



**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 EFECTO RELAJANTE DE LA COMBINACIÓN LUMIRACOXIB Y
DROSPIRENONA EN MÚSCULO LISO UTERINO HUMANO**

QUE PRESENTA EL C.JOSÉ ARTURO MORA RODRÍGUEZ MÉDICO CIRUJANO

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

**DR.GUILLERMO BARRÁGAN RAMÍREZ ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y
OBSTETRICIA PROFESOR TITULAR DE LA ESPECIALIDAD EN GINECOLOGÍA Y
OBSTETRICIA**

**DR.HÉCTOR ANTONIO PONCE MONTER DOCTOR EN FARMACOLOGIA
ASESOR METODOLÓGICO**

**PERIODO DE ESPECIALIDAD
2006-2010**

POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

C.D. JOSÉ LUIS ANTÓN DE LA CONCHA
DIRECTOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS
DE LA SALUD DE LA U.A.E.H

DR. LUIS CARLOS ROMERO QUEZADA
JEFE DEL ÁREA ACADÉMICA DE
MEDICINA DEL I.C.Sa

DRA. ANGELINA FRANCO SUÁREZ
COORDINADORA DE ESPECIALIDADES MÉDICAS

DRA. LOURDES CRISTINA CARRILLO ALARCÓN
CATÉDRATICA TITULAR DE METODOLÓGIA
DE LA INVESTIGACIÓN

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 RÍOS
SUBDIRECTORA DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
DEL HOSPITAL GENERAL DE LA SECRETARIA DE
SALUD DE HIDALGO

DR. GUILLERMO BARRÁGAN RAMÍREZ
ESPECIALISTA EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA
PROFESOR TITULAR DEL PROGRAMA DE LA
ESPECIALIDAD EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA
Y ASESOR CLINICO

DR. HÉCTOR ANTONIO PONCE RAMÍREZ
DOCTOR EN FARMACOLOGIA
ASESOR METODOLÓGICO

Tabla de contenido

Antecedentes científicos.....	4
Planteamiento del problema.....	13
Objetivos del estudio	14
Definición de términos.....	15
Descripción de la metodología desarrollada.....	17
Hallazgos.....	19
Resultados.....	22
Discusión.....	26
Conclusión.....	28
Bibliografía.....	29

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

Se entiende por dismenorrea a la menstruación dolorosa, frecuentemente con cólicos, náuseas, dolor de cabeza y otras molestias abdominales. El síntoma más característico de la dismenorrea lo constituye el dolor o molestia en la zona baja del abdomen; acompañándose de otros síntomas que pueden variar de una persona a otra: entre los cuales pueden incluirse sentimientos negativos, que se extienden a la depresión, ansiedad, irritabilidad y la baja autoestima. Asimismo, la dismenorrea suele aparecer no sólo con dolor abdominal sino que se asocia a: calambres en la parte baja del abdomen, dolor en la parte baja de la espalda, dolor irradiado hacia las piernas, edema en miembros, inflamación de senos y abdomen, vómito, diarrea, debilidad, lipotimia y malestar general.

La dismenorrea se define como el conjunto de síntomas que aparecen al final del ciclo menstrual y que la persona asocia al comienzo de la menstruación e inclusive durante la misma. La dismenorrea (etimológicamente “menstruación dificultosa” y en lenguaje clínico “menstruación dolorosa”) es uno de los cuadros cíclicos, dentro de los procesos dolorosos pélvicos crónicos ⁽¹⁾. Se le denomina también “algomenorrea” y puede variar desde episodios muy poco intensos, apenas molestos, hasta situaciones extremadamente severas aunque mucho más raras en las que junto al dolor de gran intensidad, aparecen náuseas, vómitos y diarrea, provocando una morbilidad muy significativa, aunque nunca amenaza directamente la vida ⁽²⁾. Aunque etimológicamente el concepto de dismenorrea hace referencia a cualquier alteración que se observe en el ciclo menstrual (amenorrea, mialgia, etc.) en la actualidad el término se usa para referirse a todas aquellas sensaciones de malestar y dolor que se producen durante la menstruación. La dismenorrea se clasifica en dismenorrea primaria y dismenorrea secundaria ⁽³⁾.

Particularmente, se habla de dismenorrea primaria cuando no existe una patología pélvica que explique el trastorno. La dismenorrea primaria usualmente inicia dentro de los pocos años de presentarse la menarca. Tiene su más alta incidencia durante la segunda década de la vida ⁽⁴⁾.

Se ha demostrado que las hormonas esteroides juegan un papel importante en la fisiopatología de la dismenorrea primaria. A este respecto, diversos estudios han encontrado que al final de la fase lútea, existe una disminución de las hormonas

esteroides (estrógenos y progesterona) del ovario y se produce un aumento en la producción de prostaglandinas en el útero. La dismenorrea primaria es debida a contracciones del miometrio inducido por prostaglandinas (principalmente $\text{PGF}_{2\alpha}$) producidas y liberadas por el endometrio secretor, las cuales producen contracción miometral importante, vasoconstricción de vasos endometriales y miometriales, isquemia del útero y sensibilización de las terminales nerviosas que en conjunto se va a traducir en dolor ⁽⁵⁾. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ va aumentando progresivamente desde la fase folicular, alcanzando su mayor producción en las primeras 48 horas de la menstruación, coincidiendo con la máxima intensidad de los síntomas. Esta producción está asociada a los ciclos ovulatorios ⁽⁶⁾. Asimismo, se ha encontrado que la producción de leucotrienos está aumentada en tejidos endometrial y uterino en casos de dismenorrea primaria, sugiriendo un posible papel de éstos en su etiología ⁽⁷⁾.

Los síntomas de la dismenorrea primaria generalmente comienzan durante el primer día de la menstruación, aunque pueden comenzar unas horas antes y persistir durante algunas horas o días después.

La dismenorrea primaria usualmente se presenta durante la adolescencia dentro de los 3 años después de la menarca. Muy raramente iniciará la dismenorrea en los primeros 6 meses después de la menarca. La dismenorrea se presenta en las mujeres como un dolor agudo de espasmo intermitente provocado por los espasmos y contracciones de los músculos uterinos. Este dolor es usualmente localizado a la zona suprapúbica. No obstante, el dolor puede irradiar a la parte interna o trasera de los muslos o a la zona lumbar de la espalda. El dolor generalmente dura de 48 a 72 horas en la menstruación. Este dolor se acompaña usualmente de síntomas sistémicos ya mencionados anteriormente. El dolor usualmente se desarrolla dentro de las primeras horas del inicio de la menstruación y alcanza su pico más alto de acuerdo a cómo el fluido menstrual se vuelve más abundante, lo cual ocurre durante el primer o segundo día del ciclo ⁽⁸⁾.

La dismenorrea secundaria es el dolor coincidente con la menstruación pero asociado a procesos patológicos como endometriosis, adenomiosis, enfermedad pélvica inflamatoria, tumoraciones, estenosis cervical, malformaciones uterinas, congestión pélvica y dispositivo intrauterino ⁽⁹⁾.

La dismenorrea secundaria puede ser diferenciada de la primaria por la edad de la menarca, longitud del ciclo y la regularidad y tiempo del dolor. La endometriosis puede presentarse como una dismenorrea progresiva, pero esta es frecuentemente acompañada por dolor entre cada menstruación, puede además presentar infertilidad, hemorragia uterina disfuncional, dispareunia, disuria, etc.

Usualmente no se debe hallar dolor cuando se realiza la palpación abdominal en la fase no menstrual en caso de dismenorrea primaria.

En adolescentes que inician la dismenorrea a los 6 meses después de la menarca y pacientes anovulatorios con dismenorrea se debe considerar en una obstrucción congénita del tracto genital ⁽¹⁰⁾.

Igualmente es posible diferenciar la dismenorrea del síndrome premenstrual, basándonos en la historia del paciente. El dolor en el síndrome premenstrual es generalmente relacionado con entumecimiento de mamas e inflamación abdominal, mejor dicho que un dolor de tipo espasmódico en la parte baja del abdomen. Además los síntomas en el síndrome premenstrual comienzan antes de la menstruación y se resuelven usualmente al inicio del flujo de la menstruación ⁽¹¹⁾.

Se podrá sospechar un caso de dismenorrea secundaria, cuando los pacientes no responden adecuadamente al tratamiento típico de la dismenorrea primaria, es decir, a la administración de diversos AINEs.

Prevalencia de la dismenorrea

De acuerdo a la literatura mundial, la prevalencia de mujeres menstruantes que presentan dismenorrea primaria, oscila desde un 7.2 % hasta un 90 %. Así, la prevalencia de la dismenorrea se ha valorado a través de estudios epidemiológicos en varios países de Europa ^(12,13,14) , Norteamérica ^(15,16,17) , África ^(18,19) , Australia ⁽²⁰⁾ , Asia ⁽²¹⁾ y México ^(22,23,24,25) .

En un estudio realizado en nuestro país, se aplicó una encuesta para determinar la frecuencia de dismenorrea a 1066 estudiantes de la ciudad de México, D.F. En este estudio la prevalencia de dismenorrea primaria fue del 52.3% para las mujeres menores de 15 años; 63.8% para las estudiantes de 15 a 19 años; y de 52.3% para las estudiantes de 20 a 24 años ⁽²²⁾.

Pawlowski (2004) realizó un estudio para determinar la prevalencia de dismenorrea en una población Maya (Yaxcaban Yucatán, México). El estudio demostró una prevalencia general de 28%.

Recientemente, una prevalencia de dismenorrea del 90% fue reportada por Velasco-Rodríguez y cols. (2006) en un grupo de estudiantes de la licenciatura de enfermería de la ciudad de Colima, Colima, México.

Más recientemente, nuestro grupo de investigación reportó una prevalencia de 67% en estudiantes de la licenciatura de Psicología y del 70% de la licenciatura de nutrición de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo ⁽²⁵⁾.

Tratamiento de la dismenorrea

En cuanto a los tratamientos más eficaces que se observan en esta área, la mayoría son inicialmente con medicación. Muchos de los tratamientos para la dismenorrea con medicamentos no han sido bien estudiados. Siempre la elección de un tratamiento con medicamentos debe tomar en cuenta principalmente la eficacia y la seguridad.

Actualmente, los AINEs son los fármacos de primera elección en el tratamiento de la dismenorrea primaria. La dismenorrea primaria es debida a contracciones del miometrio inducido por prostaglandinas (principalmente $\text{PGF}_{2\alpha}$) producidas y liberadas por el endometrio secretor, las cuales producen contracción miometral importante, vasoconstricción de vasos endometriales y miometriales, isquemia del útero y sensibilización de las terminales nerviosas que en conjunto se va a traducir en dolor. Varios estudios clínicos han demostrado la eficacia de los AINEs en el tratamiento de la dismenorrea primaria; desde los inhibidores no selectivos de COX, hasta los inhibidores selectivos de COX-2 ^(26,27,28). En general se comienza el tratamiento con AINEs no selectivos como naproxeno, ibuprofeno, ácido mefenámico, ácido flumenámico, ácido acetilsalicílico o acetaminofén. En personas con riesgo de daño gastrointestinal, se puede sugerir la utilización de los inhibidores selectivos de COX-2 como el celecoxib, lumiracoxib, etoricoxib, meloxicam y nimesulide ^(26, 27,28). Los AINEs pueden ser el tratamiento más eficaz de la dismenorrea primaria, pero éstos deben administrarse antes de iniciar el dolor y el fluido menstrual.

El daño a un tejido activa a la fosfolipasa A_2 , lo que causa liberación de ácido araquidónico. Este ácido después puede ser convertido a leucotrienos o lipoxinas por la enzima lipooxigenasa, o por otro lado, la enzima ciclooxigenasa (COX) puede producir

prostaglandinas y tromboxanos. Se han identificado en forma general dos ciclooxigenasas, llamadas COX-1 y COX-2. COX-1 está presente de manera basal (constitutiva) en la mayoría de los tejidos y mantiene el funcionamiento normal de la mucosa gástrica, riñones y las plaquetas. COX-2 no está presente de manera basal en la mayoría de los tejidos. Los lugares en donde se encuentra la COX-2 de manera basal son en el sistema nervioso central, el tracto gastrointestinal, riñones, huesos, ovarios y útero. Diversos estudios han demostrado que la COX-2 es principalmente una enzima que es inducible por citocinas pro-inflamatorias y produce prostaglandinas que van a modular la respuesta inflamatoria y el dolor. La inhibición de la producción de prostaglandinas es la meta terapéutica (29,).

Lumiracoxib

Los inhibidores selectivos de la COX-2 son una clase de fármacos los cuales inhiben selectivamente a la COX-2, una enzima inducible que cataliza la producción de prostaglandinas involucradas en el proceso inflamatorio. El efecto analgésico de los inhibidores de la COX-2 en modelos de dolor inflamatorio está atribuido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (30). La inhibición selectiva de la COX-2 reduce los eventos adversos gastrointestinales así como el dolor e inflamación (31). Lumiracoxib es relativamente un nuevo inhibidor selectivo de COX-2. Tiene una estructura química distinta a otros inhibidores selectivos de la COX-2, ya que no posee un grupo sulfato pero si un ácido carboxílico que es una característica que poseen muchos AINEs (30). Lumiracoxib se une e interactúa con la enzima COX-2 e inhibe la producción de PGE₂ al 100%, pero no tienen efecto sobre la formación de tromboxano (TXA₂) (30). El lumiracoxib se emplea para el alivio del dolor agudo, moderado a severo asociado con dismenorrea primaria, cirugía dental y ortopédica y para el tratamiento de síntomas asociados con la osteoartritis y artritis reumatoide (32).

En un estudio realizado en el año 2004, Bitner y cols., evaluaron la eficacia y tolerabilidad de lumiracoxib en pacientes con dismenorrea primaria. Los autores compararon el lumiracoxib con rofecoxib, naproxeno y placebo. En este estudio se encontró que todos los fármacos fueron superiores a placebo en el alivio de la sintomatología asociada con dismenorrea. Asimismo, no se encontró una diferencia en la eficacia entre los 3 fármacos y todos los tratamientos fueron bien tolerados. En este

mismo sentido, Daniels y cols., (2008) evaluaron la eficacia de lumiracoxib contra naproxeno y placebo en mujeres con dismenorrea primaria de moderada a severa. Los autores encontraron que lumiracoxib y naproxeno no fueron diferentes en eficacia, pero fueron más eficaces que placebo y mostraron que ambos tratamientos fueron bien tolerados.

Sin embargo, no existe estudio alguno en la literatura que demuestre el efecto relajante de lumiracoxib en músculo uterino aislado. Posiblemente, la eficacia de lumiracoxib en las mujeres con dismenorrea se relacione mejor con la capacidad de lumiracoxib de inhibir la síntesis de prostaglandinas, entre ellas la $\text{PGF}_{2\alpha}$. No obstante, es posible que lumiracoxib produzca un efecto útero relajante de manera directa, como lo realizan otros AINEs ⁽³³⁾.

Drospirenona

La drospirenona es una progestina derivada de 17α -espironolactona y su perfil farmacológico es muy semejante a la progesterona natural ⁽³⁴⁾. Drospirenona tiene actividad anti-aldosterona y antiandrogénica. Por un lado, drospirenona actúa al bloquear los receptores a aldosterona en el riñón, lo que ocasiona eliminación de sodio y agua, junto con una leve retención de potasio. Por esta razón, drospirenona puede contrarrestar la estimulación inducida por estrógenos del sistema renina-angiotensina-aldosterona que puede ocasionar retención de agua y sodio y problemas tales como edema e hinchazón de senos y abdomen; e incluso evita también elevaciones en el peso corporal y en la presión arterial ⁽³⁴⁾. Por otro lado, la drospirenona mejora el acné y problemas relacionados con la piel, gracias a su actividad anti-androgénica ⁽³⁵⁾. Este último efecto anti-androgénico logra además cambios favorables en el perfil de lípidos, disminuyendo los niveles de colesterol.

Anteriormente se mencionó que los cuadros de dismenorrea se asocian a ciclos ovulatorios en la mujer. En este sentido, en pacientes con dismenorrea es de utilidad la inhibición de la ovulación por anticonceptivos orales que contienen una progestina y algún estrógeno ⁽³⁶⁾. La combinación de anticonceptivos orales inhibe la ovulación por medio de un mecanismo de retrocontrol positivo en el hipotálamo, lo que altera el patrón de secreción de FSH y LH por la pituitaria anterior. La fase folicular provocada por la FSH y el ciclo de las gonadotropinas se inhibe. Existen varios estudios que han demostrado que la combinación de algún estrógeno junto con drospirenona produce

ciclos anovulatorios ⁽³⁷⁾. Asimismo, en un estudio realizado con mujeres sanas, se demostró que drospirenona sola a una dosis de 3 mg/día inhibió la ovulación y además esta dosis fue bien tolerada ⁽³⁸⁾. En la literatura se ha reportado que drospirenona junto con algún estrógeno es de utilidad para el tratamiento de síndrome premenstrual ⁽³⁹⁾. No obstante, al igual que en el caso de lumiracoxib, no hay algún estudio en la literatura que demuestre el efecto relajante de drospirenona en músculo uterino aislado.

Las acciones de la drospirenona, antes mencionadas, indican que esta sustancia se comporta como la progesterona, a diferencia de las progestinas no esteroideas. Sin embargo, se desconoce si la drospirenona tiene efecto útero-relajante sobre el miometrio humano, como lo hace la progesterona a través de un efecto directo no genómico, sobre las células miometriales ⁽⁴⁰⁾.

Técnicas farmacológicas para el estudio in vitro del útero

Como ya se mencionó anteriormente, el síntoma más importante en pacientes con dismenorrea, es el dolor (cólico) en la parte baja del abdomen (hipogastrio). Este dolor es originado por la liberación de prostaglandinas y otros mediadores que ocasionan contracciones fuertes y sostenidas del músculo uterino, causando isquemia y sensibilización de las fibras nerviosas sensoriales. Por este motivo, todas las estrategias de tratamiento en las pacientes con dismenorrea consisten en: 1. disminuir o eliminar la exagerada contracción uterina; y 2. desensibilizar las fibras nerviosas del sistema nociceptivo. En este sentido, los AINEs cumplen con los 2 requerimientos, es decir, éstos disminuyen la síntesis de prostaglandinas y por lo tanto, disminuyen las contracciones uterinas y además disminuye la sensibilización de las fibras nerviosas sensoriales. Asimismo, la drospirenona, al inhibir la ovulación, disminuye la fase secretoria y va a disminuir la formación y liberación de prostaglandinas. Al disminuir las prostaglandinas, se va a disminuir las contracciones uterinas exageradas y la sensibilización de las fibras nerviosas que inervan el útero y tejidos adyacentes.

Se han utilizado diversas técnicas preclínicas de estudio para determinar el papel que juegan los mediadores inflamatorios y fármacos que alivian la sintomatología de la dismenorrea. Una de ellas es el estudio del útero aislado (in vitro). El útero es el órgano de la gestación. Su forma es comparable con una pera aplanada e invertida. Presenta una parte superior más ancha, el cuerpo y una inferior de forma cilíndrica, el cuello. Entre

ambas existe una zona intermedia sin límite preciso, llamada istmo. En la parte superior, por encima de la inserción de las trompas de Falopio, presenta una eminencia que se denomina fondo uterino. La pared del útero presenta a la sección tres capas de células que son de fuera a dentro: a). serosa, que corresponde al peritoneo en la parte posterosuperior, y a tejido laxo que se extiende por los lados en los parametrios. b). Miometrio, formado por tejido muscular liso con una capa de fibras longitudinales y otra capa de fibras circulares. c). Endometrio, que es una capa mucosa especializada que se renueva en cada ciclo menstrual.

En el caso especial del estudio de fármacos con probable utilidad en aliviar la sintomatología de la dismenorrea, se utilizan las capas musculares uterinas aisladas de humano. Para este fin, en una cámara especial, el tejido muscular uterino se contrae previamente y se añaden a esta cámara los fármacos para estudiar sus efectos relajantes. Si un fármaco es capaz de relajar el músculo uterino pre-contráido, entonces, esta molécula tiene el potencial para ser utilizada clínicamente para el tratamiento de la dismenorrea primaria.

Varias investigaciones han demostrado que algunos AINEs (indometacina, diclofenaco, fenilbutasona, ácido mefenámico, naproxeno, tolmetín, piroxicam, aspirina) y algunas hormonas esteroideas (progesterona, estradiol, etc.); son capaces de inhibir la contracción del músculo uterino in vitro ^(41.42). Estos resultados apoyan la utilización de estos fármacos en el tratamiento de dismenorrea primaria. Sin embargo, no existen datos publicados que demuestren la efectividad de lumiracoxib o drospirenona en disminuir la contracción de músculo uterino aislado de humano.

Interacciones farmacológicas

Las interacciones farmacológicas ocurren cuando hay 2 o más fármacos presentes en el organismo y uno de ellos aumenta o disminuye la acción del otro. Es importante el conocimiento de las interacciones farmacológicas, ya que éstas pueden ser positivas o negativas. Las interacciones farmacocinéticas tienen que ver con un aumento o disminución de la concentración del fármaco en el organismo (en el lugar de acción). Mientras que las interacciones farmacodinámicas tienen que ver con el aumento o disminución de la acción farmacológica y, por lo tanto, de la respuesta y efecto

farmacológico. Cuando se administran 2 o más fármacos simultáneamente para el mismo fin, pueden ocurrir tres tipos de interacciones farmacodinámicas: a). Aditiva, la cual da como resultado la suma de los efectos individuales ($1+1=2$); b). Infra-aditiva, la cual da como resultado un antagonismo del efecto ($1+1=1$); y c). Supra-aditiva, la cual da como resultado un efecto de potenciación, en donde el efecto es mayor a la suma de los efectos individuales ($1+1=3$). Una ventaja de la interacción supra-aditiva es que al obtener un efecto mayor, se pueden reducir las dosis de las combinaciones con el fin de prevenir reacciones adversas.

Uno de los mejores ejemplos sobre interacción supra-aditiva, lo vemos en el tratamiento del dolor moderado a severo, en donde se utiliza la combinación de 2 fármacos para su alivio, un opiáceo con un AINE. Otros ejemplos muy claros los tenemos en la utilización de anti-microbianos (trimetoprim y sulfametoxazol) o en la quimioterapia del cáncer. Es importante mencionar, que para algunos casos en particular, estas combinaciones de fármacos han sido estudiadas de manera preclínica. Es decir, por diferentes métodos experimentales (cultivo celular, órgano aislado, animal completo, etc.) se estudia si la combinación de 2 o más fármacos produce alguna interacción (infra-aditiva, aditiva o supra-aditiva). La interacción observada en los estudios preclínicos o experimentales es de suma importancia, ya que puede servir de apoyo para que se realicen estudios clínicos para demostrar su utilidad o para apoyar su efectividad cuando la combinación ya se encuentra en el mercado.

En la actualidad, existen varios productos farmacéuticos recomendados para el tratamiento de la sintomatología de la dismenorrea primaria que tienen la combinación de 2 o más fármacos. Se mencionan algunos de ellos a continuación. El Syncol®, que contienen 3 diferentes fármacos: paracetamol, pamabron y pirilamina. El Syncol Max® con cafeína, paracetamol y pirilamina. Otros medicamentos en nuestro medio con 2 fármacos, es por un lado la Buscapina compositum® que contiene N-butilbromuro de hioscina y metamizol; y por el otro lado la Espasmo-cibalgina® con propifenazona y clorhidrato de drofenina. Sin embargo, no existe alguna combinación que involucre la participación de un AINE con algún progestágeno, como lo es la drospirenona.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál será el tipo de interacción farmacológica al aplicar la combinación de lumiracoxib y drospirenona en músculo liso uterino de humano?

OBJETIVOS.

Objetivo General

Determinar el efecto relajante de lumiracoxib, drospirenona y de la combinación lumiracoxib + drospirenona en músculo liso uterino aislado de humano.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto relajante de lumiracoxib en músculo uterino aislado de humano.
2. Determinar el efecto relajante de drospirenona en músculo uterino aislado de humano.
3. Determinar el efecto relajante de la combinación lumiracoxib + drospirenona en músculo liso uterino aislado de humano.
4. Analizar y determinar el tipo de interacción farmacológica de la combinación lumiracoxib + drospirenona.

DEFINICION DE TERMINOS

Adenomiosis: Es un engrosamiento uterino que se produce cuando el tejido endometrial, que normalmente recubre el útero, se pasa a las paredes musculares externas del mismo.

Anticonceptivo: toda conducta, método, sustancia o elemento, natural o artificial, que tiene la finalidad de evitar la génesis de un embarazo.

Antinflamatorio no esteroideo: Medicamento que actúa impidiendo la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición competitiva y reversible de la ciclooxigenasa.

COX-2: Es una enzima que participa en la producción de las prostaglandinas que se ha comprobado juegan un papel importante en el proceso inflamatorio, por lo tanto, al inhibirla se produce la disminución de la inflamación y el dolor.

Dismenorrea: Se define como el conjunto de síntomas que aparecen al final del ciclo menstrual y que la persona asocia al comienzo de la menstruación e inclusive durante la misma.

Dismenorrea Primaria: Es cuando no existe una patología pélvica que explique el trastorno.

Dismenorrea Secundaria: Es el dolor coincidente con la menstruación pero asociado a procesos patológicos.

Dispareunia: Dolor genital o abdominal que puede sufrir la mujer durante el coito.

Disuria: Se define como la micción dificultosa, dolorosa e incompleta de la orina.

Drospirenona: Progestina sintética análogo a la espironolactona usado en algunas formulaciones de anticonceptivos orales.

Endometriosis: Enfermedad ginecológica caracterizada por la presencia de mucosa endometrial, fuera de la cavidad uterina normal.

Infertilidad: Es la incapacidad para quedar embarazada después de 12 meses de relaciones sexuales (coito) sin protección.

Leucotrienos: Son eicosanoides derivados de lípidos de membrana que se sintetizan a partir de ácido araquidónico.

Lumiracoxib: es un inhibidor selectivo COX-2.

Menarca: Primer sangrado menstrual.

Prostaglandinas: lípidos formados en la mayor parte de los tejidos del organismo a partir del ácido araquidónico que actúan como mediadores en un gran número de procesos fisiológicos.

DESCRIPCION METODOLOGIA DESARROLLADA.

Bajo un consentimiento informado por escrito se extrajo tejido miometrial de mujeres premenopáusicas, (de 22 ± 50 años) sometidas a histerectomía electiva llevado a cabo por diversas patologías (fibromas uterinos, prolapso uterino, menorragia y dismenorrea). En el momento de la cirugía ninguna de las mujeres había usado anticonceptivos orales o AINE o había recibido terapia hormonal. Tiras de miometrio (08.12 mm x 02.03 mm) se prepararon a partir de biopsias musculares tomadas de uno de los tres lugares: la parte superior, la pared lateral o el segmento inferior uterino del cuerpo del útero. El tejido se colocó inmediatamente en una solución salina fisiológica fría. La muestra fue transportada al laboratorio y se mantuvo refrigerada (4°C) durante 24 h. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital General de los Servicios de Salud de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México, y se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki.

Graficación de las contracciones isométricas.

Los segmentos de miometrio se suspendieron en paralelo para el registro de la tensión isométrica utilizando transductores de tensión FT03 Grass en baños de órgano de 3 ml con gaseosas (O_2 del 95%: 5% de CO_2) tampón Krebs Ringer (RKB) con la siguiente composición (mM): NaCl 120, NaHCO_3 20, KCl 4.4, KH_2PO_4 1.2, MgCl_2 1.2, CaCl_2 1.5, y la glucosa en 11, pH 7.4. La solución de RKB se mantuvo a 37°C y gaseados continuamente con una mezcla de O_2 del 95%: 5% de CO_2 . Cada tira miometrio fue puesta bajo una tensión óptima de reposo de 1 g, y el tono muscular espontáneo se le permitió desarrollar. Las tiras de miometrio, después de equilibrar durante 1 h en una solución de RKB, mientras se lavó cada 10 minutos, exhibieron una actividad contráctil

espontánea con una frecuencia irregular. El método utilizado para los estudios detallados tensión ha sido descrito previamente ⁽⁴³⁾.

La Solución despolarizante (60 mM KCl) fue preparada por la sustitución equimolar de NaCl por KCl. Debido a que las contracciones eran un poco irregular y de baja intensidad, los tejidos fueron estimulados con la solución de despolarización y los que tienen dos respuestas similares consecutivos fueron incluidos en el estudio. Cada experimento fue repetido 5-6 veces usando nuevas tiras de miometrio. Respuestas contráctiles se registraron isométricamente con transductores de tensión FT03 Grass conectado a un polígrafo Grass Telefactor RPS312 RM, los datos fueron digitalizados y analizados por medio de software de PolyView. El lumiracoxib , drospirenona y lumiracoxib/drospirenona fueron disueltos en una mezcla de etanol / DMSO (2:1) la mezcla fue de tal manera que el contenido final del vehículo en el baño de órganos fue de 0,15%, esta cantidad de vehículos no afecta a la contracción tónica inducida por KCl.

HALLAZGOS.

Diseño del estudio.

Las tiras de miometrio que tuvieron contractilidad con la solución despolarizante (60 mM KCl), y las sustancias de ensayo se añadieron a la contracción tónica 20 minutos después de un estímulo (fase de meseta). Los tejidos fueron tratados con los viales y se decidía aumentar las dosis de lumiracoxib (100-3200 / M), drospirenona (3.2 a 100 mM) o LuDr (concentraciones , véase más adelante). Cada concentración de los medicamentos se mantuvo durante 20 minutos, el tiempo en que se alcanza la fase de meseta de la relajación. Después de la adición de compuestos, se realizó la reestimulación con KCl. La viabilidad de los tejidos se verificó mediante la adición de soluciones despolarizantes para controlar las tiras de miometrio al final de cada experimento (aprox. 150 minutos), que mostró la amplitud de las contracciones similares como al principio del ensayo. Los datos fueron expresados como porcentaje de la máxima respuesta tónica inducida por 60 mM KCl (100%). Para establecer que el efecto relajante no se originó por la variabilidad biológica de los tejidos, la prueba se repitió para cada concentración de al menos cinco veces para obtener la desviación estándar. Por otra parte, un control de tejido se mantuvo en cada experimento, que no mostró variación en la respuesta a las contracciones inducidas por KCl.

En el presente estudio, hemos utilizado el análisis isobolográfico para determinar la naturaleza de la interacción de drogas entre el lumiracoxib y drospirenona ⁽⁴⁴⁾. Se supone que la combinación de medicamentos hace que las concentraciones equipotentes de los fármacos individuales ⁽⁴⁴⁾. Las curvas de concentración-respuesta de cada agente individual, la concentración resultante en el 50% del efecto (EC50) se podría determinar. Sin embargo, teniendo en cuenta un efecto máximo del 100% como la supresión total de la contracción, parece que el lumiracoxib no pudo lograr una

respuesta del 50%, y por lo tanto el cálculo de la EC50 no era factible. Por lo tanto, se estimó una menor concentración efectiva (EC30) en lugar de EC50 ^(45,46). Posteriormente, una curva de concentración-respuesta se obtuvo mediante la entrega simultánea de lumiracoxib y drospirenona en una mezcla de proporción fija (1:1) con base en los valores de EC30 de cada agente individual. Para construir esta curva experimental, los grupos de tejidos recibió una de las siguientes concentraciones de la combinación: EC30 Lumiracoxib (LuEC30) + EC30 Drospirenona (DrEC30); LuEC30 / 2 + DrEC30 / 2; LuEC30 / 4 + DrEC30 / 4; LuEC30 / 8 + DrEC30 / 8, o LuEC30/16 DrEC30/16 +. El valor EC30 experimental de la combinación se calcula a partir de esta curva experimental.

El EC30 aditivo teórico fue estimado a partir de las curvas de concentración-respuesta de cada fármaco administrado de forma individual, es decir, teniendo en cuenta que el efecto observado con la combinación es el resultado de la suma de los efectos de cada droga individual. Este valor EC30 teórico se compara con la EC30 obtenido experimentalmente para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa ^(46,47). Los valores ED30 teórico y experimental de la combinación del estudio también se contrastaron mediante el cálculo del índice de interacción (γ) como sigue: $\gamma = \text{EC30 de combinación (experimental)} / \text{EC30 de combinación (teórico)}$ ⁽⁴⁷⁾.

Un índice de interacción no es significativamente diferente de la unidad corresponde a una interacción aditiva, mientras que los valores superiores e inferiores que la unidad implica una interacción antagónica y sinérgica, respectivamente ^(46,47).

Análisis estadístico.

Los datos de concentración-respuesta se analizaron mediante un análisis de varianza con la prueba de Dunnett para el post hoc de comparación. La significación estadística entre la EC30 teórico aditivo y el obtenido experimentalmente los valores de EC30 se

evaluaron utilizando la prueba t de Student-^(46,47). Un EC30 experimentales significativamente más baja que la EC30 aditivo teórico se considera que indican una interacción sinérgica entre el lumiracoxib y la drospirenona. La significación estadística se considerará alcanzado cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS.

Efecto de Lumiracoxib, drospirenona y su combinación.

El Lumiracoxib, drospirenona y LuDr , la contracción tónica inducida por KCl en una forma dependiente de la concentración. Los efectos relajantes fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$, **Figura 1**). Los valores de EC30 para lumiracoxib y drospirenona en la contracción uterina fueron $2391,3 \pm 595,3$ M y $14,7 \pm 1,7$ mM, respectivamente

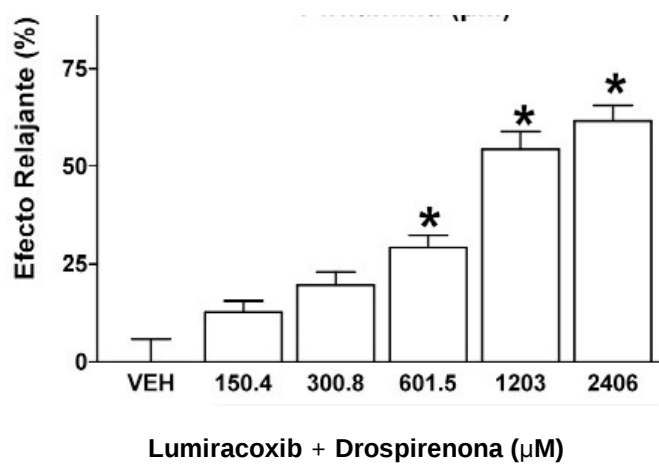
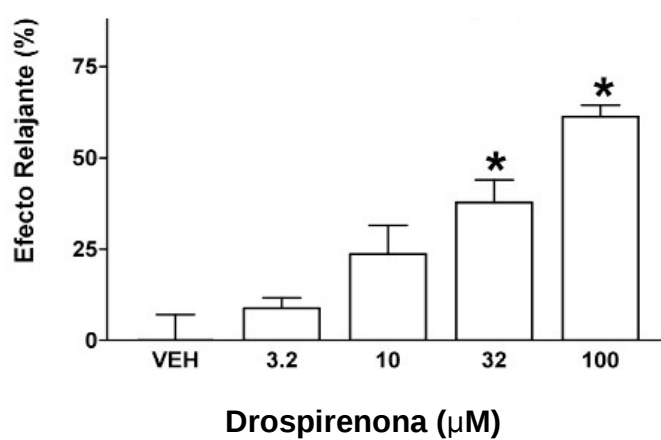
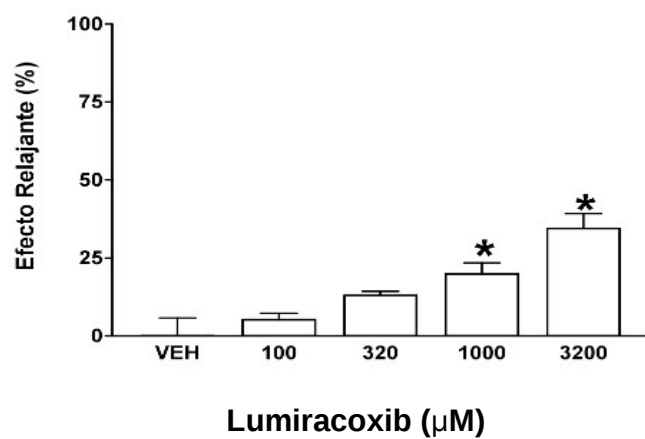


Figura 1. Efecto relajante del Lumiracoxib (100-3200 / M), Drospirenona (3.2 a 100 mM) y la combinación LumiracoxibDrospirenona (150,4 hasta 2406 M) en tiras de útero humanos contraídos con KCl. Los datos se expresan como el porcentaje del efecto relajante. Las barras son las medias $\pm$ SEM de 6 a 12 tiras uterinas. * Significativamente diferente de vehículo ($p < 0,05$), según lo determinado por análisis de varianza y una prueba de Dunnet.

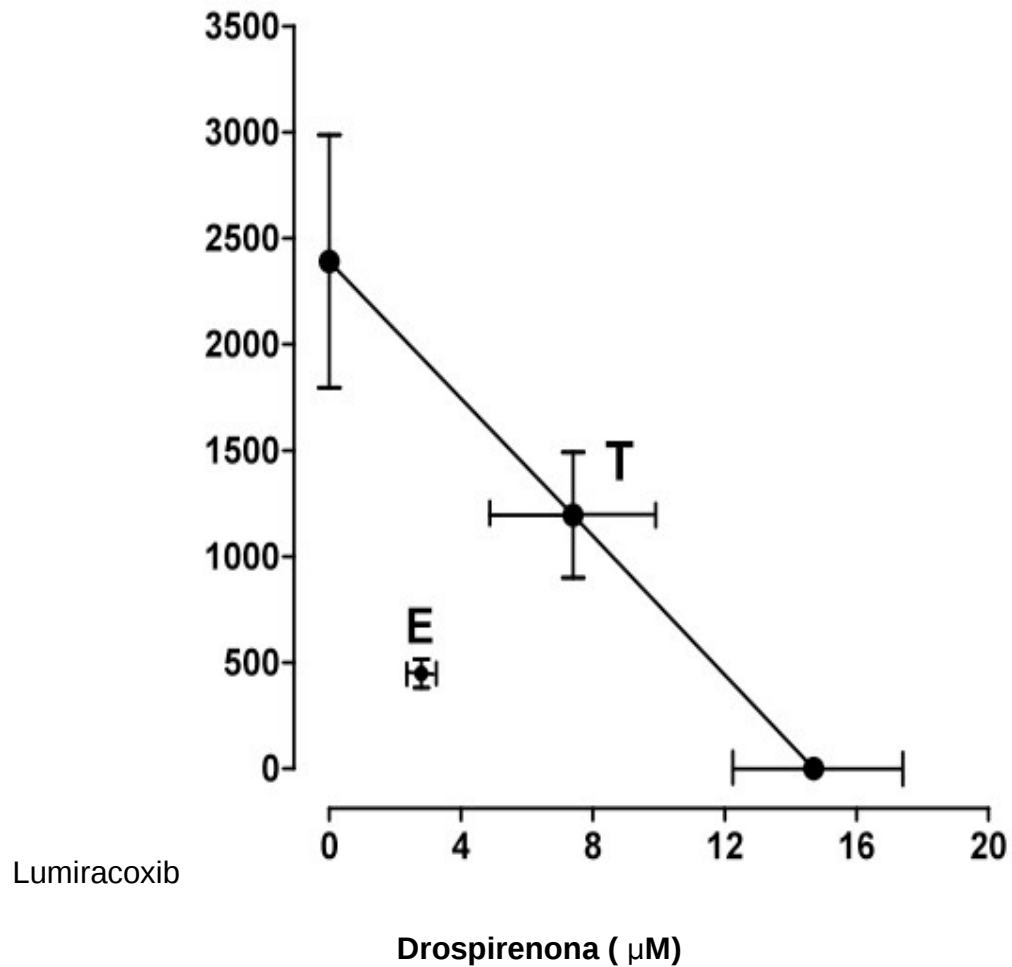


Figura 2. Isobolograma que muestra la interacción entre los efectos relajantes de lumiracoxib y drospirenona en tiras de tejido uterino humano contraído con KCl. La línea oblicua entre los ejes X e Y es la línea teórico aditiva. El punto en el centro de esta línea, se indica por "T", es el punto teórico aditivo calculado a partir del valor de EC30 de cada una de drogas. El punto experimental indicado por "E", es el valor EC30 observados con la combinación. Horizontal y las barras verticales indican SEM.

Interacción sinérgica entre lumiracoxib y drospirenona.

Las combinaciones de dosis fijas, como se describió anteriormente, y se ensayaron para construir la curva de concentración-respuesta para la combinación y el cálculo de la EC30 correspondientes experimental, que fue $401,8 \pm 129,8$ / M para el LuDr. Este valor fue significativamente menor ($p < 0.05$) que la EC30 teórico esperado de una interacción puramente aditivo, el cual fue $1.203,0 \pm 297,7$ / M para el LuDr, ya que puede apreciarse claramente en la figura 2, el valor EC30 experimental que se encuentra por debajo de los aditivos dosis de la línea. Por otra parte, el índice de interacción (γ) fue de $0,33 \pm 0,14$ para el LuDr, siendo estadísticamente diferente de la unidad. Estos resultados corresponden a una interacción sinérgica entre lumiracoxib y drospirenona en tiras de útero humano, la potencia es cerca de tres veces superior con respecto a la esperada de la adición de los efectos de los fármacos individuales.

DISCUSION.

La prostaglandina F2 α (PGF2a) y los receptores H1 de histamina junto a las proteínas G-receptores acoplados estimulan la producción de inositol 1,4,5 - trifosfato (IP3) y diacilglicerol. La producción de IP3 conduce a la liberación de Ca²⁺ + intracelular , iniciando el proceso de contracción del músculo uterino ^(48,49) . Se ha demostrado que la indometacina, AINE y nimesulida fueron capaces de inhibir la contractilidad del miometrio a través del bloqueo directo de los canales de calcio y este efecto fue independiente de la inhibición de la producción de prostaglandinas ⁽⁵⁰⁾ . En este sentido, otro estudio investigó los efectos de los inhibidores de la COX-1 y COX-2 en la síntesis de prostaglandinas del miometrio y en las contracciones espontáneas en el miometrio humano ⁽⁵¹⁾ . Los autores mostraron que no existe una relación entre la inhibición de la producción de prostaglandinas y los efectos de los AINE sobre la contractilidad y que la síntesis de prostaglandinas por el miometrio no parece ser esencial para la contractilidad espontánea. A la luz de estos hallazgos, se decidió

investigar los efectos relajantes de lumiracoxib, drospirenona y lumiracoxib/drospirenona sobre la actividad contráctil de las tiras uterinas de mujeres premenopausicasde KCl (60 mM) en lugar de la histamina o las prostaglandinas.

La dismenorrea es el síntoma ginecológico más común entre las mujeres adultas jóvenes. Las prostaglandinas liberadas del endometrio durante la menstruación desempeñan un papel importante en la generación de los síntomas de la dismenorrea primaria. El útero tiende a inducir con frecuencia aumento del tono basal así como aumento de la hipercontractilidad uterina, la reducción del flujo sanguíneo uterino, y el aumento de la hipersensibilidad del nervio periférico provocando dolor. Sin embargo, pocos estudios se han realizado para estudiar la participación probable de otros mediadores de la inflamación como la histamina, la bradicinina, sustancia P, etc. En el

presente estudio, lumiracoxib en las mujeres con dismenorrea se relacionó mejor con la capacidad de lumiracoxib de inhibir la síntesis de prostaglandinas, entre ellas la $\text{PGF}_{2\alpha}$. No obstante, es posible que lumiracoxib produzca un efecto útero relajante de manera directa, como lo realizan otros AINES.

Las acciones de la drospirenona, antes mencionadas, indican que esta sustancia se comporta como la progesterona, a diferencia de las progestinas no esteroideas. Sin embargo, se desconoce si la drospirenona tiene efecto útero-relajante sobre el miometrio humano, como lo hace la progesterona a través de un efecto directo no genómico, sobre las células miometriales primaria. En el presente estudio, la drospirenona fue capaz de disminuir la contracción del miometrio humano inducida por KCl (60 mM). Este efecto se debió probablemente al bloqueo de los canales de calcio, como se ha demostrado que produce contracción del miometrio KCl por la apertura de canales de calcio .

El uso clínico de combinaciones de analgésicos se ha incrementado significativamente en las últimas décadas. El objetivo es asociar dos fármacos con diferentes mecanismos de acción a fin de lograr una interacción sinérgica, produciendo un efecto analgésico suficiente con dosis bajas, y por lo tanto la reducción de la intensidad y la incidencia de efectos adversos (52).

En el presente trabajo, el análisis isobolográfico confirmó una significativa interacción sinérgica entre el lumiracoxib y drospirenona en tiras de útero humano. En la contracción del miometrio KCl-inducida realizado en nuestro modelo experimental, es improbable la activación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y los receptores H_1 de histamina, prostaglandinas o, respectivamente. Se ha demostrado que la contracción del miometrio producido por KCl es por la apertura de canales de calcio.

CONCLUSIONES.

En conclusión, el lumiracoxib, drospirerona y su combinación produce un efecto relajante uterino. Los datos sugieren que las concentraciones bajas de la LuDr puede interactuar sinérgicamente, por lo que esta asociación puede representar una ventaja terapéutica para el tratamiento clínico de la dismenorrea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Latthe P, Mignini L, Gray R, Hills R, Khan K. Factors predisposing women to chronic pelvic pain: systematic review. *BMJ*. 2006 Feb 16.
2. Dawood MY. Dysmenorrhea. *Clin Obstet Gynecol*. 1983; 26: 719-27.
3. Dawood MY. Dysmenorrhea. *J Reprod Med*. 1985; 30: 154-67.
4. Fraser IS. Prostaglandins, prostaglandin inhibitors and their roles in gynaecological disorders. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1992; 6: 829-57.
5. Chan WY, Dawood MY. Prostaglandin levels in menstrual fluid of nondysmenorrheic and of dysmenorrheic subjects with and without oral contraceptive or ibuprofen therapy. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res*. 1980; 8: 1443-7.
6. Dawood, M.Y., Khan-Dawood, F.S. 2007. Clinical efficacy and differential inhibition of menstrual fluid prostaglandin F2alpha in a randomized, double-blind, crossover treatment with placebo, acetaminophen, and ibuprofen in primary dysmenorrhea. *American journal of obstetrics and gynecology*, 196:35.e1-35.e5.
7. Abu JI, Konje JC. Leukotrienes in gynaecology: the hypothetical value of antileukotriene therapy in dysmenorrhoea and endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2000; 6: 200-5.
8. Coco AS. Primary dysmenorrhea. *Am Fam Physician*. 1999; 60: 489-96.
9. Dawood MY. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and changing attitudes toward dysmenorrhea. *Am J Med*. 1988; 84: 23-9.
10. Lefebvre G, Pinsonneault O, Antao V, Black A, Burnett M, Feldman K, Lea R, Robert M. Primary dysmenorrhea consensus guideline. *J Obstet Gynaecol Can*. 2005; 27: 1117-30.
11. Jamieson DJ, Steege JF. The prevalence of dysmenorrhea, dyspareunia, pelvic pain, and irritable bowel syndrome in primary care practices. *Obstet Gynecol*. 1996; 87: 55-8.

12. De Berardis D, Serroni N, Salerno RM, Ferro FM. Treatment of premenstrual dysphoric disorder (PMDD) with a novel formulation of drospirenone and ethinyl estradiol. *Ther Clin Risk Manag.* 2007; 3: 585-90.
13. Larroy C, M. Crespo M, Meseguer, C. Dismenorrea funcional en la Comunidad Autónoma de Madrid: estudio de la prevalencia en función de la edad. *Rev. Soc. Esp. Dolor* 2001; 8: 11-22.
14. Bergsjö P: Socioeconomic implications of dysmenorrhea. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1979;87(Suppl):67-68.
15. Klein JR and Litt IF: Epidemiology of adolescent dysmenorrhea *Pediatric* 1981;68:661-664.
16. Johnson J. Level of knowledge among adolescent girls regarding effective treatment for dysmenorrhea. *J Adolesc Health Care.* 1988; 9: 398-402.
17. Harlow SD, Park M. A longitudinal study of risk factors for the occurrence, duration and severity of menstrual cramps in a cohort of college women. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996; 103: 1134-42.
18. Thomas KD, Okonafua FE Chiboka O: A study of the menstrual patterns of adolescents in Ile-Ife, Nigeria. *Int J Gynecol Obstet* 1990;33:31-34.
19. Jacks TH, Obed JY, Agida ET, Petrova GV. Dysmenorrhoea and menstrual abnormalities among postmenarcheal secondary school girls in Maiduguri Nigeria. *Afr J Med Med Sci.* 2005; 34: 87-9.
20. Hillen TI, Grbavac SL, Johnston PJ, Straton JA, Keogh JM. Primary dysmenorrhea in young Western Australian women: prevalence, impact, and knowledge of treatment. *J Adolesc Health.* 1999; 25: 40-5.
21. Ng-TP, Tan-NC, Wansaicheong-GK: A prevalence study of dysmenorrhea in female residents aged 15-54 years in Clementi Town Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 1992;213: 323-7.

22. Pedrón-Nuevo N, Gonzalez-Unzaga LN, De Celis-Carrillo R, Reynoso-Isla M, de la Torre-Romeral L. Incidence of dysmenorrhea and associated symptoms in women aged 12-24 years. *Ginecol Obstet Mex.* 1998; 66: 492-4.
23. Pawlowski B. Prevalence of menstrual pain in relation to the reproductive life history of women from the Mayan rural community. *Ann Hum Biol.* 2004; 31:1-8.
24. Velasco-Rodríguez, R., Mora-Brambila, A.B., González-Ortega, L.E., Bonilla-Gutiérrez, O.J. 2006. Características clínicas y tratamiento de dismenorrea en estudiantes de licenciatura en enfermería. *Revista de Enfermería de IMSS*, 14: 29-34.
25. Ortiz MI, Pérez-Hernández N, Macías A, Carrillo-Alarcón L, Rangel-Flores E, Fernández-Martínez E, y Ponce-Monter H. Utilización de fármacos para el tratamiento de dismenorrea primaria en estudiantes universitarias. *Rev. Mex. Cienc Farmac.* 2007b; 38: 24-29.
26. Marjoribanks J, Proctor ML, Farquhar C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary dysmenorrhoea. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(4):CD001751.
27. Connolly, TP. Cyclooxygenase-2 inhibitors in gynecologic practice. *Clinical Med. Res.* 2003; 1: 105-10.
28. Bitner, M., Kattenhorn, J., Hatfield, C., Gao, J., Kellstein, D. Efficacy and tolerability of lumiracoxib in the treatment of primary dysmenorrhoea. *Int. J. Clin. Pract.* 2004; 58: 340-45.
29. Vane, J.R., Botting, R.M. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int. J. Tissue React.* 1998; 20: 3-15.
30. Mysler E. Lumiracoxib (prexige): a new selective COX-2 inhibitor. *J. Clin Pract*, 2004; 6: 606-611.
31. Masferrer J.L., Zweifel B.S., Manning P.T. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase-2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 3228-32.
32. Lyseng-Williamson K.A., Curran M.P. Lumiracoxib. *Drugs* 2004; 64: 2237-2246.

33. Perez Vallina JR, Menendez Antolin L, Cantabrana B, Sanchez M, Hidalgo A. Nitric oxide and cyclic nucleotides participate in the relaxation of diclofenac on rat uterine smooth muscle. *Gen Pharmacol.* 1998;30:25-9.
34. Oelkers W. Drospirenone, a progestogen with antimineralocorticoid properties: a short review. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217:255–61.
35. Van Vloten WA, van Haselen CW. The effect of 2 combined oral contraceptives containing either drospirenone or cyproterone acetate on acne and seborrhea. *Cutis* 2002; 69:2–15.
36. Archer DF. Menstrual-cycle-related symptoms: a review of the rationale for continuous use of oral contraceptives. *Contraception.* 2006; 74: 359-66.
37. Rapkin AJ, Sorger SN, Winer SA. Drospirenone/ethinyl estradiol. *Drugs Today (Barc).* 2008; 44: 133-45.
38. Rosenbaum P, Schmidt W, Helmerhorst FM, Wuttke W, Rossmanith W, Freundl F, Thomas K, Grillo M, Wolf A, Heithecker R. Inhibition of ovulation by a novel progestogen (drospirenone) alone or in combination with ethinylestradiol. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2000;5:16-24.
39. De Berardis D, Serroni N, Salerno RM, Ferro FM. Treatment of premenstrual dysphoric disorder (PMDD) with a novel formulation of drospirenone and ethinyl estradiol. *Ther Clin Risk Manag.* 2007; 3: 585-90.
40. Perusquía M, Jasso-Kamel J. Influence of 5 α - and 5 β -reduced progestins on the contractility of isolated human myometrium at term. *Life Sci.* 2001; 68: 2933-44.
41. Cantabrana B, Perez Vallina JR, Menendez L, Hidalgo A. Spasmolytic and calmodulin inhibitory effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs in vitro. *Life Sci.* 1995;57:1333-41.
42. Crankshaw DJ. Pharmacological techniques for the in vitro study of the uterus. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2001; 45: 123-40.

43. Oropeza MV, Ponce-Monter H, Villanueva-Tello T, Palma-Aguirre AJ, Campos MG. Anatomical differences in uterine sensitivity to prostaglandin F_{2α} and serotonin in non-pregnant rats. *Eur J Pharmacol* 2002;446:161-6.
44. Berenbaum MC. What is synergy? *Pharmacol Rev* 1989;41:93-141.
45. Tallarida RJ. Statistical analysis of drugs combinations for synergism. *Pain* 1992;49:93-7.
46. Ortiz MI, Ponce-Monter H, Fernández-Martínez E, Pérez-Hernández N, Macías A, Rangel-Flores E, et al. Evaluation of the interaction between acetaminophen and opioids on the hargreaves model of thermal hyperalgesia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007;88:47-54.
47. Tallarida RJ. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain* 2002;98:163-8.
48. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999;79:1193-226.
49. Willets JM, Taylor AH, Shaw H, Konje JC, Challiss RA. Selective regulation of H1 histamine receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in uterine smooth muscle cells. *Mol Endocrinol* 2008;22:1893-90
50. Sawdy RJ, Knock G, Bennett PR, Poston L, Aaranson P. The effect of nimesulide and indomethacin on contractility and calcium current in myometrial smooth muscle from pregnant women. *Br J Pharmacol* 1998;125:1212–7.
51. Sawdy RJ, Sullivan MH, Bennett PR. The effects of non-steroidal antiinflammatory compounds on human myometrial contractility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;109:33-40.
52. Curatolo M, Svetcic G. Drug combinations in pain treatment: a review of the published evidence and a method for finding the optimal combination. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2002;16:507-19.