



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA**

**SECRETARÍA DE SALUD DE HIDALGO
HOSPITAL GENERAL DE PACHUCA**

TEMA

**MECANISMO DE ACCIÓN EMPLEADO EN EL EFECTO RELAJANTE DE DOS
ANÁLOGOS DE LA TALIDOMIDA EN MÚSCULO UTERINO HUMANO**

**QUE PRESENTA EL MÉDICO CIRUJANO
ROMÁN JOAQUÍN MARTÍNEZ SANTOS**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA**

**DR. GUILLERMO BARRAGÁN RAMÍREZ
MÉDICO ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
PROFESOR TITULAR DEL PROGRAMA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
ASESOR CLÍNICO**

**DR. HÉCTOR ANTONIO PONCE MONTER
DOCTOR EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
ASESOR METODOLÓGICO**

**DR. MARIO ISIDORO ORTÍZ RAMÍREZ
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA
ASESOR UNIVERSITARIO**

**PERIODO DE LA ESPECIALIDAD
2008 – 2012**

-POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

M. C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL
DIRECTOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS
DE LA SALUD DE LA U.A.E.H

DR. LUIS CARLOS ROMERO QUEZADA
JEFE DEL AREA ACADEMICA DE MEDICINA
DEL I.C.Sa.

DR. ERNESTO FRANCISCO GONZALEZ HERNANDEZ
COORDINADOR DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DEL I.C.Sa.

DRA. LOURDES CRISTINA CARRILLO ALARCÓN
CATEDRÁTICO TITULAR Y ASESOR EN METODOLOGÍA
DE LA INVESTIGACIÓN

DR. MARIO ISIDORO ORTÍZ RAMÍREZ
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA
ASESOR UNIVERSITARIO

DR. HÉCTOR ANTONIO PONCE MONTER
DOCTOR EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
ASESOR METODOLOGICO

**POR EL HOSPITAL GENERAL DE PACHUCA DE LA SECRETARIA DE
SALUD DE HIDALGO**

DR. FRANCISCO JAVIER CHONG BARREIRO
DIRECTOR DEL HOSPITAL GENERAL DE PACHUCA
DE LA SECRETARÍA DE SALUD DE HIDALGO

DRA. MICAELA MARICELA SOTO RIOS
SUBDIRECTORA DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
DEL HOSPITAL GENERAL DE PACHUCA
DE LA SECRETARÍA DE SALUD DE HIDALGO

DR. GUILLERMO BARRAGÁN RAMÍREZ
MÉDICO ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
PROFESOR TITULAR DEL PROGRAMA EN
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
ASESOR CLÍNICO

ÍNDICE

	Página
I. Antecedentes científicos	1
I.1. Manejo de la amenaza de parto pre término	4
I.2. Inhibidores de fosfodiesterasas y relajación de músculo liso uterino	8
I.3. Adenilil ciclasas y sus reguladores	10
I.4. Fosfodiesterasas y sus reguladores	11
I.5. Análogos de Talidomida	14
II. Planteamiento del problema	18
III. Objetivos del estudio	20
IV. Glosario	21
V. Descripción general del estudio	22
VI Hallazgos	26
VI.1. Análisis estadístico	26
VI.2. Descripción de los resultados	27
VII. Discusión	37
VIII. Conclusiones	41
IX. Bibliografía	44
X. Anexo x	58

AGRADECIMIENTOS

A un ser supremo por darme la oportunidad de ser Ginecólogo y ayudar a mis semejantes

A mis padres (JOSEFINA Y JOSE BELEM) y hermanos (JUAN JOSÉ Y LETICIA), quien sin escatimar esfuerzo alguno, han estado siempre a mi lado,

A mi pequeña (KARLA AURORA), quien siempre a estado a mi lado a quien amo y admiro, este logro es para ti, gracias amor

A mis Hijos (ROMAN, LUIS, LEONARDO, KENDRA), quienes son la fuerza, esperanza y motivo para seguir siempre adelante

A ti compadrito Dr. Luis Lagarde Campos, por tu amistad y por haber guiado mis pasos siempre en el ámbito profesional

A mis grandes maestros y amigos del servicio de Ginecología y obstetricia, Mil gracias.

A el departamento de Biología de la Reproducción UAEH, mil gracias por todo

I. Antecedentes científicos

El parto pre término se define como la expulsión del producto del organismo materno de 28 semanas a menos de 37 semanas de gestación (determinado a partir del primer día de la última menstruación o por estimación de la edad fetal por ultrasonido)¹. Para realizar el diagnóstico, es necesario que se presenten contracciones uterinas regulares y cambios en el cuello del útero. La etiopatogenia de parto pre término abarca los siguientes procesos: infección, isquemia útero placentaria, trastornos hormonales, distensión uterina excesiva, y la incompetencia cervical. La inflamación es el proceso básico patogénico de parto pre término. Numerosos trabajos muestran evidencia de la relación entre los diversos mecanismos, la activación de un proceso inflamatorio y el parto pretérmino.²⁻⁵

El parto pre término es un problema no sólo obstétrico sino también neonatal, ya que se asocia con un alto índice de problemas para el recién nacido, incluyendo la muerte del mismo.^{6,7} El parto pre término aparece en el 5-10% de todos los embarazos.¹ El parto pre término: Se define como el parto que se produce entre las 28 y menos de las 37 semanas de embarazo.¹ El parto con producto inmaduro, es el parto que ocurre entre las 21 y las 27 semanas de embarazo (NOM 007, 1993)¹. El aborto se define como la expulsión del producto de la concepción de menos de 500 gramos de peso o hasta 20 semanas de gestación.¹ La amenaza de parto pre término: Es la aparición de contracciones uterinas propias del trabajo de parto en pacientes con membranas íntegras entre las 28 y menor de las 37 semanas de embarazo, con pocas modificaciones del cuello uterino.^{1 - 3, 8 - 13}

El parto pre término continúa siendo una de las complicaciones más frecuentes en la obstetricia, a pesar de los grandes avances de la medicina moderna, por lo que

constituye un reto y punto de atención continua para el obstetra. Los avances en los cuidados prenatales durante las últimas décadas en países desarrollados, en especial en la detección del "embarazo de alto riesgo", han permitido disminuir la morbilidad perinatal, sin embargo es poco lo que se ha logrado disminuir la frecuencia de prematuridad. La identificación oportuna de factores de riesgo de parto prematuro es imprescindible para instituir un tratamiento adecuado y así poder entregar al pediatra productos de mayor madurez y peso, y a la madre un bebé sano, como es el objetivo final de la obstetricia.^{2-3, 8-13}

Las principales causas de acortamiento de la duración del embarazo (partos de pre término), y que están fuertemente asociadas a los tres grandes factores ambientales, socioeconómicos y educacionales son: ^{2-3, 8-13}

- a) Desnutrición (materno fetal). Desnutrición: se relaciona frecuentemente con déficit de aporte proteico de menos de 50 g diarios. Lo mismo se menciona en anemia menor de 11 g.
- b) la infección (materna, ovular, fetal, neonatal).
- c) El embarazo múltiple.
- d) La rotura prematura de las membranas.
- e) La prematuridad iatrogénica por inducción o por cesárea anticipada.
- f) La hipertensión crónica o inducida por el embarazo.
- G)El Poli hidramnios.
- h) El esfuerzo físico y el estrés psíquico.
- i) Las alteraciones útero cervicales (malformaciones, miomas, incompetencia ístmico cervical).
- j) Defectos congénitos.

- k) Condición socioeconómica deficiente, que está estrechamente relacionada con desnutrición.
- l) Falta de asistencia prenatal especializada
- m) Trabajo profesional fatigante o de esfuerzos importantes.
- n) Embarazo no deseado
- ñ) Madre soltera.
- o) Edad de la madre (menores de 20 y mayores de 30 años).
- p) Talla materna; frecuente en pacientes con talla menor de 1.50 m.
- q) Paridad: relativamente más frecuente en primigestas.
- r) Intervalo intergenésico: menores de dos años.
- s) Peso menor antes del embarazo: menor de 45 kg.
- t) Hábito alcohólico y tabaquismo: se ha visto que la hipoxemia condiciona placentas pequeñas, desprendimiento de placenta, ruptura prematura de membranas. Lo mismo se ha visto en grandes consumidores de café y adictas a narcóticos.
- u) Partos prematuros repetidos: se ha observado que cuando hay uno o más partos prematuros y más de un aborto, se llegan a presentar nuevos partos prematuros hasta en un 18 %.
- v) Enfermedades maternas: aquí se incluyen todos los padecimientos que complican la gestación, y que como resultado dan una insuficiencia placentaria que conduce a hipoxia fetal crónica y un menor aporte de nutrientes necesarios para el desarrollo normal del feto, y que en algunos casos imposibilitan llevar a término la gestación por indicación médica precisa como único medio de

salvaguardar la vida a la madre y/o al producto. En este grupo están los factores de complicaciones obstétricas mencionadas en el primer grupo.^{2 - 3, 8 - 13}

I.1 Manejo de la amenaza de parto pre término

Se debe realizar un examen genital completo. Colocar a la paciente en reposo en decúbito lateral en ambiente aislado y tranquilo. Se inicia colocación de solución salina endovenosa a razón de 100 ml/hora .La rápida expansión intra vascular puede disminuir las contracciones en un útero irritable.⁸

Ritodrine

La indicación del uso de Ritodrine (u otro betamimético) está limitada al manejo de un parto pre término sin otras complicaciones entre 28 y 37 semanas. La bibliografía sugiere que se reduce el número de partos en las primeras 48 horas desde el comienzo del tratamiento pero no se observó reducción en las reacciones adversas y la mortalidad perinatal. ^{14 . 16} Sin embargo, es el tiempo suficiente para administrar corticoides o derivar a un centro de mayor complejidad. Se deben seguirlas estrictas normas de administración y dosis para evitar efectos adversos, incluidos edema pulmonar e isquemia de miocardio.^{14,15,16} La dosis recomendada es de 50 µg/min en solución de dextrosa al 5% incrementando cada 20 minutos (se suspende ante la aparición de efectos secundarios como taquicardia, hiperglucemia, disnea, erupción cutánea, entre otros) hasta que se obtiene la quiescencia uterina, con una infusión máxima de 350 µg/min. Una vez que las contracciones han sido inhibidas, la infusión es mantenida por 60 minutos y luego comienza la disminución a razón de 50 µg cada 30 minutos hasta que se obtiene

el nivel más bajo (50 µg/min). La infusión es mantenida por 12 h repitiéndose el proceso si reaparecieran las contracciones.^{14 - 17}

Terbutalina

No está aprobada por la FDA para su uso específico en amenaza de parto pre término, pero existe significativa evidencia de su seguridad y eficacia.^{18 -21} La infusión IV comienza generalmente con 2.5 a 5 µg/min y se incrementa 5 µg cada 20 minutos hasta un máximo de 25 µg/min. Una vez que las contracciones han sido inhibidas, el goteo se mantiene 60 minutos y luego se comienza la reducción de la dosis en 2.5 µg/min cada 30 minutos hasta que se establezca la menor dosis efectiva. Esta dosis es mantenida por 12 horas.^{18 -21}

Nifedipina

Es un bloqueador de los canales de calcio más comúnmente utilizado en tocolisis. Actúa por disminución del calcio intracelular. Se administra por vía oral y rápidamente es absorbido por la mucosa gastrointestinal. La concentración plasmática máxima ocurre entre los 15 y 90 minutos después de su administración. La vida media de la nifedipina es de 81 minutos y la duración de su acción es de alrededor de 6 horas. Un régimen recomendado para el tratamiento de la amenaza de parto prematuro es administrar oralmente 10 mg cada 20 minutos 4 dosis, seguida de 20 mg vía oral cada 4-8 h.²² En un meta-análisis que comparó el efecto tocolítico de la nifedipina vs. agonistas beta adrenérgicos, Tsatsaris y col.²³

Concluyeron que la nifedipina era más efectiva que los beta-agonistas en retrasar el nacimiento pre término más allá de las 48 h. El tratamiento debió ser interrumpido menos frecuentemente a causa de efectos secundarios, observándose menor tasa de síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido y menor internación en unidades de cuidado intensivo neonatal.²³

Atosibán

Es un antagonista de receptores de oxitocina. La ventaja de Atosibán es que tiene efecto altamente órgano-específico, su efectividad ha sido similar a nifedipina o a agonistas beta adrenérgicos, y se ha encontrado que sus efectos colaterales son mínimos.^{24, 25} Se administra en forma de bolo IV de 6.75 mg seguido inmediatamente por 300 µg/min en infusión IV por 3 horas y luego 100 µg/min por más de 45 h.²⁴ En un estudio realizado por Romero et al.²⁴ asignó al azar a mujeres embarazadas con trabajo de parto prematuro para recibir Atosibán (n = 246, un bolo de 6.75 mg seguido por una dosis de mantenimiento de 100 a 300 mg/min durante 1 a 48 horas, luego continuaron con 30 mg/min hasta las 36 semanas) o un placebo (n = 255). En general, el grupo de mujeres que duraron más tiempo sin trabajo de parto y que no recibieron otro fármaco tocolítico fue el grupo que recibió Atosibán (p <0.01).

Donadores de óxido nítrico

La nitroglicerina activa el monofosfato de guanosinacíclico que resulta en una disminución del calcio libre intracelular con la consecuente disminución de la contractilidad miometral. El régimen trans dérmico consiste en un parche de 10 mg de trinitrato de glicerol aplicado sobre la piel del abdomen. Si después de 1 hora no se observa reducción en la frecuencia de la contracción, se aplica un parche adicional y se remueve a las 24 horas.^{26 - 28}

Sulfato de magnesio

Actuaría por inhibición competitiva de calcio. Administración vía IV, IM y oral. La recomendación consiste en una dosis inicial de 6 g IV en 20 minutos seguido por infusión continua de 3 a 4 g/ hora. La toxicidad materna puede ser evaluada por medios clínicos (hiporreflexia, disminución de la frecuencia respiratoria, disminución de la diuresis) y por evaluación de concentraciones séricas de magnesio. En caso de intoxicación debe utilizarse gluconato de calcio (1 g IV).²⁷⁻²⁹

Indometacina

Es un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. Puede ser administrada por vía oral o rectal, 50 a 100 mg. Seguida por 25 mg cada 4 a 6 horas, durante un lapso no mayor a 48 h. Se usa en pacientes con falta de respuesta al tratamiento β -mimético, cuya ecografía actualizada haya demostrado un volumen normal de líquido amniótico y en amenorreas menores a las 32 semanas. Se deberá realizar ecocardiograma fetal. Sólo la indometacina mostró disminución de la tasa de prematuros.^{30 - 35}

1.2 Inhibidores de fosfodiesterasas y relajación de músculo liso uterino

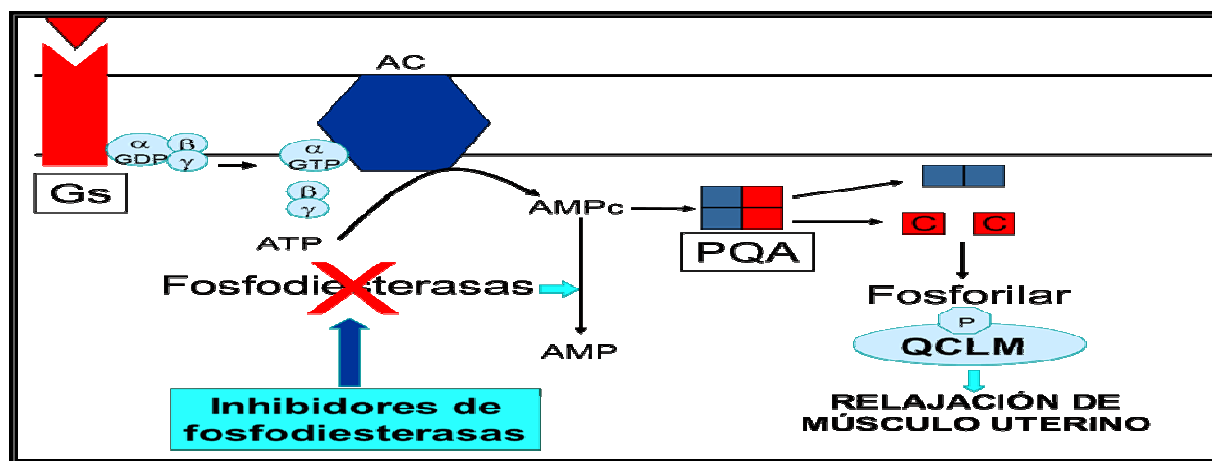
El AMP cíclico es un segundo mensajero intracelular que se difunde, lo que influye en muchos acontecimientos fisiológicos, como la activación de proteína quinasas, transporte de calcio y regulación de la activación de genes. Su función en la relajación del músculo liso uterino y otros tipos de músculo liso, se cree que es a través de la inhibición de la movilización de calcio y el aparato contráctil³⁶, a través de la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PQA), que fosforila proteínas diana, como la quinasa de la cadena ligera de la miosina (QCLM)³⁷ y la fosfolipasa C (PLC) (figura 1).³⁸ Sin embargo, la identificación de los sustratos de la PQA en miometrio humano es un área difícil de investigación y se requiere más información antes de que el mecanismo de relajación de los nucleótidos cíclicos se entienda del todo bien.

La adenililciclase (AC) cataliza la conversión de ATP a AMPc en respuesta a las acciones de hormonas y medicamentos que actúan sobre receptores de la superficie celular acoplados a proteínas G. El AMPc sintetizado se hidroliza por una familia de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE). La actividad de la AC en el miometrio es inducida por los agonistas endógenos (catecolaminas, prostaglandinas, etc.) que actúan a través de receptores acoplados a proteínas Gs, por ejemplo los receptores β 2-adrenérgicos o los receptores a prostaglandina E2.³⁹

La AC activada elimina una molécula de pirofosfato de ATP para convertir al AMPc y lo libera en el citoplasma. El AMPc activa a la PQA al unirse a su subunidades catalíticas. Cambios espaciales y temporales en los niveles de AMPc se pueden

traducir en respuestas compartimentadas por las proteínas PQA, que también se unen a otras proteíno quinasas y a las isoformas de PDE para regular una variedad de actividades, incluyendo la fosforilación de retroalimentación de la señalización de la AC.⁴⁰ La concentración de AMPc se reduce rápidamente por hidrólisis por las PDE. Regulación de PDE, especialmente la isoforma PDE4 (la isoforma más abundante en el miometrio), es una atractiva área de estudio debido a su potencial como un nuevo objetivo para la tocolisis. Varias formas largas de PDE4 están implicadas en la rápida señalización del AMPc, a través de la activación de PQA por fosforilación en dominios conservados, mientras que las formas cortas de PDE4 están asociadas con respuestas a largo plazo del AMPc, como la transcripción de genes. Por otra parte, la prostaglandina E2 regula la actividad de PDE, mediante la inducción de la síntesis de las isoformas cortas de PDE4 corto.⁴¹

Figura 1. Mecanismo de acción de los inhibidores de la fosfodiesterasa.



Gs= receptor acoplado a una proteína Gs. AC=adenililciclasa. PQA= proteína quinasa A. C= unidad catalítica de la PQC.
QCLM= Quinasa de la cadena ligera de la miosina.

Fuente: Yuan W, López Bernal A. Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. BMC Pregnancy Childbirth. 2007; 7: S10.

1.3 Adenililciclasas y sus reguladores

La AC es una familia de enzimas diferentes implicadas en la síntesis de AMPc. El núcleo catalítico de la AC de mamíferos consta de un heterodímeroseudo-simétrico compuesto de 2 regiones o subunidades citosólicas, conocidas como C_{1a} y C_{2a}, a las que se puede unir la proteína Gs y el ATP. Todas las isoformas de AC son activados por la subunidad α de la proteína Gs (G α s) y la mayoría son activadas directamente por el diterpeno forskolina, que es una herramienta útil para los estudios funcionales.^{42,43} Las subunidades C_{1a} y C_{2a} solas son suficientes para la generación de AMPc.^{44, 45}

Hasta ahora, nueve isoformas de mamíferos de la AC han sido identificados y asignados a cada uno de los cuatro subgrupos, de acuerdo con sus modos de regulación.^{42, 46} Todas las isoformas son activadas por G α s, uniéndose inicialmente a una región hidrofóbica con carga negativa en un dominio de la subunidad C_{2a}.⁴³ Debido a que el sitio de interacción de G α s con AC está lejos al sitio catalítico, se ha sugerido que el mecanismo más probable para la activación por G α s implica una modulación de la estructura del sitio activo por la inducción de un cambio conformacional. Todas las ACs, excepto la isoforma AC9, que carece de residuos de serina y leucina, pueden ser activadas por forskolina, que se une en una grieta hidrofóbica estrecha entre las subunidades C_{1a} y C_{2a}.⁴⁷ Forskolina produce la activación de la ACs, incluso en ausencia de una proteína G funcional, por tanto, es por una acción directa sobre la subunidad catalítica de la enzima.^{48, 49, 50}

Las respuestas de ACs a otros moduladores pueden ser muy diferentes. Por ejemplo, las ciclasas del grupo 1 ciclasas (AC1, AC3, y AC8) son estimuladas por

calcio/calmodulina (Ca^{2+} -CALM) y por PQA, pero son inhibidas por las subunidades α de las proteínas $G_{i/o}$ y también por las subunidades $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$) de la proteína G. En contraste, ciclasas del grupo 2 (AC2, AC4 y AC7) se activan mediante la subunidad $G\beta\gamma$ y son insensibles al Ca^{2+} -CALM.⁵¹ Las ciclasas del grupo 3 (AC5 y AC6) son similares a los del Grupo 1, en que son inhibidas por $G_{\alpha i/o}$ y $G\beta\gamma$, pero también son inhibidas por la proteína G inhibitoria $G_{\alpha z}$ insensible a la toxina pertussis, por bajas concentraciones de calcio, y por la fosforilación del residuo Ser647 de la PQA.⁵² La AC9 pertenece a un grupo separado, ya que es insensible a calcio o $G_{\alpha i/o}/G\beta\gamma$, pero es inhibida por la fosfatasa de calcineurina.⁵³ Los efectos de la proteína quinasa C (PQC) en la AC son muy complejos y guardan relación de acuerdo al grupo. Por ejemplo, la fosforilación por PQC aumenta las actividades de AC2 y AC7 (Grupo 2), así como la AC5 (Grupo 3). Por otro lado, la fosforilación por la PQC reduce las actividades de la AC4 (Grupo 2) y AC6 (Grupo 3).^{42, 51} En el embarazo hay regulación al alza de los grupos 2 y grupo 3 en el miometrio^{54, 55}, pero la pregunta de si existen isoformas dominantes de AC unidas a receptores específicos del miometrio o si existe promiscuidad en el acoplamiento de complejos de proteínas G a las isoformas de la AC permanece sin respuesta.

I.4 Fosfodiesterasas y sus reguladores

Las fosfodiesterasas (PDE) multi-familia de genes de enzimas catalizan la hidrólisis de 3', 5'-nucleótidos cíclicos, y por lo tanto ocupan una posición clave en la modulación de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos.⁵⁶ En el tejido del miometrio, la actividad de las enzimas PDE se inhibió significativamente

durante el embarazo^{57 - 59}, probablemente como consecuencia de los niveles de progesterona altos^{57, 58, 59}, lo que sugiere que la inhibición de AMPc-PDE puede ser parte del mecanismo para la relajación del miometrio y mantenimiento del embarazo.

En la actualidad, más de 14 genes de la PDE han sido clonados en los mamíferos y 21 productos de los genes han sido identificados. Isoformas de PDE se agrupan en 11 familias distintas, pero relacionadas (PDE1 a PDE11), de acuerdo con una homología de secuencia, la especificidad de sustrato, de la sensibilidad del inhibidor y la función.^{56, 60 - 62} Las isoformas de estas proteínas comparten un patrón estructural común: un Carbono terminal, cuya función no está clara; conserva un núcleo catalítico, lo que determina la especificidad de sustrato y la sensibilidad del inhibidor, y una divergente N-terminal responsable de la orientación de la enzima.^{56, 60 - 62}

Subfamilias de PDE se expresan diferencialmente en los tejidos humanos, y sólo los subtipos PDE1-5 se han detectado en el miometrio humana.^{55, 59, 63, 64} Los sustratos para la PDE1 son una mezcla de nucleótidos cíclicos (ya sea AMPc o GMPc).⁶³ Las isoformas de PDE1 están claramente reguladas por la PQA y están involucrados en la proliferación celular.⁶⁵

PDE2 y PDE5 tienen estructuras similares, ya que ambos contienen sitios de unión alostéricos para GMPc.^{66 - 68} La expresión de PDE5 es inhibida por la hormona gonadotropina coriónica humana en el miometrio humano⁶⁹, y alguna evidencia sugiere que la PDE5 puede jugar un papel en la proliferación de células del miometrio y en la regulación de canales de potasio dependientes de GMPc.⁷⁰ Las dosis altas de sildenafil, un inhibidor específico de la PDE5, relaja el

miometrio de embarazadas in vitro, pero este efecto es poco probable que sea de valor tocolítico.⁷¹

PDE3 tiene dos isoformas PDE3A y PDE3B, que contienen un sitio catalítico para AMPc y GMPc.⁷² Estudios funcionales sugieren que la PDE3 está implicada en las contracciones del músculo liso, la función del corazón, la agregación plaquetaria, la maduración de ovocitos y el metabolismo celular.⁷³

La PDE4 es la subfamilia más importante de las PDEs, consistente de dos isoformas, una isoforma de PDE4-larga y una PDE4-corta. Ambas clases de PDE4s tienen una afinidad mucho mayor para AMPc que para GMPc.⁷⁴ En células de miometrio humano, la fuente principal (hasta un 75%) de la actividad de la PDE es proporcionado por la isoforma PDE4.^{63, 75} Los primeros estudios funcionales de PDE4 mostraron que la inhibición específica con rolipram conduce a la inhibición de la contracción espontánea de tiras de miometrio.^{63, 76} Sin embargo, rolipram tiene importantes efectos secundarios, especialmente náuseas y vómitos. Cilomilast, originalmente diseñado como una nueva terapia para el asma y con menos efectos secundarios, produce la inhibición dependiente de la concentración de las contracciones espontáneas del miometrio.⁷⁷ Los inhibidores selectivos de PDE4 disminuyen la incidencia de parto pretérmino inducido por la inflamación en ratones.⁷⁸ Una mejor comprensión de la regulación de las isoformas de PDE4 en el miometrio de embarazada puede ser un útil abordaje para el desarrollo tocolíticos de alta selectividad en el útero.⁷⁵

El papel de AMPc como un mediador importante en la regulación de la función del miometrio es indiscutible.^{55, 58, 59} Actualmente, se sabe mucho sobre las vías para

la síntesis de AMPc y su hidrólisis.^{46, 79} Sin embargo, los mecanismos de acción de las quinasas asociadas a las células del miometrio no se entienden completamente.^{55, 80} Se han propuesto varios candidatos como sustratos de la PQA, en base de estudios realizados en otros tipos de músculo liso.^{81, 82} Por este motivo, se requiere más investigación sobre la identificación de los sustratos fisiológicos de PQA en miometrio de embarazada y en su regulación por fosforilación, aclarar el papel del AMPc en el mantenimiento del embarazo, y buscar nuevas moléculas con selectividad en tejido uterino que tengan un potencial terapéutico.^{55, 83, 84}

I.5 Análogos de Talidomida

Como se mencionó anteriormente, el AMPc es la vía de señalización que participa en numerosos procesos y es considerado como el segundo mensajero clásico. El AMPc es sintetizado de ATP por la adenilato ciclasa y se descompone en AMP por la acción de una clase de proteína conocida como fosfodiesterasa (PDE). El aumento de los niveles de AMPc, activa a la PQA, la cual fosforila, entre otras proteínas a la QCLM. La fosforilación de la QCLM disminuye la afinidad de esta proteína por el complejo Ca^{2+} -calmodulina y por lo tanto estabiliza su forma inactiva. En consecuencia, disminuye la proporción de miosina fosforilada en el músculo, y se produce la relajación uterina.^{37, 38, 55, 79} En estos eventos la enzima fosfodiesterasa (PDE) juega un papel importante en el metabolismo del segundo mensajero AMPc.^{41, 79} La PDE degrada el AMPc, dando por terminado el efecto relajante.^{41, 79} Desde un punto de vista farmacológico, esta relación, implica que la especificidad de las PDEs sea una propuesta terapéutica potencial para tratar

patologías en las que se encuentra implicada la señalización de nucleótidos cíclicos.^{41,58, 79} Por lo anterior, el uso de inhibidores de PDE, especialmente inhibidores selectivos de la isoenzima PDE4^{71, 85}, a sido propuesto para el tratamiento de varias alteraciones patológicas en las cuales se encuentra involucrada la actividad de dicha isoenzima. Debido a esto, se ha incrementado el interés por estudiar los efectos de los inhibidores de PDE4, en este sentido, el rolipram (inhibidor selectivo de la PDE4), inhibe significativamente las contracciones espontáneas de tiras de miometrio aisladas de humano.^{63, 76, 77, 86}

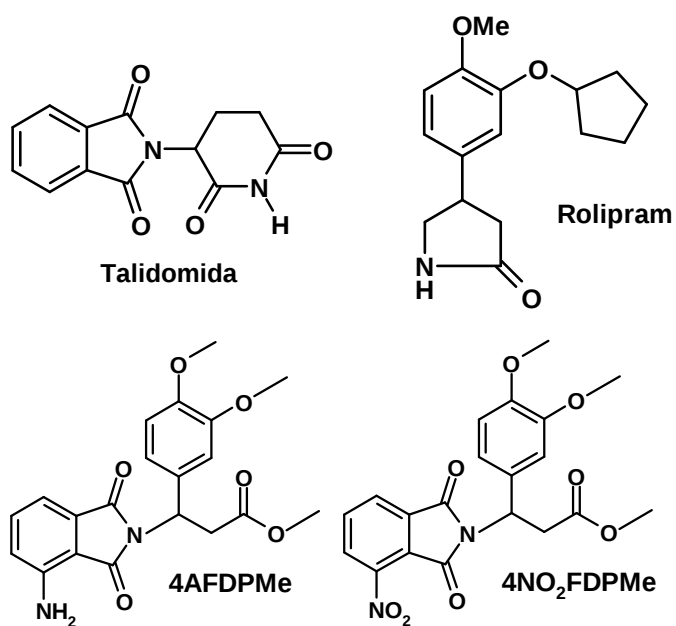
Otras aplicaciones terapéuticas de los inhibidores de la PDE4, como la teofilina (inhibidor no selectivo de PDEs) o el roflumilast (inhibidor selectivo de la PDE4), son la inhibición de la liberación del TNF- α estimulada por lipopolisacáridos (LPS) en pacientes con asma inducida por ejercicio y en consecuencia disminuyen la inflamación y la contractilidad de las vías respiratorias.^{87, 88}

Debido a que en algunos casos los pacientes han desarrollado resistencia a los fármacos miorrelajantes y antiinflamatorios⁸⁹, es necesario recurrir a terapias alternativas y desarrollar moléculas nuevas con efecto inhibidor potencial sobre la enzima PDE4.⁷⁷ Una fuente de moléculas innovadoras, son los compuestos análogos de la talidomida, ya que este fármaco, ha mostrado tener propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias, al disminuir la producción del TNF- α por medio del aumento de la degradación de su ARNm.^{90, 91} Por tales propiedades se han sintetizado familias diversas de análogos de talidomida⁸⁵, sin embargo, existe un grupo de análogos de talidomida con una potencia anti-TNF α mayor que ésta^{92, 93}; interesantemente, además de inhibir la producción del TNF- α , han mostrado ser inhibidores potentes de la PDE-4⁹⁴ a diferencia de la talidomida, la cual no

posee esta propiedad⁹⁵, pero de forma similar al rolipram que es el fármaco líder inhibidor de PDE-4 (Ver figura 2). Se sabe que los agentes que incrementan el AMPc intracelular, como los inhibidores de PDE-4, son agentes inmunomoduladores pues una alta concentración de AMPc inhibe la producción de TNF- α ; tal propiedad inmunomoduladora de esta familia de análogos de talidomida ha sido estudiada también en modelos de daño hepático diversos, donde han mostrado ser hepatoprotectores prometedores.^{96 - 100}

Tomando en cuenta las características de estos nuevos análogos de talidomida, inmunomoduladores e inhibidores de PDE4, además de la información que se posee sobre los tocolíticos utilizados rutinariamente, los cuales son pocos para el tratamiento clínico; los análogos de talidomida son una propuesta potencial para investigar su posible efecto miorelajante y a partir de ello abrir posibilidades de obtener alternativas terapéuticas para la prevención del problema de salud que representa el parto pre término. Por este motivo, el proyecto de investigación presente está enfocado a la evaluación farmacológica de 2 análogos de talidomida, el 3-[4-aminoftalimido]-3-[3,4-dimetoxifenil]-propanoato de metilo (4AFDPMe) y el 3-[4-nitroftalimido]-3-[3,4-dimetoxifenil]-propanoato de metilo (4NO2FDPM), para estudiar sus mecanismos de acción probables como agentes relajantes del músculo liso uterino humano (al inhibir a la PDE4 e incrementar AMPc), así como evidenciar su carácter como bloqueadores de canales de calcio.

Fig 2. Estructuras químicas de talidomida, rolipram y los dos análogos de talidomida a evaluar: 3-[4-aminoftalimido]-3-[3,4-dimetoxifenil]-propanoato de metilo (4AFDPM_e) y 3-[4-nitroftalimido]-3-[3,4-dimetoxifenil]-propanoato de metilo (4NO₂FDPM_e). Rolipram es el fármaco líder inhibidor de PDE4.



II. Planteamiento del Problema

El parto pre término o prematuro es la presencia de contracciones uterinas con frecuencia e intensidad superiores que inducen la expulsión del producto antes de término, es decir, antes de la semana 37 de gestación. Se considera anomalía de la duración del embarazo cuando el parto se produce fuera del límite considerado fisiológico para la duración de la gestación (37 a 41 semanas completas). La prematuridad, es el principal factor que contribuye al retraso de desarrollo, al deterioro visual y auditivo, neumopatías crónicas y parálisis cerebral. Más del 50% de estos trastornos se ocasionan en nacimientos menores a 34 semanas. Las complicaciones de la prematuridad, constituyen la causa del 70% de la mortalidad de recién nacidos y lactantes sin anomalías.^{101, 102}

En general, este problema de salud no cuenta con medicamentos suficientes para su control y los que hay son causantes de efectos adversos y tampoco son lo suficientemente efectivos por lo que no prolongan lo suficiente el tiempo de embarazo para la maduración del producto.¹⁰¹

Con estos antecedentes, el problema de la atención del parto pre termino no solo en la prevención si no también en el manejo farmacológico, pone en evidencia la necesidad de nuevos fármacos tocolíticos por lo que el siguiente estudio describe el efecto tocolítico de dos análogos de talidomida en tiras de musculo liso uterino humano, de esta manera los resultados, abrirán nuevas estrategias farmacológicas en estudios experimentales in vitro.

Por lo que surge la siguiente pregunta de investigación.

¿El efecto útero-relajante inducido por los compuestos 4NO₂ y 4AF sobre las contracciones espontáneas, tónicas y las inducidas por Ca²⁺ en tiras de músculo liso de útero embarazado, son producto del bloqueo de la entrada de Ca²⁺ y del aumento de la concentración del AMPc?

Objetivo General

Determinar el mecanismo del efecto útero-relajante de los dos análogos de talidomida (3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo [4NO2FDPM_e] y 3-(4-aminoftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo [4AFDPM_e]).

Objetivos específicos

1. Construir las curvas concentración respuesta para determinar la concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀, μM) y la respuesta máxima (R_{max}) de 4NO2FDPM_e y 4AFDPM_e en músculo uterino aislado de humano, sobre la contracción tónica-sostenida inducida por KCl 40 mM (estímulo electromecánico).
2. Construir las curvas concentración respuesta al Ca²⁺ en músculo liso uterino aislado de humano, utilizando una solución despolarizante de KCl 40 mM, sin Ca²⁺ y con 1 mM de EDTA en presencia y en ausencia de los compuestos 4NO2FDPM_e y 4AFDPM_e.
3. Comparar los efectos relajantes de los 2 análogos de la talidomida (4NO2FDPM_e y 4AFDPM_e) con los efectos relajante del inhibidor de la fosfodiesterasa-4, Rolipram.

IV. Glosario

4NO2FDPM	3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo
4AFDPM	3-(4-aminoftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria cincuenta
R _{max}	Respuesta máxima
KCl	Cloruro de potasio
EDTA	Ácido Etilen de amino tretracético
g	Gramo (s)
m	metro (s)
kg	Kilogramo (s)
ml	Mililitro (s)
µg	Microgramo (s)
mg	Miligramos
min	Minuto (s)
h	Hora (s)
FDA	Food Drug Administration
IV	Intravenoso
IM	Intramuscular
PQA	Proteino quinasa A
AMPc	Monofosfato de Adenosina cíclico
QCLM	Quinasa de la cadena ligera de la miosina
PLC	Fosfolipasa C
AC	Adenililciclase
ATP	Trifosfato de Adenosina de
PDE	Fosfodiesterasas
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
R _{max}	Respuesta máxima
L	Lavado
Ca ²⁺	Calcio
UAEH	Universidad Autónoma del estado de Hidalgo

V. Descripción General del Estudio

Técnica farmacológica para la construcción de las curvas concentración respuesta.

El material biológico (biopsia) obtenido en el área de Toco Cirugía del Hospital General de Pachuca, se trasladó al Laboratorio de Farmacología del Área Académica de Medicina (Dr. Eliseo Ramírez Ulloa 400), dentro de un frasco de plástico, lleno con una solución Ringer que tenía la siguiente composición (mM): NaCl 144 ; NaHCO₃ 30; KCl 6.2; KH₂PO₄ 1; MgSO₄ 0.5; CaCl₂ 2.5; glucosa 11.1⁷⁷ con pH de 7.4 a la temperatura de 4° C, ya que el frasco de plástico se meterá en un recipiente con bolsas de hielo.

En el laboratorio, se registraron las características macroscópicas, tamaño, etc. de la muestra, en el Formato de Reporte de Casos (anexo x). La muestra biológica se colocó en una caja de petri llena de solución Ringer a temperatura ambiente y burbujeado con una mezcla de gas carbógeno (5% de CO₂ en O₂); en estas condiciones el tejido se limpió de tejido graso, tejido adyacente y serosa; después, se disecó buscando la orientación de las fibras longitudinales de músculo liso, se obtuvieron tiras longitudinales de miometrio de 15 x 3 x 3 mm.

Las tiras de miometrio se colocaron en forma vertical dentro de cámaras de vidrio con chaqueta para tejidos aislados de un volumen de 3 mL; por medio de un calentador y circulador de agua las cámaras se mantuvieron a la temperatura de 37° C, con 3 mL de Ringer, con burbujeo continuo de gas carbógeno y un pH de 7.4. El sistema de registro isométrico para tejidos aislados cuenta con seis

cámaras para tejidos aislados. Una punta de la tira se sujeto a la base de la cámara con hilo de seda de 6 ceros y la otra punta se unió con hilo de seda a un transductor de tensión Grass FT03 montado en un tensor de bronce con tornillo milimétrico sin fin; las tiras se mantuvieron a la tensión de 2 g; el transductor de tensión envió la señal a un polígrafo GrassTelefactor Modelo RPS 312 conectado a una computadora que tiene instalado el programa PolyView por medio del cual se registro la actividad funcional del músculo liso uterino y por medio del programa PolyView se midió la inhibición de la amplitud de la contracción tónica sostenida inducida por KCl 40 mM, así como la contracción inducida por CaCl₂. Las tiras de músculo liso uterino inmersas en la solución Ringer a las condiciones arriba mencionadas, se dejaron equilibrar por un periodo de dos horas cambiando cada 15 min la solución Ringer. Después de este periodo, las tiras que cumplieron con los requisitos de presentar actividad funcional espontánea se consideraron como viables para el estudio y las que no cumplieron con este requisito los tejidos se descartaron.

Efecto de los compuestos sobre la amplitud de la contracción tónica sostenida inducida por una solución despolarizante de kcl 40 mm:

Se estudio el efecto relajante de los compuestos 1) 4NO₂FDPM_e, 2) 4AFDPM_e, 3) Rolipram, 4) Forskolin y 5) 8-Br-AMPc: sobre la contracción tónica sostenida del tejido inducida por una solución despolarizante isotónica con KCl 40 mM; la composición de esta solución despolarizante es semejante a la solución Ringer en la que solamente se sustituyo isotónicamente el NaCl por KCl. La contracción tónica sostenida mantuvo estable su amplitud por varios min (60 min aprox). Cuando la amplitud de la contracción es estable se adicionaron los compuestos a

ensayar y se mantuvieron por 30 min dentro del medio de incubación. El valor de la amplitud antes de adicionar los compuestos se dio el 100% y la amplitud medida después de que los compuestos permanecieron 30 min en contacto con el tejido indico el % de inhibición de la contracción.

Se construyeron 5 curvas concentración respuestas:

- 1- Curva concentración respuesta del efecto útero-relajante del compuesto 4-NO₂FDPM_e sobre la contracción tónica sostenida inducida por KCl 40 mM.
- 2- Curva concentración respuesta del efecto útero-relajante del compuesto 4-AFDPM_e sobre la contracción tónica sostenida inducida por KCl 40 mM.
- 3- Curva concentración respuesta del efecto útero-relajante del compuesto Rolipram sobre la contracción tónica sostenida inducida por KCl 40 mM.
- 4- Curva concentración respuesta del efecto útero-relajante del compuesto Forskolin sobre la contracción tónica sostenida inducida por KCl 40 mM.
- 5- Curva concentración respuesta del efecto útero-relajante del compuesto 8-Br-AMP_c sobre la contracción tónica sostenida inducida por KCl 40 mM.

A partir de estas 5 curvas concentración respuesta se determinaron las concentraciones relajantes o inhibitorias cincuenta (CI₅₀) y la respuesta máxima (R_{max}). Estos parámetros farmacológicos indicaron que tan potentes son los compuestos 4-NO₂FDPM_e y 4-AFDPM_e comparados con: Rolipram (inhibidor específico de la fosfodiesterasa dependiente de AMP_c); Forskolin (activador de la adenilatociclasa) y 8-Br-AMP_c (análogo permeable del AMP_c).

Efecto Inhibitorio de los Compuestos sobre la Contracción Inducida por CaCl₂.

Después de validar la viabilidad de los tejidos, estos se incubaron en una solución isotónica despolarizante con KCl 40 mM, sin CaCl_2 y con 1mM de EDTA (quelante de Ca^{2+}), en estas condiciones al inicio se produce una contracción que con el tiempo va decayendo por la falta de Ca^{2+} extracelular. Cuando el tono del tejido alcance la basal, se adicionaron los compuestos y después de 15 min se inicio la adición de diferentes concentraciones de CaCl_2 (0.5, 1.0, 2.3, 3.2 mM).

- 1- Curva concentración respuesta al Ca^{2+} en presencia del compuesto 4NO2FDPMc.
- 2- Curva concentración respuesta al Ca^{2+} en presencia del compuesto 4AFDPMc.
- 3- Curva concentración respuesta al Ca^{2+} en presencia del compuesto Rolipram
- 4- Curva concentración respuesta al Ca^{2+} en ausencia de los compuestos (CONTROL).

A partir de estas 4 curvas concentración respuesta al Ca^{2+} se obtuvo la amplitud de las contracciones inducidas por las diferentes concentraciones de Ca^{2+} . De esta manera se evaluó el efecto bloqueador de la entrada de Ca^{2+} al tejido uterino. El efecto bloqueador se expresa como el porcentaje de la amplitud de la contracción comparado con los valores obtenidos en la curva control.

VI. Hallazgos

VI.1. Análisis estadístico

Los datos se expresan como el valor promedio de “n” tiras $\pm$ el error estándar de la media, para esto se procesaron por medio del programa Excel (promedio y desviación estándar). Para las curvas concentración respuesta se utilizaron el programa Prisma V4 Graph, las diferencias estadísticas entre los valores de las concentraciones inhibitorias cincuenta (CI_{50}) y la respuesta máxima (R_{max}) de cada compuesto ensayado, se determinarán aplicando una prueba de ANOVA de una vía y subsecuente comparación individual vía la prueba de Bonferroni (Prisma Stat V4). Las diferencias se considerarán significativas cuando $P < 0.05$.

La diferencia significativa fue evaluada por ANOVA y después por la prueba de Bonferroni, se realizaron las comparaciones de los valores de: CI_{50} , R_{max} y los valores de la respuesta al Ca^{2+} . Una $p < 0.05$ se consideró como una diferencia significativa.

VI. 2. Descripción de los resultados

Los resultados del informe son producto del estudio de 72 muestras de músculo liso uterino embarazado, todas ellas demostraron ser adecuadas y de cada una de ellas se obtuvo 6 tiras de músculo liso uterino. Y a continuación se describen los hallazgos.

- a) Los análogos de la talidomida 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé inhiben las contracciones espontáneas en condiciones “in vitro” de tejidos uterinos embarazados, donde se observa que la inhibición se presenta en forma dependiente de la concentración como se muestra en la gráfica de la Fig. 1 y un trazo típico del efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas se muestra en la Fig. 1A; también, en la misma gráfica se muestra que el inhibidor específico de la fosfodiesterasa 4 (PDE-4) rolipram también inhibe las contracciones espontáneas uterinas en forma dependiente de la concentración.

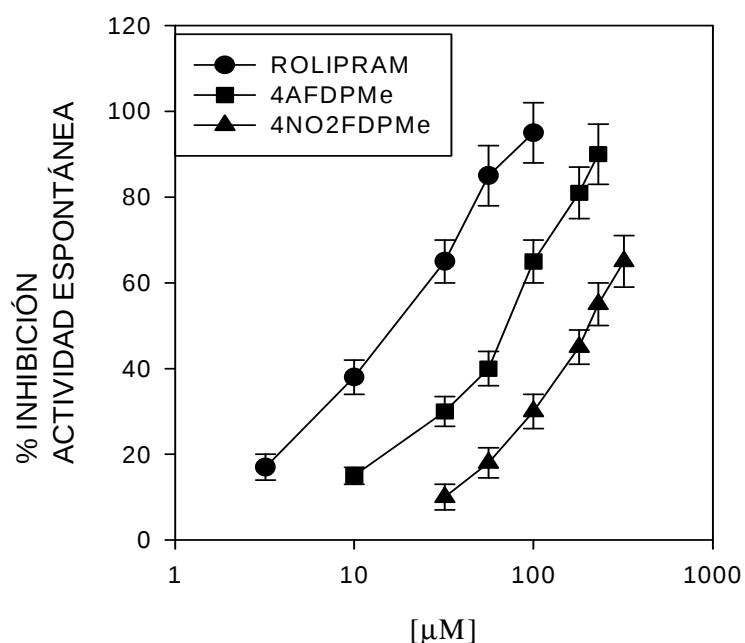


Fig. 1- Curva concentración respuesta del efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas inducido por ROLIPRAM, 4AFDPM e 4NO2FDPM, en útero humano embarazado

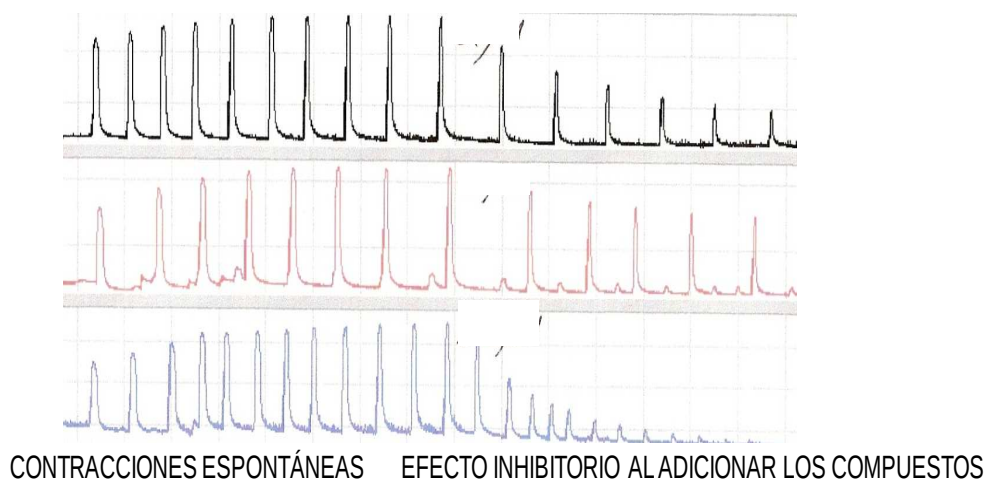


Fig. 1A- Trazos típicos que representan las contracciones espontáneas del útero humano embarazado y la representación del efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas inducidas por los compuestos ensayados

Fuente: MECANISMO DE ACCIÓN EMPLEADO EN EL EFECTO RELAJANTE DE DOS ANÁLOGOS DE LA TALIDOMIDA EN MÚSCULO UTERINO HUMANO.

En la tabla N° 1 se observa que el rolipram es más potente que los compuestos 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé, con un valor de la concentración inhibitoria cincuenta (Cl₅₀) de 22.74 ± 2.32 µM y una respuesta máxima (R_{máx}) de 94.13 ± 7.53 %; su Cl₅₀ es significativamente diferente (p<0.05) de los valores de las Cl₅₀ de los compuestos 4AFDPMé (Cl₅₀ = 62.17 ± 5.61 µM; R_{máx} = 88.16 ± 7.93 %) y 4NO₂FDPMé (Cl₅₀ = 128.30 ± 14.56 µM; R_{máx} = 67.99 %).

Tabla N° 1- Valores de la concentración inhibitoria cincuenta (Cl₅₀) y de la Respuesta Máxima (R_{máx}) sobre las contracciones espontáneas.

COMPUESTO	Cl ₅₀ (µM)	R _{máx} (%)
ROLIPRAM	22.74 ± 2.32	94.13 ± 7.53
4AFDPMé	62.17 ± 5.61 ^a	88.16 ± 7.93
4NO ₂ FDPMé	128.30 ± 14.56 ^a	67.99 8.15

Los datos representan el valor promedio ± EEM, n=6

^a Diferencia significativa vs Rolipram, p<0.05

Fuente: MECANISMO DE ACCIÓN EMPLEADO EN EL EFECTO RELAJANTE DE DOS ANÁLOGOS DE LA TALIDOMIDA EN MÚSCULO UTERINO HUMANO.

Las comparaciones de los valores de: Cl₅₀, R_{máx} se realizaron utilizando la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Bonferroni, una p<0.05 se tomó como una diferencia significativa.

b) Los análogos de la talidomida 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé así como el rolipram inhiben las contracciones tónicas sostenidas inducidas por una solución despolarizante de KCl 40 mM en forma dependiente de la concentración bajo las mismas condiciones del experimento anterior, en la tabla Num. 2 se muestra la (Cl₅₀) y la (R_{max}), observando diferencia significativa entre el compuesto 4NO₂FDPMé y 4AFDPMé a si como con ROLIPRAM.

Tabla N° 2- Valores de la concentración inhibitoria cincuenta (Cl₅₀) y de la Respuesta Máxima (R_{max}) sobre las contraccionestónicas sostenidas inducidas por KCl 40 mM.

COMPUESTOS	Cl ₅₀ (μM)	R _{max} (%)
ROLIPRAM	98.45 ± 8.86	97.10 ± 8.73
4AFDPMé	125 ± 13.72	88.65 ± 7.09
4NO ₂ FDPMé	203.45 ± 18.31 ^{a, b}	70.61 ± 6.78

Los datos representan el valor promedio ± EEM, n=6

^aDiferencia significativa vs Rolipram, p<0.05

^bDiferencia significativa vs 4AFDPMé, p<0.05

Fuente: MECANISMO DE ACCIÓN EMPLEADO EN EL EFECTO RELAJANTE DE DOS ANÁLOGOS DE LA TALIDOMIDA EN MÚSCULO UTERINO HUMANO

Las comparaciones de los valores de: Cl₅₀, R_{max} se realizaron utilizando la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Bonferroni, una p<0.05 se tomó como una diferencia significativa.

Se puede observar en la gráfica de la Fig. 2; que la inhibición de la contracción sostenida es dependiente la concentración de los compuestos adicionados y además en la (Fig. 2A), hay un trazo típico de la contracción tónica sostenida inducida por KCl 40 mM y el efecto de la adición de los compuestos sobre ésta

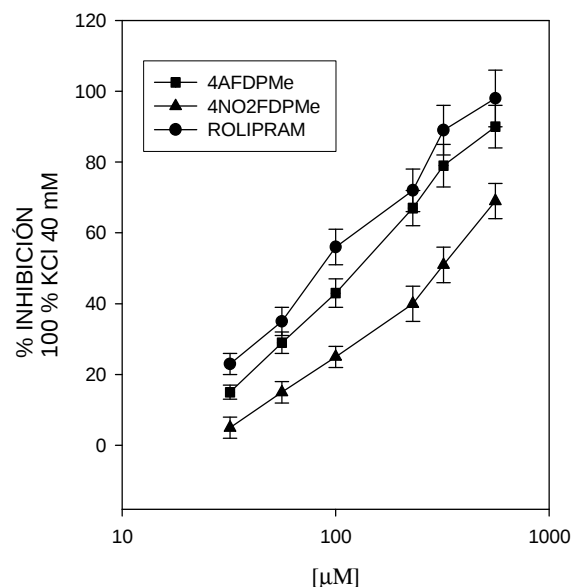


Fig. 2- Curva concentración respuesta del efecto inhibitorio de ROLIPRAM, 4AFDPMé Y 4NO2FDPMé sobre la contracción tónica sostenida inducida por la solución despolarizante de K+ 40 mM con Ca²⁺.

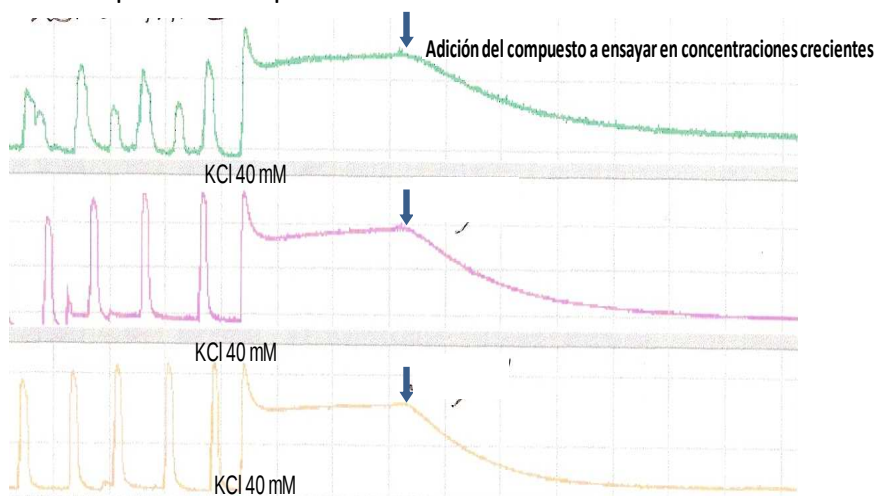


Fig. 2A - Trazos típicos del modelo experimental utilizado para ensayar el efecto inhibitorio de los compuestos estudiados sobre la contracción tónica sostenida del útero humano embarazado inducida por una solución despolarizante de K+ 40 mM con Ca²⁺

Fuente: MECANISMO DE ACCIÓN EMPLEADO EN EL EFECTO RELAJANTE DE DOS ANÁLOGOS DE LA TALIDOMIDA EN MÚSCULO UTERINO HUMANO.

c) Los análogos de la talidomida 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé así como el rolipram inhiben las contracciones tónicas sostenidas inducidas por una solución despolarizante de KCl 40 mM en forma dependiente de las concentraciones, cuando los compuestos se incuban previamente durante 30 min y luego se vuelve a estimular con KCl 40 mM, como se muestra en la gráfica de la Fig. 3 y, además, se ilustra un trazo típico del modelo experimental empleado en la Fig. 3A. Después de incubar el tejido con los compuestos por 30 min el rolipram resulta significativamente más potente que los análogos 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé para inhibir la respuesta al KCl 40 mM. Sin embargo, los compuestos 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé tienen una potencia semejante.

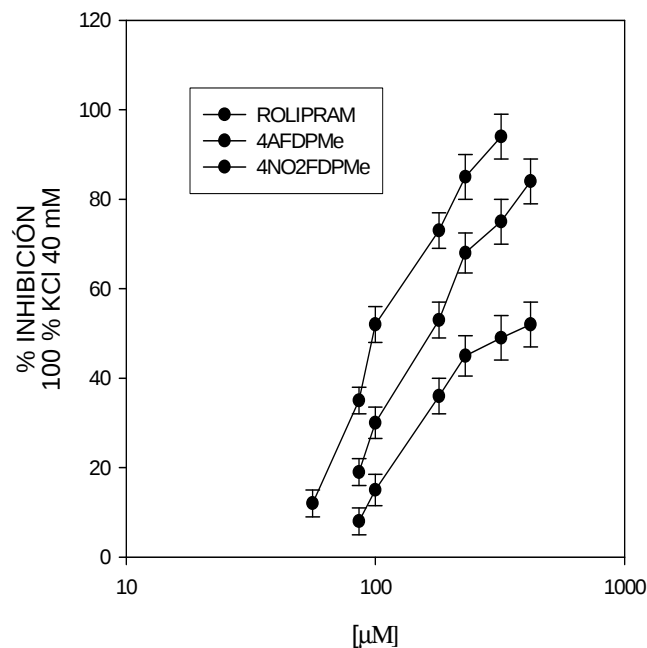


Fig. 3- Curva concentración respuesta del efecto de ROLIPRAM, 4AFDPM e Y 4NO2FDPM INCUBADO 30 min estimulado después de la incubación con K+ 40 mM

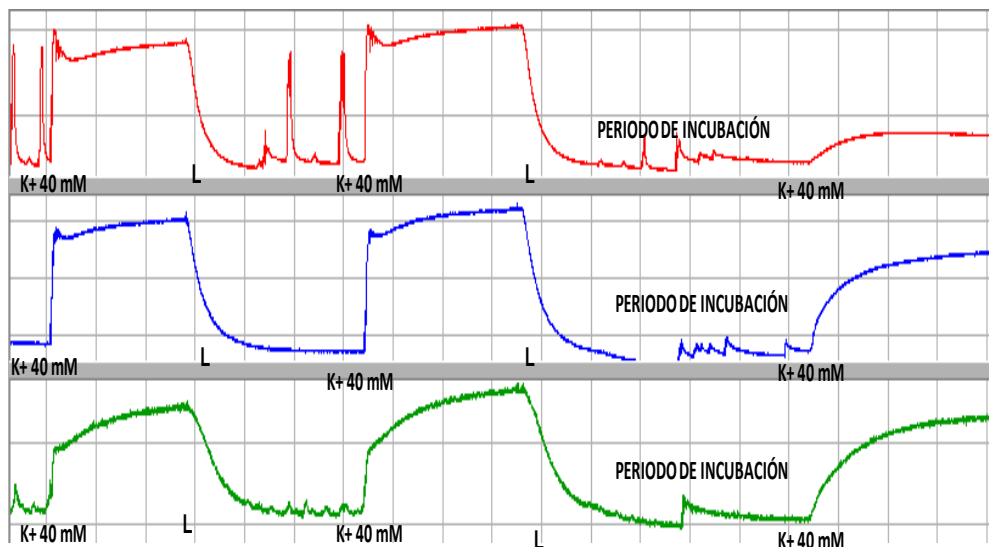


Fig. 3A- Trazos típicos del modelo experimental utilizado para estudiar el efecto inhibitorio de ROLIPRAM, 4AFDPM e Y 4NO2FDPM inducido por la incubación (30 min) de los compuestos en útero humano embarazado. L = lavado

Fuente: MECANISMO DE ACCIÓN EMPLEADO EN EL EFECTO RELAJANTE DE DOS ANÁLOGOS DE LA TALIDOMIDA EN MÚSCULO UTERINO HUMANO.

En la Tabla N° 3, Se puede observar que en este grupo las $R_{\max}$ del rolipram y del 4AFDPMé son diferentes significativamente de la del compuesto 4NO₂FDPMé.

Tabla N° 3- Valores de la concentración inhibitoria cincuenta (Cl_{50}) y de la Respuesta Máxima ($R_{\max}$) sobre contracciones de inducidas por KCl 40 mM después de haber incubado los compuestos durante 30 min.

N = 6		
COMPUESTOS	Cl_{50} (μ M)	$R_{\max}$ (%)
ROLIPRAM	93.56 $\pm$ 8.42	85.33 $\pm$ 7.69
4AFDPMé	143.89 $\pm$ 10.14 ^a	82.41 $\pm$ 6.59
4NO ₂ FDPMé	153.36 $\pm$ 16.20 ^b	50.85 $\pm$ 3.55 ^{a, b}

Los datos representan el valor promedio $\pm$ EEM, n=6

^aDS, Rolipram vs 4AFDPMé, p<0.05 ^aDS, Rolipram vs 4NO₂FDPMé, p<0.05

^bDS Rolipram vs 4NO₂FDPMé, p<0.05 ^bDS, 4AFDPMé vs 4NO₂FDPMé p<0.05

Fuente: MECANISMO DE ACCIÓN EMPLEADO EN EL EFECTO RELAJANTE DE DOS ANÁLOGOS DE LA TALIDOMIDA EN MÚSCULO UTERINO HUMANO.

Las comparaciones de los valores de: Cl_{50} , $R_{\max}$ se realizaron utilizando la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Bonferroni, una p<0.05 se tomó como una diferencia significativa.

d) Los análogos de la talidomida 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé, así como el rolipram, inhiben en forma dependiente de la concentración la respuesta contráctil a la adición de diferentes concentraciones de Ca²⁺ (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mM CaCl₂) como se muestra en la gráfica de la Fig. 4 y se presenta un trazo típico del modelo experimental utilizado en la Fig. 4A. La inhibición de la respuesta al Ca²⁺ inducida por 4AFDPMé, 4NO₂FDPMé y rolipram se comparó y se analizó con los valores de la curva control construida en ausencia de los compuestos. Las comparaciones de los valores a la adición de 1-5 mM de Ca²⁺ muestran que rolipram, 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé inhiben significativamente (p<0.05) la respuesta al Ca²⁺.

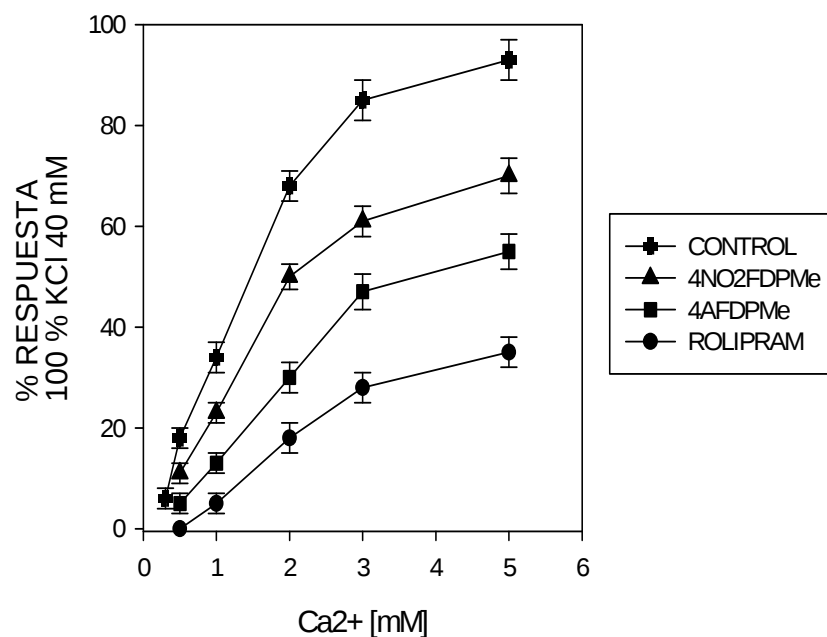


Fig. 4- Curva concentración respuesta al Ca²⁺ en ausencia y en presencia de ROLIPRAM, 4AFDPM Y 4NO₂FDPM en un medio despolarizante de K⁺ 40 mM sin Ca²⁺.

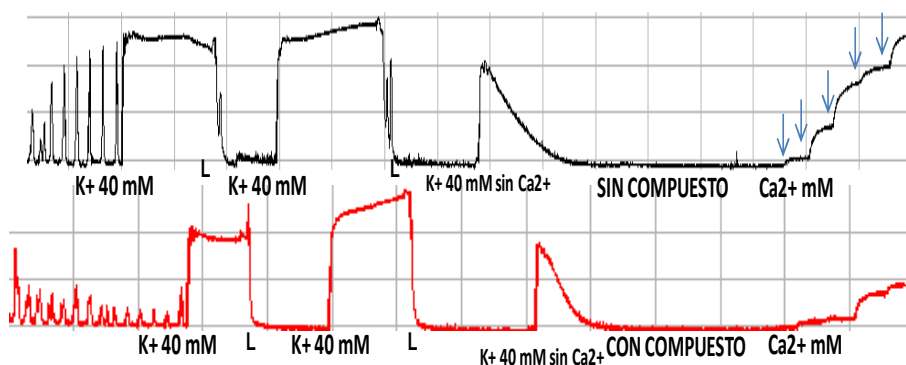


Fig.4A- Trazos típicos del modelo experimental utilizado para construir la curva al Ca²⁺

K⁺ 40 mM= solución despolarizante con Ca²⁺; L= lavado; K⁺ 40 mM sin Ca²⁺ = solución despolarizante sin Ca²⁺

Fuente: MECANISMO DE ACCIÓN EMPLEADO EN EL EFECTO RELAJANTE DE DOS ANÁLOGOS DE LA TALIDOMIDA EN MÚSCULO UTERINO HUMANO.

La Tabla N° 4 muestra el resultado del análisis de las respuestas a diferentes concentraciones de Ca^{2+} ; Y la diferencia significativa entre la respuesta de la contracción inducida por calcio en los tejidos incubados con los compuestos a estudiar comparando su respuesta con el control.

Tabla N° 4- Valores promedios del porcentaje de respuesta al Ca^{2+} en un medio despolarizante de KCl 40 mM libre de Ca^{2+} (tomando como 100% la amplitud de la contracción inducida por KCl 40 mM en un medio con Ca^{2+}), en ausencia (control) y en presencia de 4NO₂FDPM, 4AFDPM Y ROLIPRAM.

N = 6	% RESPUESTA			
	1 mM Ca^{2+}	2 mM Ca^{2+}	3 mM Ca^{2+}	5 mM Ca^{2+}
CONTROL	34.21 ± 3.53	68.14 ± 4.45	81.09 ± 5.15	93.03 ± 5.06
4NO ₂ FDPM 200 µM	23.32 ± 2.32 a	50.15 ± 3.19 a	61.37 ± 3.32 a	70.29 ± 3.54 a
4AFDPM 100 µM	13.23 ± 2.16 a, b, c	30.32 ± 3.32 a, b, c	47.18 ± 3.50 A	55.34 ± 3.59 a, c
ROLIPRAM 100 µM	5.35 ± 2.51 a, c	18.12 ± 3.32 a, c	28.58 ± 3.35 a, b	35.28 ± 3.54 a, b

Los datos representan el valor promedio de la amplitud de la respuesta ± EEM, n=6

^adiferente del CONTROL p<0.05

^bdiferente del 4NO₂FDPM p<0.05

^cdiferente de ROLIPRAM p<0.05

Fuente: MECANISMO DE ACCIÓN EMPLEADO EN EL EFECTO RELAJANTE DE DOS ANÁLOGOS DE LA TALIDOMIDA EN MÚSCULO UTERINO HUMANO.

Los datos de la tabla representan el valor promedio de las respuestas a diferentes concentraciones de Ca^{2+} . ± el error estándar de la media.

VII. Discusión

Discusión

El tratamiento farmacológico del parto prematuro sigue siendo un problema de salud reproductiva aún no resuelto. Debido a la relativa falta de eficacia y/o seguridad de los actuales agentes tocolíticos. Lo que ha puesto de relieve, que es necesario desarrollar nuevos fármacos útero-relajantes privados de importantes efectos secundarios maternos y fetales. Los análogos de la talidomida estudiados en este trabajo 4NO₂FDPM_e y 4AFDPM_e, tienen una relación estructural con otros compuestos descritos en la literatura. Así, Oger y cols en el 2004⁷⁷, mostraron que el Cilomilast inhibe la actividad de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) y tiene propiedades anti-inflamatorias y relajantes del músculo liso uterino humano embarazado. También, Méhats y cols. 2001⁴¹, reportaron que el Rolipram, inhibidor selectivo de la PDE4 tiene efecto relajante sobre la actividad funcional del útero humano embarazado y Bardou y cols. 1999⁷⁶ mostraron que otro inhibidor no selectivo de la PDE como la teofilina, inhibe las contracciones espontáneas así como las inducidas en el útero humano embarazado. Los compuestos antes mencionados tienen como factor común inhibir a la enzima PDE4, efecto que también poseen algunos análogos de la talidomida, Muller et al. 1998¹¹². Así, los análogos de la talidomida 4NO₂FDPM_e y 4AFDPM_e, sintetizados por Fernández y cols. 2004¹¹³, tienen potenciales efectos farmacológicos como inhibidores de la PDE4 y como útero-relajantes. En este trabajo se demostró el efecto útero-relajante de los análogos de la talidomida 4NO₂FDPM_e y 4AFDPM_e y se comparó con la acción útero relajante del Rolipram; así como también se investigó el probable mecanismo del efecto útero relajante. Este es el primer reporte de los parámetros farmacológicos de la concentración inhibitoria

cincuenta (CI_{50}) y de la respuesta máxima (R_{max}) de los compuestos 4NO₂FDPM e y 4AFDPM e como inhibidores de las contracciones espontáneas e inducidas sobre el útero humano embarazado. Al comparar el efecto útero-relajante de los compuestos estudiados con el efecto del Rolipram, se encontró que el Rolipram es 3 veces más potente que el compuesto 4AFDPM e y 6 veces más potente que el compuesto 4NO₂FDPM e para inhibir las contracciones espontáneas del útero humano embarazado. La comparación con otros compuestos que inhiben a la PDE y que tienen efectos antiinflamatorios y útero relajantes como el Cilomilast no fue posible ya que no se encuentra aún en el mercado el compuesto Cilomilast. Los valores de la concentración inhibitoria cincuenta (CI_{50}) y de la respuesta máxima (R_{max}) reportados en la literatura para el Cilomilast y Rolipram indican que estos compuestos tienen una diferencia entre 10-100 veces más potentes y efectivos que los valores determinados en este estudio para los compuestos 4NO₂FDPM e y 4AFDPM e. Esta diferencia puede explicarse por las propiedades físico-químicas características de cada compuesto como por ejemplo su polaridad y su coeficiente de partición.

Por otro lado, es bien conocido que la actividad contráctil del músculo liso uterino es dependiente del Ca²⁺⁺ extracelular, de tal manera que una de las estrategias para investigar la participación de las vías de entrada de Ca²⁺⁺ en el efecto inhibitorio de las contracciones uterinas inducidas por los compuestos, es la despolarización del tejido uterino con una solución isotónica de KCl 40 mM; esta despolarización produce una contracción tónica sostenida del tejido que es inhibida selectivamente por nifedipina, conocido bloqueador de la entrada de Ca²⁺⁺, Chiossi et al. 2010¹¹⁴. Los análogos de la talidomida 4NO₂FDPM e y 4AFDPM e así como el Rolipram inhiben la contracción tónica sostenida inducida por KCl 40 mM. Lo

anterior indica que los compuestos pueden inhibir las contracciones uterinas bloqueando las vías de entrada de Ca^{2+} , en forma dependiente de la concentración; sin embargo, las concentraciones inhibitorias cincuenta (CI_{50}) de los compuestos estudiados son significativamente mayores que la CI_{50} reportada en la literatura para la nifedipina (Chiossi et al. 2010). La confirmación del probable efecto bloqueador de la entrada del Ca^{2+} se realizó mediante la construcción de las curvas concentración respuesta al calcio en un medio despolarizante de KCl 40 mM libre de Ca^{2+} en estas condiciones se encontró que los análogos de la talidomida 4NO₂FDPM e y 4AFDPM e y el Rolipram bloquearon la respuesta a diferentes concentraciones de Ca^{2+} estos resultados apoyan la hipótesis de que los compuestos inhiben las contracciones del útero humano embarazado en condiciones *in vitro*, bloqueando las vías de entrada de Ca^{2+} del músculo liso uterino humano embarazado. El efecto bloqueador de la entrada del Ca^{2+} inducido por Rolipram hasta la fecha no se ha reportado en la literatura; sin embargo, existen evidencias de su acción inhibidora de la PDE4 y de los efectos anti-inflamatorio y útero-relajante en el miometrio humano (Oger et al. 2004). Con relación a los análogos de la talidomida como el 4NO₂FDPM e y 4AFDPM e, se ha reportado que disminuyen los niveles plasmáticos y hepáticos del TNF α en un modelo experimental agudo al reto séptico inducido por LPS (Fernández-Martínez et al. 2001). Por lo anterior, es probable que además del efecto útero-relajante reportado en este trabajo, los análogos de la talidomida probablemente inhiban a la PDE4. La PDE4 es la enzima que metaboliza al AMPc en tejido uterino, de manera que si los análogos de la talidomida 4NO₂FDPM e y 4AFDPM e inhiben a esta enzima aumentarían los niveles de AMPc, induciendo la relajación uterina.

Entonces, además del efecto útero-relajante los compuestos, tendrían un valor agregado al inhibir a la PDE4; sin embargo, el estudio del efecto de los compuestos sobre la actividad de la PDE4 y del probable aumento de AMPc será motivo de la continuidad de este proyecto de investigación que tiene como finalidad el desarrollo de nuevos fármacos tocolíticos.

VIII. Conclusiones

En este trabajo se estudió el efecto de dos derivados de la talidomida el 4-AFDPMé y el 4-NO₂FDPMé sobre la actividad funcional del músculo liso uterino humano embarazado en condiciones “*in vitro*”. Las contracciones espontáneas fueron inhibidas por los dos compuestos en forma dependiente de la concentración, como se muestra en la gráfica de la Fig. 1 y un trazo típico del efecto inhibitorio de los compuestos sobre las contracciones espontáneas uterinas como se muestra en la Fig. 1A; también, en la misma gráfica, se muestra que el inhibidor específico de la fosfodiesterasa-4 (PDE-4) Rolipram, también inhibe las contracciones espontáneas uterinas en forma dependiente de la concentración.

En la tabla N° 1 se muestra que el Rolipram es más potente para inhibir las contracciones espontáneas, que los compuestos 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé, y tiene un valor de la concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀) de $22.74 \pm 2.32 \mu\text{M}$ y una respuesta máxima (R_{máx}) de $94.13 \pm 7.53\%$ n=6; su CI₅₀ es significativamente diferente ($p < 0.05$) de los valores de las CI₅₀ de los compuestos 4AFDPMé (CI₅₀ = $62.17 \pm 5.61 \mu\text{M}$; y R_{máx} = $88.16 \pm 7.93 \%$; n=6) y 4NO₂FDPMé (CI₅₀ = $128.30 \pm 14.56 \mu\text{M}$; R_{máx} = 67.99% ; n=6).

Los análogos de la talidomida 4AFDPMé y 4NO₂FDPMé así como el Rolipram inhiben las contracciones tónicas sostenidas inducidas por una solución despolarizante de KCl 40 mM en forma dependiente de la concentración, como se muestra en la gráfica de la Fig. 2 (n=6); además se presenta un trazo típico de la contracción tónica sostenida inducida por KCl 40 mM y el efecto de la adición de los compuestos sobre la contracción tónica (Fig. 2A).

En la tabla N° 2 se muestran los valores de CI_{50} (μM) y de $R_{m\acute{a}x}$ (%) y se observa que la potencia inhibitoria de la contracci3n t3nica del Rolipram ($CI_{50} = 98.45 \pm 8.86 \mu M$; $R_{m\acute{a}x} = 97.10 \pm 8.73 \%$; $n=6$) y del compuesto 4AFDPMe ($CI_{50} = 125 \pm 13.72 \mu M$; $R_{m\acute{a}x} = 88.65 \pm 7.09 \%$; $n=6$) no son diferentes ($p > 0.05$); sin embargo, la potencia inhibitoria de la contracci3n t3nica sostenida inducida por el compuesto 4NO₂FDPMMe ($CI_{50} = 203.45 \pm 18.31 \mu M$; $R_{m\acute{a}x} = 70.61 \pm 6.78$; $n=6$) es menor significativamente que las del Rolipram y el 4AFDPMe sobre la contracci3n t3nica sostenida inducida por KCl 40 mM.

Los an3logos de la talidomida 4AFDPMe y 4NO₂FDPMMe as3 como el Rolipram inhiben las contracciones t3nicas sostenidas inducidas por una soluci3n despolarizante de KCl 40 mM en forma dependiente de las concentraciones, cuando los compuestos se incuban previamente durante 30 min y luego se vuelve a estimular con KCl 40 mM, como se muestra en la gr3fica de la Fig. 3 y, adem3s, se ilustra un trazo t3pico del modelo experimental empleado en la Fig. 3A.

Despu3s de incubar el tejido con los compuestos por 30 min el Rolipram result3 significativamente m3s potente que los an3logos 4AFDPMe y 4NO₂FDPMMe para inhibir la respuesta al KCl 40 mM; sin embargo, los compuestos 4AFDPMe y 4NO₂FDPMMe tienen una potencia semejante como se muestra en la Tabla N° 3, donde tambi3n se puede observar que en este grupo las $R_{m\acute{a}x}$ del rolipram y del 4AFDPMe son diferentes significativamente de la del compuesto 4NO₂FDPMMe.

Los an3logos de la talidomida 4AFDPMe (200 μM) y 4NO₂FDPMMe (100 μM), as3 como el Rolipram (100 μM), inhiben la respuesta contr3ctil a la adici3n de diferentes concentraciones de Ca²⁺ (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mM CaCl₂) en un medio despolarizante sin Ca²⁺ como se muestra en la gr3fica de la Fig. 4 y se presenta

un trazo típico del modelo experimental utilizado en la Fig. 4A. La inhibición de la respuesta al Ca^{2+} inducida por 4AFDPMé, 4NO₂FDPMé y Rolipram se comparó y se analizó con los valores de la curva control construida en ausencia de los compuestos. Las comparaciones de los valores a la adición de 1-5 mM de Ca^{2+} muestran que Rolipram (100 μM), 4AFDPMé (100 μM), y 4NO₂FDPMé (200 μM), inhiben significativamente ($p < 0.05$) la respuesta al Ca^{2+} . La Tabla N° 4 muestra el resultado del análisis de la comparación de las respuestas a diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

Los puntos de las gráficas representan el valor promedio del porcentaje de inhibición y la barra vertical el valor del error estándar de la media; las comparaciones de los valores promedio de: CI_{50} , R_{max} y los valores de la respuesta al Ca^{2+} , se realizaron utilizando la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Bonferroni, una $p < 0.05$ se tomó como una diferencia significativa.

X. Referencias Bibliográficas

1. Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993, Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.
2. Romero R, Epinoza J, Kusanovic JP. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006; (Suppl. 3): 17–42.
3. Romero R, Chaiworapongsa T, Kuivaniemi H. Bacterial vaginosis, the inflammatory response and the risk of preterm birth: a role for genetic epidemiology in the prevention of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1509–1519.
4. Vrachnis N, Vitoratos N, Iliodromiti Z, et al. Intrauterine inflammation and preterm delivery. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1205:118-22.
5. Menon R, Torloni MR, Voltolini C, et al. Biomarkers of spontaneous preterm birth: an overview of the literature in the last four decades. *Reprod Sci* 2011; 18: 1046-70.
6. Simmons LE, Rubens CE, Darmstadt GL, et al. Preventing preterm birth and neonatal mortality: exploring the epidemiology, causes, and interventions. *Semin Perinatol* 2010; 34: 408-15.
7. McCormick MC, Litt JS, Smith VC, et al. Prematurity: an overview and public health implications. *Annu Rev Public Health* 2011;32: 367-79.
8. Von Der Pool BA. Preterm labor: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 1998; 57: 2457-64.

9. Lamont RF; International Preterm Labour Council. Evidence-based labour ward guidelines for the diagnosis, management and treatment of spontaneous preterm labour. *J Obstet Gynaecol* 2003; 23: 469-78.
10. Gomez R, Romero R, Edwin SS. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature of membranes associated with intra-amniotic infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 135–142.
11. Simcox R, Sin WT, Seed PT, et al. Prophylactic Antibiotics for the Prevention of Preterm Birth in Women at Risk: A Meta-Analysis. *Aust. NZJ Obstet Gynaecol* 2007; 47: 368–377.
12. Sayres WG Jr. Preterm labor. *Am Fam Physician* 2010; 81: 477-84.
13. Haram K, Mortensen JH, Wollen AL. Preterm delivery: an overview. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003; 82: 687-704.
14. Latorra C, Andina E, Di Marco I. Guía de Prácticas Clínicas. Amenaza de Parto Prematuro. *Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá* 2003; 22: 28-43.
15. Yaju Y, Nakayama T. Effectiveness and safety of ritodrine hydrochloride for the treatment of preterm labour: a systematic review. *Pharmaco epidemiol Drug Saf* 2006; 15: 813-22.
16. Urabe K, Mukae H, Sakamoto N, et al. A suspected case of acute respiratory failure caused by ritodrine hydrochloride. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2010; 48: 520-3.
17. Caritis S, Venkataramanan, Darby et al. Pharmacokinetics of ritodrine administered intravenously. Recommendations for changes in the current regimen. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:429-437.

18. Gyetvai K, Hannah ME, Hodnett ED, et al. Tocolytics for preterm labor: a systematic review. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 869-77.
19. Klauser CK, Briery CM, Magann EF, et al. Tocolytic preference for treatment of preterm labor. *J Miss State Med Assoc* 2007; 48: 35-8.
20. Motazedian S, Ghaffarpasand F, Mojtahedi K, et al. Terbutaline versus salbutamol for suppression of preterm labor: a randomized clinical trial. *Ann Saudi Med* 2010; 30: 370-5.
21. Caritis S, Toig G, Hedding LA, et al. A double-blind study comparing ritodrine and terbutaline in the treatment of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150:7-14.
22. Papatsonis DN, Van Geijn HP, Adèr HJ, et al. Nifedipine and ritodrine in the management of preterm labor: A randomized multicenter trial. *Obstet Gynecol* 1997; 230-234.
23. Tsatsaris V, Papatsonis D, finet F, et al. Tocolysis with nifedipine or beta-adrenergic agonists: a meta analysis. *Obstet Gynecol* 2001; 97:840-7.
24. Romero R, Sibai BM, Sanchez-Ramos L, et al. An oxytocin receptor antagonist (atosiban) in the treatment of preterm labor: A randomized, double blind, placebo-controlled trial with tocolytic rescue. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1173-1183.
25. Usta IM, Khalil A, Nassar AH. Oxytocin antagonists for the management of preterm birth: a review. *Am J Perinatol* 2011; 28: 449-60.
26. Lees CC, Lojacono A, Thompson C, et al. Glyceryltrinitrate and ritodrine in tocolysis: An internatal multicenter randomized study. *Obstet Gynecol* 1999; 94:403-408.

27. Smith LgJr, Burns Pa, SchanlerRj. Calcium Homeostasis In Pregnant Women Receiving Long-Term Magnesium Sulfate Therapy For Preterm Labor. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:45-51.
28. Guo Y, Longo CJ, Xie R, et al. Cost-effectiveness of transdermal nitroglycerin use for preterm labor. *Value Health* 2011; 14: 240-6.
29. Lewis DF. Magnesium sulfate: the first-line tocolytic. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005; 32: 485-500.
30. Thorp JM, Berkman ND. The Cochrane Library. Management of preterm labor V2: 2000:1-54.
31. Bukowski R, Saade GR. New developments in the management of preterm labor. *Seminars in Perinatology* 2001; 25: 272-294.
32. Van den Veyver IB, Moise KJ Jr, Ou CN, et al. The Effect of Gestational Age and Fetal Indomethacin Levels on the Incidence of Constriction of the Fetal Ductus Arteriosus. *Obstet Gynecol* 1993; 82:500-3.
33. Loe SM, Sanchez-Ramos L, Kaunitz AM. Assessing the neonatal safety of indomethacin tocolysis: a systematic review with meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2005 Jul;106(1):173-9.
34. Moise KJ Jr. Effect Of Advancing Gestational Age On The Frequency Of Fetal Ductal Constriction In Association With Maternal Indomethacin Use. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:1350-3.
35. Abou-GhannamG, Usta IM, Nassar AH. Indomethacin in Pregnancy: Applications and Safety. *Am J Perinatol* 2011; 22.

36. Sanborn BM. Hormones and calcium: mechanisms controlling uterine smooth muscle contractile activity. The Litchfield Lecture. *ExpPhysiol* 2001, 86: 223-237.
37. Word RA. Myosin phosphorylation and the control of myometrial contraction/relaxation. *Semin Perinatol* 1995; 19: 3-14.
38. Sanborn BM, Ku CY, Shlykov S, et al. Molecular signaling through G-protein-coupled receptors and the control of intracellular calcium in myometrium. *J Soc Gynecol Investig* 2005, 12: 479-487.
39. Lopez Bernal A, Europe-Finner GN, Phaneuf S, et al. Preterm labour: a pharmacological challenge. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 129-133.
40. Houslay MD, Milligan G. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem. Sci* 1997; 22: 217-224.
41. Mehats C, Tanguy G, Dallot E, et al. Is upregulation of phosphodiesterase 4 activity by PGE₂ involved in the desensitization of beta-mimetics in late pregnancy human myometrium? *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5358-5365.
42. Hanoune J, Pouille Y, Tzavara E, et al. Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 128: 179-194.
43. TesmerJJ, Sprang SR. The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 713-719.
44. Tang WJ, Gilman AG. Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin. *Science* 1995; 268: 1769-1772.

45. Sunahara RK, Dessauer CW, Whisnant RE, et al. Interaction of Gs α with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1997; 272: 22265-22271.
46. Tresguerres M, Levin LR, Buck J. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int* 2011; 79: 1277-88.
47. Hurley JH. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1999; 274: 7599-7602.
48. Seamon K, Daly JW. Activation of adenylate cyclase by the diterpenoforskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* 1981; 256: 9799-9801.
49. Insel PA, Ostrom RS. Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell Mol Neurobiol* 2003; 23: 305-14.
50. Tirapelli CR, Ambrosio SR, da Costa FB, et al. Diterpenes: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2008; 3: 1-8.
51. Taussig R, Gilman AG. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 1995; 270: 1-4.
52. Krupinski J, Cali JJ. Molecular diversity of the adenylyl cyclases. *Adv Sec Mess Phosph Res* 1998; 32: 53-79.
53. Antoni FA, Palkovits M, Simpson J, et al. Ca²⁺/calcineurin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory. *J Neurosci* 1998; 18: 9650-9661.

54. Price SA, Pochun I, Phaneuf S, et al. Adenylyl cyclase isoforms in pregnant and non-pregnant human myometrium. *J. Endocrinol.* 2000; 164: 21-30.
55. Yuan W, López Bernal A. Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2007; 7: S10.
56. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 488-520.
57. Kofinas AD, Rose JC, Meis PJ. Changes in cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase activity in nonpregnant and pregnant human myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 733-738.
58. Montorsi F, Corbin J, Phillips S. Review of phosphodiesterases in the urogenital system: new directions for therapeutic intervention. *J Sex Med* 2004; 1: 322-36.
59. Méhats C, Schmitz T, Oger S, et al. PDE4 as a target in preterm labour. *BMC Pregnancy Childbirth* 2007; 7: S12.
60. Bushnik T, Conti M. Role of multiple cAMP-specific phosphodiesterase variants. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 1014-1019.
61. Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 481–511.
62. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) super family: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther.* 2006;109: 366–398.

63. Leroy MJ, Lugnier C, Merezak J, et al. Isolation and characterization of the rolipram-sensitive cyclic AMP-specific phosphodiesterase (type IV PDE) in human term myometrium. *Cell Signal* 1994; 6: 405-412.
64. Lin CS, Lin G, Xin ZC, et al. Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 3439-57.
65. Ang KL, Antoni FA. Reciprocal regulation of calcium dependent and calcium independent cyclic AMP hydrolysis by protein phosphorylation. *J Neurochem* 2002; 81: 422-433.
66. Martins TJ, Mumby MC, Beavo JA. Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J BiolChem* 1982; 257: 1973-1979.
67. Wu AY, Tang XB, Martinez SE, et al. Molecular determinants for cyclic nucleotide binding to the regulatory domains of phosphodiesterase 2A. *J Biol Chem* 2004; 279: 37928-37938.
68. Kass DA, Takimoto E, Nagayama T, et al. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovasc Res.* 2007; 75: 303-14.
69. Belmonte A, Ticconi C, Dolci S, et al. Regulation of phosphodiesterase 5 expression and activity in human pregnant and non-pregnant myometrial cells by human chorionic gonadotropin. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12: 570-577.
70. Dolci S, Belmonte A, Santone R, et al. Subcellular localization and regulation of type-1C and type-5 phosphodiesterases. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 837-46.

71. Mehats C, Schmitz T, Breuiller-Fouche M, et al. Should phosphodiesterase 5 selective inhibitors be used for uterine relaxation? *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 184-185.
72. Scapin G, Patel SB, Chung C, et al. Crystal structure of human phosphodiesterase 3B: atomic basis for substrate and inhibitor specificity. *Biochemistry* 2004; 43: 6091-6100.
73. Ding B, Abe J, Wei H, et al. Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* 2005; 111: 2469-2476.
74. Houslay MD, Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* 2003; 370: 1-18.
75. Mehats C, Oger S, Leroy MJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterase-4 inhibitors: a promising therapeutic approach to premature birth? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 117: S15-17.
76. Bardou M, Cortijo J, Loustalot C, et al. Pharmacological and biochemical study on the effects of selective phosphodiesterase inhibitors on human term myometrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 360: 457-463.
77. Oger S, Mehats C, Barnette MS, Ferre F, Cabrol D, Leroy MJ. Antiinflammatory and utero-relaxant effects in human myometrium of new generation phosphodiesterase 4 inhibitors. *Biol. Reprod.* 2004; 70: 458-464.
78. Schmitz T, Souil E, Herve R, et al. PDE4 inhibition prevents preterm delivery induced by an intrauterine inflammation. *J Immunol* 2007; 178: 1115-1121.

79. Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 2011; 91:651-90.
80. Ku CY, Murtazina DA, Kim YS, et al. Changes in rat myometrial plasma membrane protein kinase A are confined to parturition. *Reprod Sci* 2010; 17: 696-704.
81. Evans AM. AMP-activated protein kinase underpins hypoxic pulmonary vasoconstriction and carotid body excitation by hypoxia in mammals. *ExpPhysiol* 2006; 91: 821-7.
82. Nagata D, Hirata Y. The role of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system. *Hypertens Res* 2010; 33: 22-8.
83. Olson DM, Christiaens I, Gracie S, et al. Emerging tocolytics: challenges in designing and testing drugs to delay preterm delivery and prolong pregnancy. *Expert Opin Emerg Drugs* 2008; 13: 695-707.
84. Haas DM, Gallauresi B, Shields K, et al. Pharmacotherapy and pregnancy: highlights from the Third International Conference for Individualized Pharmacotherapy in Pregnancy. *ClinTransl Sci* 2011; 4: 204-9.
85. Jeanny B, Aragon-Ching, Haiqing Li, et al. Thalidomide analogues as anticancer drugs. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2007; 2: 167–174.
86. Franova S, Janicek F, Visnovsky J, et al. Utero-relaxant effect of PDE4-selective inhibitor alone and in simultaneous administration with beta2-mimetic on oxytocin-induced contractions in pregnant myometrium. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35: 20-5.

87. Timmer W, Leclerc V, Birraux G, et al. The new phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast is efficacious in exercise-induced asthma and leads to suppression of LPS-stimulated TNF- α ex vivo. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 297-303.
88. Houslay MD, Schafer P, Zhang KYJ. Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Disc Today* 2005; 10:1503-19.
89. Rouget C, Breuiller-Fouché M, Mercier FJ, Leroy MJ, Loustalot C, Naline E, et al. The human near-term myometrial β_3 -adrenoceptor but not the β_2 -adrenoceptor is resistant to desensitization after sustained agonist stimulation. *Br J Pharmacol* 2004; 141:831-41
90. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly, R, et al. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor (alpha) production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991; 173: 699-703.
91. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action tumor necrosis factor- α by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993; 177:1675-80.
92. Muller GW, Corral LG, Shire, MG, Wang H, Moreira A, Kaplan G, Stirling DI. Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. *J Med Chem* 1996; 39: 3238-40.
93. Marriott J, Westby M, Cookson S, et al. CC-3052: A water-soluble analogue of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF- α production. *J Immunol* 1998; 161: 4236-4243.

94. Muller GW, Shire MG, Wong LM, Corral LG, Patterson RT, Chen Y, Stirling DI. Thalidomide analogs and PDE4 inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8:2669-74.
95. Corral LG, Haslett PAJ, Muller GW, Chen R, Wong LM, Ocampo CJ, Patterson RT, Stirling DI, Kaplan G. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF- α . *J Immunol* 1999; 163:380-6.
96. Fernández-Martínez E, Morales-Ríos MS, Pérez-Álvarez V, et al. Effects of thalidomide and 3-phthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanamida on bile duct obstruction-induced cirrhosis in the rat. *DrugDev Res* 2001; 54: 209-18.
97. Fernández-Martínez E, Morales-Ríos MS, Pérez-Álvarez V, Muriel P. Immunomodulatory effects of thalidomide analogs on LPS-induced plasma and hepatic cytokines in the rat. *Biochem Pharmacol* 2004; 68:1321-9.
98. Fernández-Martínez E, Pérez-Hernández N, Muriel P, Pérez-Álvarez V, Shibayama M, Tsutsumi V. The thalidomide analog 3-phthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanoic acid improves the biliary cirrhosis in the rat. *Exp Toxicol Pathol* 2009;61:471-9.
99. Fernández-Martínez E, Wens-Flores I, Moreno GM, Ortiz MI, Muriel P, Pérez-Álvarez V. Short-term effects of thalidomide analogs on hepatic glycogen and nitric oxide in endotoxin-challenged rats. *Gen Physiol Biophys* 2008; 27: 203-10.
100. Fernández-Martínez, E. Chapter 1: Thalidomide and its analogs: a potential immunomodulatory alternative for treating liver diseases and

cirrhosis. En: Liver Cirrhosis: Causes, Diagnosis and Treatment. Editor: Miranda L. Michelli; Ed. Nova Science Publishers, Inc., Nueva York, Estados Unidos, pág. 1-30 (2011). ISBN: 978-1-61209-248-5.

101. Vause S, Johnston T. Management of preterm labour. Arch Dis Child Fetal Neonatal 2000; 83 :79-85.
102. Bastek JA, Gómez LM, Elovitz MA. The role of inflammation and infection in preterm birth. Clin Perinatol 2011;38:385-406.
103. Murguía de Sierra MT, Lozano R, Santos JI. Mortalidad perinatal por asfixia en México: problema prioritario de salud pública por resolver. Bol Med Hosp Infant Mex 2005; 62: 375-383.
104. World Health Organization (WHO). Neonatal and Perinatal Mortality: country, regional and global estimates. WHO Library, France, 2006.
105. SINAIS, Sistema Nacional de Información en Salud, Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de muertes fetales, 1985-2007, en línea; México: Secretaría de Salud. <http://www.sinais.salud.gob.mx>. Consulta: 10 de diciembre de 2011.
106. Villanueva-Egan LA, Contreras-Gutiérrez AK, Pichardo-Cuevas M, Rosales-Lucio J. Perfil epidemiológico del parto prematuro. Ginecol Obstet Mex 2008;76:542-8.
107. Osorno-Covarrubias L, Rupay-Aguirre GE, Rodríguez-Chapuz J, Lavadores-May AI, Dávila-Velázquez J, Echeverría-Eguiluz M. Factores maternos relacionados con prematuridad. Ginecol Obstet Mex 2008;76:526-36.

108. Klukovits A, Verli J, Falkay G, Gáspár R. Improving the relaxing effect of terbutaline with phosphodiesterase inhibitors: studies on pregnant rat uteri in vitro. *Life Sci* 2010;87:733-7.
109. Buxton IL. What is it about the uterus anyway? *Proc West PharmacolSoc* 2003;46:1-8.
110. Bardon M, Cortijo J, Loustalot C, Taylor S, Perales-Marín A, Mercier FJ, Dumas M, Denux C, Frydman R, Morcillo E, Advenier C. Pharmacological and biochemical study on the effects of selective phosphodiesterase inhibitors on human term myometrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 360, 457-463
111. Céline M, Thomas S, Stéphanie O, Roxane H, Dominique C, Marie J L. PDE4 as a target in preterm labour: *BMG Pregnancy and Childbirth* 2007;1-5
112. Muller GW, Shire MG, Wong ML, Corral LG, Patterson RT, Chen Y, Stirling DI. 1998. Thalidomide analogs and PDE4 inhibition. *Bioorganic & Medicinal chemistry Letters* 8, 2669-2674
113. Fernández-Martínez E, Morales-Ríos MS, Pérez-Alvarez V, Muriel P. 2004. Immunomodulatory effects of thalidomide analogs on LPS-induced plasma and hepatic cytokines in the rat. *Biochem Pharmacol.* 68(7):1321-9
114. Chiossi G, Costantine MM, Betancourt A, Hankins DV, Longo M, Saade GR, Bytautiene E. 2010. Does sildenafil citrate affect myometrial contractile response to nifedipine in vitro? *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 203, 252 e1-5

	Clave	Aspecto Macroscópico Tamaño de la Muestra	Después de Limpiar la Muestra en Cuantas Tiras se Enjujó	Mostró Actividad Espontánea	Compuesto Ensayado	Respuesta
NMO	180112	bueno 2.5 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
ACP	190112	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
SHM	200112	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MTR	230112	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MRJ	250112	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MCC	260112	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MMS	270112	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MRP	300112	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
JMP	310112	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
LAA	10212	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
APG	30212	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
RES	60212	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MCC	80212	bueno 2.7 x 2.2	12	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MCO	100212	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
YGI	130212	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
TSP	140212	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
LJD	170212	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
PRO	200212	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
CGC	210212	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
JGS	220212		6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
SHH	240212	bueno 3.1 x 2.1 cm	12	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
CUC	270212	bueno 2.1 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
IHH	290212	bueno 3 x 2.5	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
GAT	20312	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
DCS	50312	bueno 2.1 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MFM	70312	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
FSA	80312	3 x 2.5 cm	12	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MSR	90312	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
CAR	120312	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
SVM	140312	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
JCH	160312	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
ASA	190312	bueno 3.2 x 2.5 cm	12	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
GOA	210312	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
NEA	220312	bueno 2.1 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
BPC	230312	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
JEM	260312	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
YHC	280312	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
VGCH	300312	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
AGA	20412	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
PSH	40412	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
ESM	60412	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MRR	90312	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
EMR	110412	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
ALP	130412	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
DRS	170412	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
IRL	180412	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
LHM	200412	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
ABD	250412	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
GGG	270412	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MMI	300412	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MNG	10512	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
AZCH	20512	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
RDI	30512	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
VMH	40512	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MAH	140512	bueno 2.1 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
OTM	150512	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
PCC	160512	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
JSA	170512	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MHG	180512	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
EMM	210512	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
CHC	220512	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
AFL	230512	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
BCHH	230512	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
MJCB	230512	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
JMC	240512	bueno 2.1 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
ARA	250512	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
JCC	280512	bueno 2.5 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
VGH	290512	bueno 2.3 x 2.1 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
DMPH	300512	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si
YRL	310512	bueno 2.2 x 2 cm	6	Si	4NQFDPMe, 4AFDPMe y ROLIPRAM	Si