por ejemplo: la formación del complejo calcio-calmodulina, la activación de la MLCK, la unión del complejo actinmiosínico y la activación de la MLCP por medio de la inhibición de PDE4 que aumenta AMPc y activa a la PKA.

9. BIBLIOGRAFÍA.

Aaronson, I, P., Sarwar, U., Gin, S., Rockenbauch, U., Connolly, M., Tillet, A., Watson, S., Liu, B., y Tribe, M, R. (2006). **A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats.** *British Journal of Pharmacology*. 147: 815-824.

Al-Matubsi, H. Y., Eis, A. L., Brodt-Eppley, J., MacPhee, D. J., Lye.S. y Myatt.L. (2001). **Expression and localization of the contractile prostaglandin F receptor in pregnant rat myometrium in late gestation, labor, and postpartum.** *Biology of Reproduction*. 65: 1029-1037.

Bardou, M., Cortijo, J., Loustalot, C., Taylor, S., Perales-Marín, A., Mercier, J, F., Dumas, M., Deneux-Tharoux, C., Frydman, R., Morcillo, J, E., y Advenier, C. (1999). **Pharmacological and biochemical study on the effects of selective phosphodiesterase inhibitors on human term myometrium.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 360: 457-63.

Beavo, A, J. (2014). **Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Functional Implications of Multiple Isoforms.** *Physiological Reviews*. 75(4): 725-747.

Berg, G., Andersson, RG., y Rydén, G. (1983). **In vitro study of phosphodiesterase-inhibiting drugs: a complement to beta-sympathomimetic drug therapy in premature labor?.** *Europe PubMed Central*. 145: 802-806.

Bernal, L, A. (2007). **The regulation of uterine relaxation.** *Cell & Developmental Biology*. 18: 340-347.

Beyer, C, E. (1993) **Gap junctions.** *International Review of Cytology*. 137C: 1-37.

Bootman, D, M., y Berridge, J, M. (1995). **The elemental principles of calcium signaling.** *Cell*. 83: 675–678.

Buhimschi, I., Ali, M., Jain, V., Chwalisz, K., y Garfield, E, R. (1996). **Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour.** *Human Reproduction*. 11: 1755–1766.

Buxton, I, L. (2004). **Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation.** *Molecular Pharmacology*. 65: 1051-1059.

Chang, X., y Stewart, K. (2011). **What is the functional role of the thalidomide binding protein cereblon?** *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2: 287-294.

Chanrachakul, B., Broughton, P, F., Warren, A, Y., Arulkumaran, S., Khan, R, N.(2005). **Progesterone enhances the tocolytic effect of ritodrine in isolated pregnant human myometrium.** *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 192: 458–463.

Clark, S, M., Steinbach, A., y Clemmons, A, B. (2014). **Pomalidomide for the treatment of multiple myeloma.** *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology.* 5: 51-56.

Conde-Agudelo, A., Romero, R., Kusanovic, P. J. (2012). **Nifedipine for the management of preterm labor: a systematic review and metanalysis.** *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 204:1-31.

Coleman, A, R., Smith, L, W., y Narumiya, S. (1994). **International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes.** *Pharmacological Reviews.* 46: 205–229.

Conti, M., Richter, W., Mehats, C., Livera, G., Park, J-Y., y Jin, C. (2002). **Cyclic AMP-specific PDE4 Phosphodiesterases as Critical Components of Cyclic AMP Signaling.** *The Journal of Biological Chemistry.* 278: 5492-5496.

Crowther, C, A., Hiller, J, E., Doyle, L, W., Haslam R, R., *et al.* (2003). **Before Preterm Birth: A Randomized Controlled Trial Effect of Magnesium Sulfate Given for Neuroprotection.** *American Medical Association.* 290: 2669-2676.

DeCherney, H, A., y Nathan, L. (2002). **Diagnóstico y tratamiento ginecobstétricos.** 8 Edición. Manual moderno, México D.F. pp. 317-322.

Döring, B., Shynlova, O., Tsui, P., Eckardt, D., Janssen-Bienhold, U., Hofmann, F., Feil, S., Feil, R., Lye, S. J., y Willecke, K. (2006). **Ablation of connexin43 in uterine smooth muscle cells of the mouse causes delayed parturition.** *Journal of Cell Science.* 119: 1715–1722.

Dredge, K., Marriott, J.B., Dalgleish, A.G. (2002). **Immunological effects of thalidomide and its chemical and functional analogs.** *Critical Reviews in Immunology.* 22: 425-37.

Dudley, J, D. (1997). **Pre-term labor: an intra-uterine inflammatory response syndrome.** *Journal of Reproductive Immunology.* 36: 93-109.

Fetalvero, K.M., Zhang, P., Shyu, M., Young, B.T., Hwa, J., Young, R.C., y Martin, K.A. (2008). **Prostacyclin primes pregnant human myometrium for an enhanced contractile response in parturition.** *The Journal of Clinical Investigation.* 118: 3966-3979.

Fernández-Martínez, E. (2011). **Thalidomide and its analogs: a potential immunomodulatory alternative for treating liver diseases and cirrhosis**, en: *Liver Cirrhosis: Causes, Diagnosis and Treatment*. Editor: (M. L, Michelli, Ed). Nova Science Publishers, Nueva York, Estados Unidos, pág. 1-30.

Franova, S., Janicek, F., Visnovsky, J., Dokus, K., Zubor, P., Sutovska, M., y Nosalova, G. (2009). **Utero-relaxant effect of PDE4-selective inhibitor alone and in simultaneous administration with β_2 -mimetic on oxytocin-induced contractions in pregnant myometrium**. *Journal of Obstetrics & Gynaecology Research*. 35: 20-25.

Gáspár, R., y Hajagos-Tóth, J. (2013). **Calcium Channel Blockers as Tocolytics: Actions, Adverse Effects and Therapeutic Combinations**. *Pharmaceuticals*. 6: 690-699.

Granger, E, S., Hollingsworth, M., y Weston, H, A. (1986) **Effects of calcium entry blockers on tension development and calcium influx in rat uterus**. *British Journal of Pharmacology*. 87: 147-156.

Grześk, G., Szadujkis-Szadurska, K., Matusiak, G., Malinowski, B., Gajdus, M., Wiciński, M., y Szadujkis-Szadurski, L. (2014). **Influence of celecoxib on the vasodilating properties of human mesenteric arteries constricted with endothelin-1**. *Biomedical Reports*. 2: 412-418.

Guillén, C, C., Malagón, V, G., Tlapanco, V, J., Carrera, M, R., y Malagón, V, JA. (2005). **Factores de riesgo materno asociados al parto pretérmino**. *Revista Médica IMSS*. 43: 339-342.

Hass, M, D., Benjamin, T., Sawyer, R., y Quinney, K, S. (2014). **Short-term tocolytics for preterm delivery – current perspectives**. *International Journal of Women's Health*. 6: 343–349.

Hervé, R., Schmitz, T., Evain-Brion, D., Cabrol D., Leroy, M-J., y Méhats, C. (2008). **The PDE4 Inhibitor Rolipram Prevents NF- κ B Binding Activity and Proinflammatory Cytokine Release in Human Chorionic Cells**. *Journal of Immunology*. 181: 2196-2202.

Houslay MD, Schafer P, Zhang KY (2005). **Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target**. *Drug Discovery Today*. 10: 1503-1519.

How, Y, H., y Sibai, M, B. (2009). **Progesterone for the prevention of preterm birth: indications, when to initiate, efficacy and safety**. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 5: 55–64.

Huey-Chuan, S., Chun-Sen, H., y Ling-Ling, Y. (2009). **In vitro study of the tocolytic effect of oroxylin A from *Scutellaria baicalensis* root**. *Journal of Biomedical Science*. 16: 1-7.

Ijjaali, I., Barre, C., Nargeot, J., Petitet, F., y Bourinet, E. (2007). **Ligand-Based Virtual Screening to Identify New T-type Calcium Channel Blockers.** *Landes Bioscience.* 4: 300-304.

Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., Handa, H. (2010). **Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity.** *Science.* 327: 1345-1350.

Kalant, H., y Raschlau W, H, E. (2002). **Principios de farmacología médica,** Edición 6. México 484-485

Kinney, M, V., Howson, C, P., McDougall, L., y Lawn, J, E. (2012). **Nacidos Demasiado Pronto: Informe de Acción Global sobre Nacimientos Prematuros.** PMNCH, Save the Children, Organización Mundial de la Salud.

Klukovits, A., Márki, A., Páldy, E., Benythe, S., Gálik, M., Falkay, G., Gáspár, R. (2009). **Inflammatory processes enhance cAMP-mediated uterus relaxation in the pregnant rat: the role of TNF- α .** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 379: 501-510.

Leroy, M-J., Cedrin, I., Breuiller, M., Giovagrandi, Y., y Ferré, F. (1989). **Correlation between selective inhibition of the cyclic nucleotide phosphodiesterases and the contractile activity in human pregnant myometrium near term.** *Biochemical Pharmacology.* 38: 9–15.

List, F, A. (2006). **Evolving Applications of Lenalidomida in Management of Anemia in Myelodysplastic Syndromes.** *Cancer Control.* 13:12-16.

López-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. (2012). **Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide.** *Leukemia.* 26:2326- 2335.

Luu, T.M., Ment, L.R., Schneider, K.C., Katz, K.H., Allan, W.C., y Vohr, B.R. (2009). **Lasting effects of preterm birth and neonatal brain hemorrhage at 12 years of age.** *Pediatrics.* 123: 1037-1044.

Marriott, J.B., Clarke, I.A., Dredge, K., Muller, G., Stirling, D., y Dalgleish, A.G. (2002). **Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF- α and TNFR2 during co-stimulation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells.** *Clinical & Experimental Immunology.* 130: 75-84.

Marriott, J.B., Clarke, I.A., Czajka, A., Dredge, K., Childs, K., Man, H.W., Schafer, P., Govinda, S., Muller, G.W., Stirling, D.I., y Dalgleish AG. (2003). **A novel subclass of thalidomide analogue with anti-solid tumor activity in which**

caspase-dependent apoptosis is associated with altered expression of bcl-2 family proteins. *Cancer Research.* 63: 593-9.

Matthew, A., Shmygol, A., y Wray, S. (2004). **Ca²⁺ entry, efflux and release in smooth muscle.** *Biological Research.* 37:617-24.

Meckes M, Calzada, F., Paz, D., Rodríguez, J., Ponce-Monter, H. (2002). **Inhibitory effect of xanthomicrol and 3 alpha-angeloyloxy-2 alpha-hydroxy-13,14Z-dehydrocativic acid from *Brickellia paniculata* on the contractility of guinea-pig ileum.** *Planta Medica.* 68: 467-469.

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

Méhats, C., Tanguy, G., Paris, B., Robert, B., Pernin, N., Ferré, F., y Leroy, MJ. (2000). **Pregnancy induces a modulation of the cAMP phosphodiesterase 4-conformers ratio in human myometrium: consequences for the utero-relaxant effect of PDE4-selective inhibitors.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 292: 817-23.

Méhats, C., Oger, S., y Leroy, MJ. (2004). **Cyclic nucleotide phosphodiesterase-4 inhibitors: a promising therapeutic approach to premature birth?.** *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 117: S15-S17.

Morrow, T. (2014). **First oral medication ok'd to fight psoriatic arthritis.** *Managed Care.*23: 51-52.

Mosler, H, K., Linka, F., Dornhofer, H., y Ehrhart. (1974). **Tocolytic therapy in obstetrics.** *Journal of Perinatal Medicine.* 2: 3-16.

Muller, G.W., Shire, M.G., Wong, L.M., Corral, L.G., Patterson, R.T., Chen, Y., Stirling, D.I., (1998). **Thalidomide analogs and PDE4 inhibition.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 8: 2669-2674.

Nikbakht, R., Mogham, T, M., y Ghane, H. (2014). **Nifedipine compared to magnesium sulfate for treating preterm labor: A randomized clinical trial.** *Iranian Journal of Reproductive Medicine.* 12:145-150.

Norwitz, E. R., y Robinson, J. N. (2001). **A Systematic Approach to the Management of Preterm Labor.** *Seminars in Perinatology.* 25: 223-235.

Oger, S., Méhats, C., Barnette, S, M., Ferré, F., Cabrol, D., y Leroy JM. (2004). **Anti-inflammatory and Utero-Relaxant Effects in Human Myometrium of New Generation Phosphodiesterase 4 Inhibitors.** *Biology of Reproduction.* 70: 458-464.

Parra, J., Cantabrana, B., Hidalgo, A. (2000). **Mechanism of mifepristone-induced spasmolytic effect on isolated rat uterus.** *Life Sciences.* 66: 26: 2563-2569.

Parra-Ruiz, P, A. (2004). **Historia de la ginecología: pasado, presente y futuro de las progestinas.** *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 55: 167-173.

Pérez-Hernández, N., Ponce-Monter, H., Medina, JA., Joseph-Nathan, P. (2008). **Spasmolytic effect of constituents from *Lepechinia caulescens* on rat uterus.** *Journal of Ethnopharmacology.* 115: 30-5.

Pérez, V, JR., Cantabrana, B., Hidalgo, A. (1995). **Calcium-and G-protein-related spasmolytic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on rat uterus contractions in vitro.** *Pharmacology.* 50: 324-32.

Perusquía, M., y Navarrete, E. (2005). **Evidence that 17alpha-estradiol is biologically active in the uterine tissue: Antiuterotrophic action.** *Reproductive Biology and Endocrinology.* 3:1-11.

Phillippe, M., y Chein, K, E. (1995). **Potassium chloride effects on hormonal signal transduction mechanisms underlying phasic myometrial contractions.** *Journal of Endocrinology.* 146: 485-493.

Ponce-Monter, H., Campos, MG., Pérez, S., Pérez, C., Zavala, M., Macías, A., Oropeza, M., Cárdenas, N. (2008). **Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus.** *Journal Fitoterapia.* 79: 446-50.

Ponce-Monter, H., Fernández-Martínez, E., Ortiz I, M., Ramírez-Montiel, M., Cruz-Elizalde, D., Pérez-Hernández., y Cariño-Cortés R. (2010). **Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, in vitro and in vivo studies.** *Journal of Smooth Muscle Research.* 46(6):309-19.

Preston, R, R., y Wilson, T. (2013). **Fisiología.** Lippincott Williams & Wilkins. Edición 1. Barcelona (España), Cap. 14, pp 153-162.

Ratcliffe M, J., y Dougall, I, G. (2012). **Comparison of the anti-inflammatory effects of Cilomilast, Budesonide and a p38 Mitogen activated protein kinase inhibitor in COPD lung tissue macrophages.** *BMC Pharmacology & Toxicology.* 13: 1-7.

Riemer, K, R., y Heymann, A, M. (1998). **Regulation of uterine smooth muscle function during gestation.** *Pediatric Research.* 44: 615–627.

Riemer, K, R., Goldfien, C, A., Goldfien, A., y Roberts, M, J. (1986). **Rabbit uterine oxytocin receptors and *in vitro* contractile response: abrupt changes at term and the role of eicosanoids.** *Endocrinology*. 119: 699–709.

Sánchez-Saldaña, L. (2008). **Medicamentos antiguos y vigentes en la dermatología.** *Dermatología Peruana*. 18: 229-261.

Schafer, H, P., Parton, A., Capone, L., Cedzik, D., Brady, H., Evans, F, J., Man, H-W., Muller, D, I., y Chopra, R. (2014). **Apremilast is selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity.** *Cellular Signalling*. 26: 2016-2029.

Schmitz, T., Souil, E., Hervé, R., Nicco, C., Batteux, F., Germain, G., Cabrol, D., Evain-Brion, D., Leroy MJ. Y Méhats, C. (2007). **PDE4 Inhibition Prevents Preterms Delivery Induced by an Intrauterine Inflammation.** *Journal of Immunology*. 178: 1115-1121.

Shin, JY., Park, YW., Yoon, BH., Cho, YK., Yang, JH., Lee, Y., y Kim, A. (2006). **Multicentre, parallel group, signaling, single-blind study of the safety and efficacy of atosiban versus ritodrine in the treatment of acute preterm labour in Korean women.** *General Obstetrics*. 113: 1228-1234.

Sladek, M, S., Magness R, R., y Conrad, P, K. (1997). **Nitric oxide and pregnancy.** *American Journal of Physiology*. 272: R441–R463.

Somlyo, P, A., y Somlyo, V, P. (1994). **Signal transduction and regulation in smooth muscle.** *Nature*. 372: 231-236.

Spina, D. (2008). **PDE4 inhibitors: current status.** *British Journal of Pharmacology*. 155: 308-315.

Stein, G, P., y Driska, P, S. (1984). **Histamine-induced rhythmic contraction of hog carotid artery smooth muscle.** *Circulation Research*. 55: 480-485.

Tan, T, C., Devendra, K., Tan, L, K., y Tan, H, K. (2006). **Tocolytic treatment for the management of preterm labour: a systematic review.** *Singapore Medical Journal*. 47: 361-366.

Taggart, M.J., Europe-Finner, G.N., y Mitchell, B.F. (2008). **Possible dual roles for prostacyclin in human pregnancy and labor.** *The Journal of Clinical Investigation*. 118: 3829-3832.

Teo, K, S., Stirling, I, D., y Zeldis, B, J. (2005). **Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product.** *Drug Discovery Today*. 10:107-114.

Teixeira, M, M., Gristwood, R, W., Cooper, N., y Hellewell, P, G. (1997). **Phosphodiesterase (PDE4) inhibitors: Anti-inflammatory drugs of future?.** *Trends in Pharmacological Sciences*. 18:164-170.

The European Atosiban Study Group. (2001). **The oxytocin antagonist atosiban versus the β -agonist terbutaline in the treatment of preterm labor a randomized, double-blind, controlled study.** *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 80: 413–422.

Torphy, T, J. (1998) **Phosphodiesterase isoenzymes—molecular targets for novel antiasthma agents.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 157: 351–370.

Trujillo, M, M., Ausina, P., Savineau, J-P., Marthan, R., Strippoli, G., Advenier, C., Pinto, M, F., y Candenias, L, M. (2000). **Cellular mechanisms involved in iso-osmotic high K⁺ solutions-induced contraction of the estrogen-primed rat myometrium.** *Life Sciences*. 66: 2441-2453.

Vasta, V., y Beavo, J. (2004). **Functions and Pharmacological Inhibitors of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases.** *Cell Transmissions*. 20: 2-8.

Vause, S., y Johnston. (2006). **Management of preterm labour.** *Archives of Disease in Childhood*. 83: F79-F85.

Webb, C, R. (2003). **Smooth muscle contraction and relaxation.** *Advances in Physiology Education*. 27: 201-206

Wex, J., Connolly, M., y Rath, W. (2009). **Atosiban versus betamimetics in the treatment of preterm labour in Germany: an economic evaluation.** *BMC Pregnancy and Childbirth*. 9: 1-9.

Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group.(2001). **Effectiveness and safety of the oxytocin antagonist atosiban versus beta-adrenergic agonists in the treatment of preterm labour.** *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 108: 133-142.

Yoon, B. H., Park, C, W., y Chaiworapongsa T. (2003). **Intrauterine infection and the development of cerebral palsy.** *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 110: 124–127.

Yuan, W., y Bernal., L, A. (2007). **Cyclic AMP signaling pathways in the regulation of uterine relaxation.** *BMC Pregnancy and Childbirth*. 7: 1-6

10. GLOSARIO

1,4,5-Trisfosfato de Inositol: 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.

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).

Agonista: Es aquella sustancia que es capaz de unirse a un receptor celular y provocar una acción determinada en las células generalmente similar a la producida por una sustancia fisiológica.

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.

Antagonista: Es aquella sustancia que se adhiere a un receptor celular sin activarlo, interfiriendo en la función de otra sustancia mediante mecanismos de competencia.

Antiangiogénicos: Son agentes químicos o biológicos que inhibe o reduce de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes.

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 Ca²⁺ 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.

Cl₅₀: 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 de la cadena ligera de miosina: Es una cinasa de proteína en el residuo serina/treonina, específica y dependiente de calcio/calmodulina, está implicada en la contracción del músculo liso vía la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina.

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

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).

Eficacia farmacológica: El grado de efecto máximo de un fármaco.

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.

Estímulo electromecánico: Consiste en la despolarización de la membrana mediante la utilización de un estímulo alto en KCl.

Estímulo farmacomecánico: Estímulo farmacomecánico: consiste en el acople de agonistas uterotónicos a su receptor y la activación de pG_q principalmente que desencadena la maquinaria fisiológica necesaria para la contracción muscular.

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

Hipertensión: Presión arterial muy alta.

Hipotensión: Presión arterial muy baja.

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.

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.

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 **cadena ligeras**.

NF-κB: 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.

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.

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.

Potencia farmacológica: Es una medida relativa de comparación donde se requiere una cantidad o dosis de un fármaco para alcanzar el mismo efecto que otro

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.

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.

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_{máx}: Es la concentración o proporción necesaria para alcanzar el mayor efecto de una sustancia dada.

Sarcómero: Es la unidad anatómica y funciona de la contracción muscular. Se encuentra limitada por dos líneas Z con una zona A y dos semizonas I. Formada por las proteínas contráctiles miosina y actina.

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.

Soluciones isotónicas: Son aquellas que tiene la misma concentración de solutos afuera y adentro de las células

Taquicardia: Es el incremento de la frecuencia cardíaca.

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.

Tromboembolismo: Es la obstrucción de un vaso sanguíneo por un trombo o un coagulo que es arrastrado en la corriente sanguínea hasta el cerebro provocando la embolia.

Uterotónicos: Son agentes que generan o desencadenan las contracciones del músculo liso uterino por ejemplo oxitocina, prostaglandina F_{2 α} .