



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL ANGELES MEXICO**

***“Caracterización del efecto de mifepristona (RU 486)
sobre la actividad del miometrio humano a término de la
gestación”***

TESIS DE POSGRADO

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA**

**PRESENTA:
MC. NOHEMI ALEJANDRE BLANCO**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MA. MERCEDES PERUSQUÍA NAVA**



AGOSTO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Claudio F. Serviere Zaragoza
Profesor Titular del curso de especialización en Ginecología y
Obstetricia

Dr. José Niz Ramos
Jefe de División de Enseñanza del Hospital Ángeles México

Dr. Francisco J. Borrajo Carbajal
Coordinador de Educación Médica Formativa

Dra. Ma. Mercedes Perusquía Nava
Directora de Tesis

Dirección de la tesis y lugar en donde fue realizada:

La presente tesis fue dirigida por la Dra. Mercedes Perusquía Nava, Investigadora titular en el Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Fisiología; en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Apoyo Recibido:

La realización de la presente tesis fue financiada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), mediante el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN202507: “Determinación de la acción antiuterotónica y vasodilatadora de RU 486 (mifepristona) en el miometrio y la arteria umbilical del humano”.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por la beca que me otorgó para la realización de la presente tesis, sufragado por el proyecto IN202507.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), por las instalaciones y servicios utilizados durante la realización de esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi casa durante toda mi formación académica, por su hospitalidad y calidez.

Al Hospital Ángeles México, por ser la sede donde realicé la especialidad en Ginecología y Obstetricia, dándome experiencia para mi futuro desarrollo profesional y por brindarme la oportunidad de realizar una tesis experimental.

CON ESPECIAL AGRADECIMIENTO

A la directora de esta tesis, Dra. Mercedes Perusquía Nava por abrirme las puertas de su laboratorio, dándome esta gran oportunidad, por su paciencia, sus enseñanzas y su ejemplo de dedicación.

A la Bióloga Erika Navarrete Monroy por compartir conmigo sus conocimientos, tiempo y experiencia para la elaboración de esta tesis.

A mis compañeras de laboratorio: María Julia Espinoza Camacho y Juana Trejo González por sus críticas y los buenos momentos compartidos.

A los Ginecólogos y personal de enfermería de quirófano del Hospital Ángeles México por la facilidad otorgada para la obtención de las muestras.

DEDICATORIAS

A mis padres por su cariño, su apoyo incondicional y sus sabios consejos.

A mis abuelos que me inculcaron la valentía y me mostraron el camino donde me encuentro ahora.

A mis hermanos: Alfonso, Camila y María José, por ser mi inspiración. Gracias por hacer mi vida más feliz, los amo.

A mis mejores amigas: Dulce García Gaenza, Lorena González Hernández y Elsa Bustamante Vidales por escucharme y ser mi apoyo en los momentos difíciles.

A mis compañeros de residencia que fueron mi segunda familia durante estos cuatro años, aprendí mucho de ustedes. Jamás los olvidaré.

A los Doctores: Gildardo Castillo Cámara, Gerardo Espinosa Esparza, Laura García Moreno, Guadalupe Gómez Zúñiga, Juan Hurtado Gorostieta, Javier Laddaga Garza, Isabel Pérez Ortega, María del Carmen Pérez Reyes, José T. Pineda Fernández, Alfonso Ruiz y Aguilar, Fernando Ruiz Maldonado y Trinidad Solórzano Nambo, por sus enseñanzas, paciencia y la confianza que depositaron en mí para tratar a sus pacientes.

INDICE

	pág
I. Introducción	1
a) Generalidades	1
b) Regímenes utilizados en terapéutica	2
c) Mecanismo de acción	7
II. Planteamiento del problema	8
III. Hipótesis	11
IV. Objetivos	12
V. Material y métodos	13
a) Obtención y manejo de las muestras uterinas	13
b) Sistema de registro	14
c) Exploración del efecto de mifepristona	15
d) Investigación de la vía de acción de mifepristona	16
e) Procesamiento de los datos	17
f) Compuestos	18
VI. Resultados	19
a) Efecto relajante inducido por mifepristona en contracciones inducidas por agentes uterotónicos.	19
b) Comparación de la eficacia de mifepristona y progesterona en la respuesta inducida por las diferentes prostaglandinas.	21
c) Actividad de las prostaglandinas en presencia de mifepristona.	23
d) Modo de acción del efecto relajante de mifepristona.	23
VII. Discusión	25
VIII. Conclusiones	29
IX. Referencias	30

I. Introducción

a) Generalidades

En 1981, la compañía farmacéutica francesa Roussel Uclaf, sintetizó un nuevo antagonista del receptor a glucocorticoides conocido como RU38486 (Philibert et al., 1981). Posteriormente, se determinó que este compuesto era también un potente bloqueador del receptor intracelular de progesterona (Philibert, 1984). RU38486 fue después abreviado como RU 486 y conocido con el nombre genérico de mifepristona. En 1982, un año después de su descubrimiento, se documentó que la mifepristona era efectiva para interrumpir el embarazo (Herrmann et al., 1982).

Bygdeman y Swahn (1985) mostraron que el tratamiento con mifepristona incrementaba la contractilidad del útero gestante y aumentaba la sensibilidad del miometrio a la acción de prostaglandinas. A este respecto, misoprostol, análogo de la prostaglandina E₁ (PGE₁), que se encuentra disponible en el mercado muestra un efecto excitador sobre la contracción uterina, que es potenciado después del pretratamiento con mifepristona (Norman et al., 1991). Por consiguiente, ha sido aceptado que la combinación de mifepristona y misoprostol oral es un método altamente efectivo para la interrupción del embarazo; al menos 49 días después de la presencia de amenorrea (Peyron et al., 1993), pero menos efectivo en estados más avanzados de la gestación (McKinley et al., 1993). Estudios clínicos más recientes han mostrado que la administración vaginal de misoprostol es más efectiva que el tratamiento oral en combinación con mifepristona para interrumpir el embarazo temprano (El-Refaey et al., 1995). Asimismo, la alta eficacia de la administración vaginal en comparación con la administración oral también ha sido demostrada para interrupción del embarazo en el segundo trimestre de gestación (Ho et al., 1997).

Por lo anterior, el uso mifepristona/misoprostol como régimen para la interrupción del embarazo fue aprobado en Francia desde 1988; iniciándose la era del aborto farmacológico. Más tarde, en septiembre del 2000, la mifepristona fue liberada como medicamento por la FDA (*Food and Drug Administration*) en Estados Unidos. Actualmente es usada en varios países para cuatro indicaciones principales: 1) Interrupción temprana del embarazo, 2) Dilatación cervical para la interrupción del embarazo por método quirúrgico, 3) Preparación para la interrupción del embarazo con el uso de prostaglandinas en el segundo trimestre de gestación y 4) Expulsión de un feto muerto durante el tercer trimestre de gestación (Sitruk-Ware y Spitz, 2003).

b) Regímenes utilizados en terapéutica

Después de la síntesis de la mifepristona (1981), se utilizó una sola dosis de 600 mg para la interrupción de embarazos de 49 días, mostrando una eficacia de 81% (Klein et al., 1991). Años más tarde, una prostaglandina sintética llamada, gemeprost o cervagem (análoga de la PGE₁) disponible en el mercado en aplicación vaginal (en forma de supositorio o pesario) comienza a utilizarse en combinación con mifepristona bajo el siguiente régimen: una sola dosis de mifepristona de 600 mg, con la aplicación de 1 mg de gemeprost 48 horas después de ésta, con eficacia para abortos completos entre 94 y 96% (Bygdeman et al., 2000).

También se utilizó la sulprostona, un análogo de la prostaglandina E₂ (PGE₂), que se empleaba en embarazos de primer trimestre, administrando tres dosis de 0.5 mg intramuscular cada tres horas con eficacia de 94% (Bygdeman et al., 1980). Hacia 1996, se utiliza para provocar abortos de segundo y tercer trimestre, administrándose por vía intravenosa con una infusión continua, mostrando buena tolerancia de las pacientes al fármaco, pero con un éxito de tan sólo 62%

(Paulo et al., 1996). Dos años más tarde se discontinuó por los efectos adversos en el sistema cardiovascular (Chen et al., 1998).

Los estudios pioneros reportaron que la mifepristona no aumentaba la sensibilidad del útero a la oxitocina (Swahn y Bygdeman, 1988). Asimismo, estudios realizados para interrupción de embarazo de 17 a 24 semanas de gestación, compararon el uso de PGE₂ en supositorio vaginal utilizando una dosis de 65 mg, vs. la administración de 200 unidades de oxitocina; reportando una eficacia de 93% para PGE₂, mientras que la oxitocina mostró una eficacia de 91%. Por tal razón, la oxitocina podría ser una alternativa para interrupción del embarazo en el segundo trimestre (Winkler et al., 1991).

En 1993 se reporta otra prostaglandina sintética, llamada misoprostol, análoga de PGE₁, que presentaba una eficacia semejante al gemeprost (Tabla 1); con importantes ventajas para ser usada en combinación con mifepristona por ser: (i) de bajo costo, (ii) no es termolábil y no necesita refrigeración, y (iii) es de administración oral. Por estas características, misoprostol comienza a sustituir a las prostaglandinas empleadas hasta entonces en el régimen para interrupción del embarazo (Dodd y Crowther, 2006). Su utilización oral en embarazos de 49 días con dosis de 0.4 a 0.8 mg reporta un éxito de 92 a 98% (Christin-Maitre et al., 2000).

Asimismo, se hacen estudios comparativos sobre la ruta de administración de misoprostol, encontrando que su utilización por vía vaginal disminuye los efectos adversos de tipo gastrointestinal y el tiempo de consumación del aborto, en comparación con otras rutas como la oral o sublingual. Comenzó a utilizarse a dosis de 0.2 mg cada 12 h en embarazos de primer y segundo trimestre, logrando el aborto 24 h después en 81% de las pacientes (Jain y Mishell, 1994). Reportes colaterales han estudiado también la administración sublingual, a dosis de 0.6 mg, con

eficacia de 92% para embarazos hasta de 49 días (Lin et al., 2006). En forma interesante, un estudio reciente ha reportado que la combinación de 200 mg de mifepristona/0.8 mg de misoprostol sublingual en embarazos de 49 días produce 100% de abortos completos (Tang et al., 2003). Referente a la administración vaginal, es importante mencionar que no está autorizada por la FDA en Estados Unidos; sin embargo, esta vía de administración es ampliamente utilizada en Europa y Asia.

Por otro lado, se ha documentado que las usuarias prefieren la administración oral y no vaginal del misoprostol, aunque ésta última favorece la biodisponibilidad del fármaco en menos tiempo; disminuyendo el tiempo de evacuación del útero con mayor eficacia para abortos completos mayores de 49 días. También se asocia a menos efectos adversos (principalmente gastrointestinales), pero favorece el riesgo de presentar infecciones.

TABLA 1. Régimen empleado de mifepristona (RU 486)/prostaglandina (gemeprost o misoprostol) para la interrupción del embarazo.

T R A T A M I E N T O			
Días de Gestación	mg RU 486/ mg gemeprost (Eficacia %)	mg RU 486/ mg misoprostol oral (Eficacia %)	mg RU 486/ mg misoprostol vaginal (Eficacia %)
49		600/0.8 (98)	
		600/1 (91-97)	200/0.8 (98)
		600/0.4 (92-97)	
		200/0.4 (97)	
56		150/0.6 (94)	
		600/1 (94)	200/0.8 (97)
		600/0.4 (89-95)	
		400/1 (94)	600/0.4 (83)
63		200/1 (94)	
		600/0.4 (77)	200/0.8 (96)
		200/0.6 (95)	

Los datos fueron obtenidos de Ulmann et al., 1992; Wu et al., 1992; Peyron et al., 1993; WHO, 1993; Sang et al., 1994; Baird et al., 1995; Penney et al., 1995; Winikoff et al., 1997; Spitz et al., 1998; Schaff et al., 1999; Christin-Maitre et al., 2000.

Los esquemas de tratamiento vigentes *i.e.*: dosificación, vía de administración, intervalos de administración entre mifepristona y prostaglandina, y los tiempos para obtener el resultado (evacuación del útero) han sido muy variados. Actualmente, el esquema de tratamiento autorizado por la FDA (2000) es el siguiente:

Día 1: Administración de 600 mg de mifepristona dosis única, supervisada por el médico.

Día 3: Revisión para corroborar el aborto completo (ultrasonido o exploración física). Si no ha ocurrido éste, se dará una dosis de 0.4 mg de misoprostol vía oral.

Día 14: Se realiza exploración física y ultrasonido para verificar que el útero haya sido evacuado, de no ser así, se procede a realizar legrado uterino instrumentado.

Sin embargo, estudios realizados con monodosis de mifepristona de 200 o 600 mg han mostrado la misma eficacia para producir un aborto completo durante el primer trimestre (Tabla 1), es por eso, que la dosis mínima efectiva propuesta es de 200 mg (Bygdeman et al., 2000), aunque el porcentaje de eficacia es muy variable, desde 60 a 80% dependiendo de la edad gestacional en la que se administre. En cuanto al empleo de misoprostol, se ha establecido administrar 48 h después de mifepristona, una dosis de 0.4 mg vía oral para obtener 61% de eficacia. En caso de no conseguir el resultado esperado, se continuará la administración de varias dosis de 0.4 mg de misoprostol, a intervalos de tiempo de 3 a 6 h para lograr hasta un 93% de eficacia.

c) Mecanismo de acción

Respecto a su modo de acción durante el embarazo, se ha reportado que esta antiprogestina se une al receptor de progesterona, inhibiendo así el efecto de progesterona, cuyo bloqueo resulta en daño vascular, necrosis decidual y sangrado (Johannisson et al., 1989). Además, como se ha mencionado anteriormente, mifepristona transforma el útero preñado quiescente en un órgano activo con contracciones uterinas regulares; debido a que incrementa la síntesis de prostaglandinas y provoca apertura y dilatación del cervix (Revisado por Baulieu, 1997). En general, el análisis de estos hallazgos nos permite concluir que la acción primordial de mifepristona radica en el hecho de producir aumento de las contracciones miométriales durante la gestación, para provocar la evacuación del útero.

Así, el mecanismo de acción de mifepristona para producir efecto antiprogestacional, es a través de su unión al receptor de progesterona, el cual se encuentra asociado con proteínas de choque térmico (hsp90) formando el complejo receptor-hsp90, se cree que dicha asociación reprime la unión del receptor con el DNA. La unión de progesterona con el receptor, promueve la disociación de las hsp90 transformando este complejo de un estado inactivo que no se une al DNA, a un estado activo capaz de unirse a los elementos de respuesta de hormonas esteroideas (HRE) de genes blanco y estimular la activación de la transcripción inducida por la hormona. La unión de mifepristona con el receptor, promueve la disociación de las hsp90 y la unión al DNA, pero no estimula la cascada de eventos posteriores que involucran la transcripción (Beck et al., 1993).

II. Planteamiento del problema

En marcado contraste con la sugerencia de que mifepristona produce activación de la contractilidad miometrial, también existen datos experimentales en el embarazo a término del mono Rhesus, donde la aplicación de mifepristona produce disminución transitoria de la actividad contráctil, dado que 8 h después la actividad incrementa ligeramente, pero con un patrón irregular e insuficiente para desencadenar el trabajo de parto (Wolf et al., 1989; Haluska et al., 1987). Aunado a lo anterior, se encuentra la evidencia directa de que mifepristona tiene la habilidad de inducir relajación de la actividad contráctil del útero aislado de rata, siendo esta una respuesta rápida y reversible que no puede ser explicada por los procesos genómicos dependientes de la transcripción (Perusquía y Kubli-Garfias, 1994).

Los resultados anteriores sugieren que la mifepristona podría producir un efecto relajante de tipo no genómico antes de desencadenar una respuesta genómica. Esta propuesta es apoyada por el hecho de que la estructura química de este compuesto es esterooidal (Fig. 1); es decir, es un complejo de cuatro anillos (ciclopentanoperhidofenantreno): tres ciclohexanos (A, B y C) y un ciclopentano (D). A este respecto, se ha reportado que varios compuestos con estructura esterooidal, particularmente los esteroides gonadales, son capaces de inducir relajación de las contracciones uterinas. En referencia a lo anterior, es ampliamente aceptado que la progesterona produce relajación uterina y es la principal base de la quiescencia del miometrio en el embarazo (Csapo, 1956; revisado por Perusquía, 2001). También se ha reportado que la progesterona y otras progestinas, así como varios andrógenos y corticoesteroides pueden relajar la contracción uterina de la rata (Revisado por Perusquía, 2001) y humano (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001; Perusquía et al., 2005). Esta línea de hallazgos experimentales han mostrado que la relajación uterina que inducen las hormonas esteroides es el resultado de una acción de tipo no genómico.

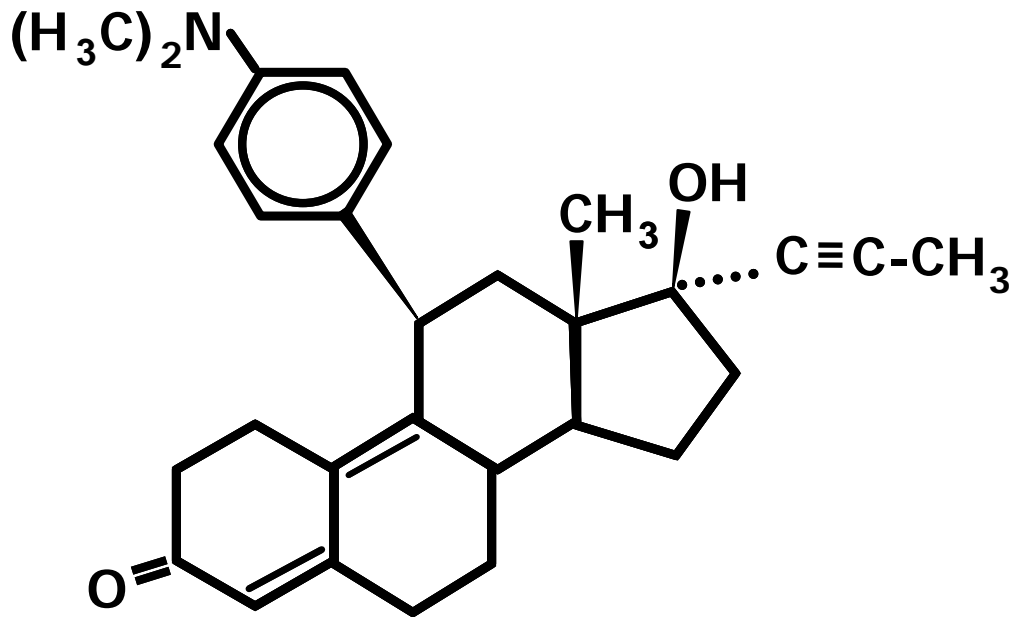


Figura 1. Estructura química de mifepristona donde se muestra el esqueleto esteroidal de cuatro anillos que comparte con las hormonas esteroides.

Con estas bases, es pertinente proponer que además del conocido efecto que mifepristona ejerce como antihormona, este compuesto podría inducir acciones de tipo no genómico, con relevancia en la función miométrial y derivar en el cuestionamiento de su uso terapéutico; tanto para la interrupción del embarazo como para desencadenar el trabajo de parto. Además, debido a la falta de estudios sobre el efecto directo de la mifepristona en la contractilidad del útero humano, el presente proyecto pretende evaluar la respuesta directa de esta antihormona sobre la actividad contráctil inducida por oxitocina y prostaglandinas en el útero aislado del humano a término de la gestación.

Para este estudio se analizará lo siguiente:

- 1) Valorar el efecto de mifepristona sobre la contracción inducida por oxitocina y prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 y misoprostol) estableciendo así: (a) el efecto inhibitorio o excitatorio sobre las mencionadas respuestas contráctiles y definir la eficacia del compuesto en cada respuesta, (b) explorar la posible potenciación de la acción de las prostaglandinas en presencia de mifepristona.
- 2) Determinar la vía de acción (genómica o nongenómica) del efecto de mifepristona; examinando el efecto de la antihormona en presencia de los inhibidores correspondientes de la transcripción y la síntesis de proteínas.
- 3) Analizar el posible antagonismo, sinergismo o potenciación del conocido efecto antiuterotónico de progesterona en presencia de mifepristona.

III. Hipótesis

Debido a que mifepristona posee la estructura básica de todos los esteroides (ciclopentanoperhidrofenantreno), se espera que también pudiera participar en acciones rápidas que anteceden a la ruta de acción genómica; al provocar una rápida disminución de la contractilidad uterina.

IV. Objetivos

Principal:

Estudiar la acción directa de mifepristona sobre la contractilidad del útero gestante a término, determinando su potencial acción no genómica con beneficio directo hacia: (i) el conocimiento del mecanismo de acción de este fármaco y (ii) la validación de su utilidad terapéutica en Ginecología y Obstetricia.

Particulares:

- 1) Cualificar y cuantificar el efecto de mifepristona sobre la respuesta producida por oxitocina, prostaglandinas naturales (PGF_{2α}, PGE₂) y sintéticas (misoprostol) en útero aislado gestante a término.
- 2) Comparar el efecto y eficacia que provoca mifepristona en la respuesta inducida por los diferentes agentes uterotónicos y con el efecto relajante inducido por progesterona.
- 3) Determinar la posible potenciación de la actividad uterotónica de las prostaglandinas en presencia de mifepristona.
- 4) Analizar la vía de acción de mifepristona (genómica o nongenómica).

V. Material y métodos

a) Obtención y manejo de las muestras uterinas

El presente estudio fue aprobado por el comité de Ética del Hospital de la Mujer, Secretaría de Salud (Departamento de enseñanza RE:597). El tejido miometrial fue obtenido (previo consentimiento informado) de pacientes sometidas a operación cesárea por indicación médica con los siguientes requisitos:

- A. Edad 25-35 años
- B. Embarazo de término, entre 37 y 40 semanas de gestación.
- C: Sin cirugía uterina previa.
- D. Integridad de membranas corioamnióticas.
- E. Sin aplicación previa de medicamentos útero-relajantes o útero-tónicos.
- F. Sin manifestaciones clínicas de trabajo de parto.

La biopsia de aproximadamente 3.0 X 1.0 X 1.0 cm fue tomada de un corte transversal realizado en la región del segmento durante el procedimiento quirúrgico, antes de la administración de medicamentos oxitócicos. Esta muestra miometrial se colocó inmediatamente en solución Hartmann (Baxter de México) a 4°C, para ser transportada del hospital (Hospital Ángeles México) al laboratorio (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), donde se realizó un recambio de la solución Hartmann y se mantuvo en refrigeración (4°C) durante 24 y 48 h antes de su ensayo.

Posteriormente, la muestra fue colocada en una caja de Petri, de doble pared, que contenía Ringer Krebs-Henseleit con la siguiente composición (en mM): NaHCO_3 (25), NaCl (119), KCl (4.6), KH_2PO_4 (1.2), MgSO_4 (1.2), CaCl_2 (1.5) y glucosa (12). El Ringer se mantuvo a una temperatura de 37°C , precalentado previamente, por medio de un baño (Haake, D1) que recircula el agua a través de la doble pared de la caja de petri. El pH del Ringer fue estabilizado previamente y mantenido constantemente a 7.4, mediante burbujeo ininterrumpido de una mezcla gaseosa de 5% de CO_2 en 95% de O_2 . Con ayuda de material de microcirugía, se procedió a diseccionar la capa muscular (miometrio), la cual fue dividida en varios segmentos miometriales cortados a lo largo de las fibras musculares longitudinales de aproximadamente $1.0 \times 0.5 \times 0.5$ cm cada uno.

b) Sistema de registro

Cada segmento miometrial se colocó inmediatamente en una cámara de incubación que contenía 10 ml de la solución Ringer (Krebs-Henseleit antes descrita), recibiendo burbujeo constante de la mezcla gaseosa $\text{O}_2\text{-CO}_2$, con temperatura controlada a 37°C mediante el baño recirculador. Los segmentos fueron sujetos en forma vertical utilizando hilo de seda (000); por un extremo al piso de la cámara y por el otro extremo a un transductor de tensión (Grass Instruments, modelo FTO3C), el cual recibió y envió las señales mecánicas del tejido a un polígrafo (Grass Instruments, modelo 79) de 4 canales, que a su vez está acoplado a una computadora (Pentium III de x 1.13AGHz) con un sistema de captura analógico/digital (Astro-Med Inc polyView 2.5, ADM-20002), ver Fig. 2. Los tejidos en cada cámara de incubación, fueron sometidos a una fuerza de tensión de 10 mN (1g de tensión) durante todo el experimento.

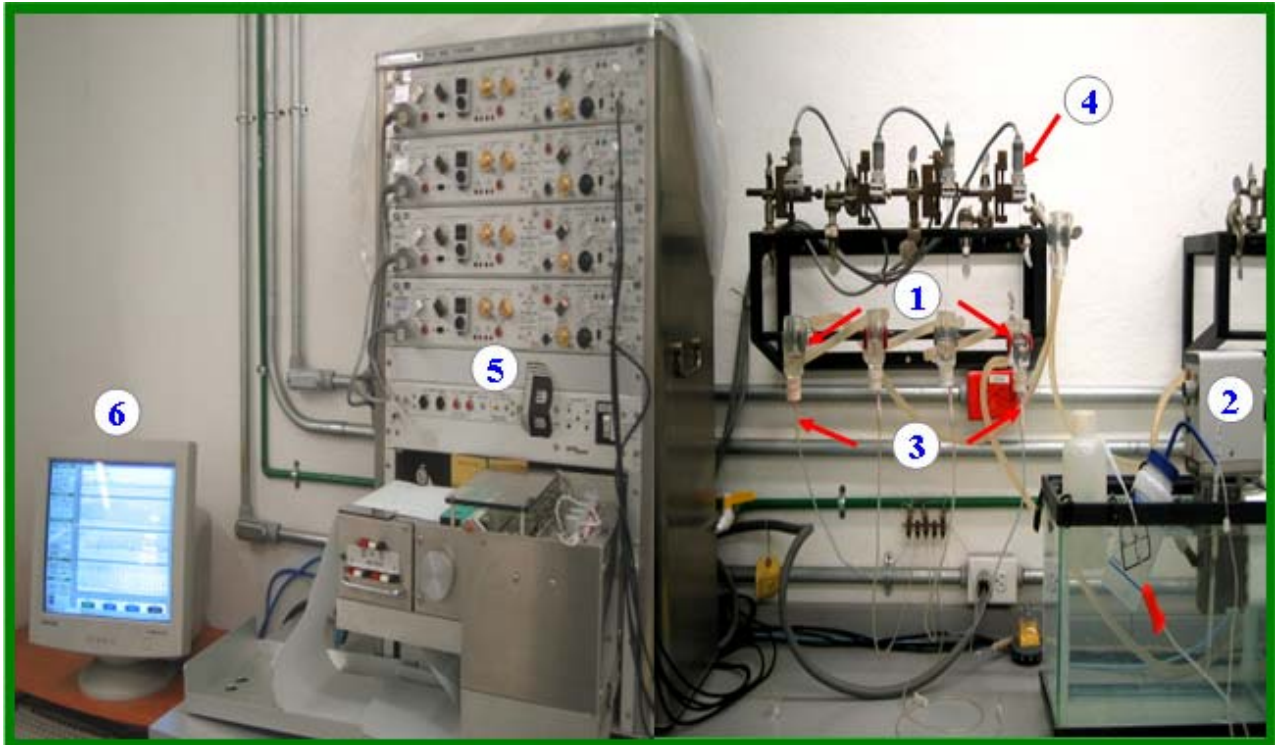


Figura 2. Sistema de Registro: 1) Cámaras de incubación donde se mantiene el tejido, 2) baño recirculador de agua que alimenta a las cámaras de incubación para mantener una temperatura constante de 37° C, 3) suministro de aeración de la mezcla gaseosa, 4) transductor de tensión, 5) polígrafo y 6) computadora, con convertidor analógico digital, acoplada al polígrafo.

c) Exploración del efecto de mifepristona

Antes de iniciar cada protocolo experimental, los tejidos se estabilizaron a las condiciones *in vitro* entre 60 y 90 minutos, periodo en el cual se detectó la actividad contráctil espontánea. Bajo estas circunstancias, se adicionó, por separado y en diferentes cámaras, 100 nM de oxitocina, 1 μ M de $\text{PGF}_{2\alpha}$, 1 μ M de PGE_2 ó 1 μ M de misoprostol. Después de la adición de cada agente, se obtuvo un registro de aproximadamente 30 minutos, el cuál fue considerado como control de la actividad contráctil (100%), a continuación se adicionó mifepristona, previamente disuelta en etanol absoluto, a una concentración de 100 μ M (concentración máxima para su solubilidad total en etanol absoluto) en

una alícuota de 10 μL en la cámara de incubación de 10 mL, lo cual corresponde a un volumen final de 0.1% de etanol absoluto. La respuesta fue observada y registrada durante 30 min en el caso de oxitocina, y hasta 90 min en el caso de prostaglandinas, comparando con el control (100%) y expresada en términos de porcentaje de modificación de la respuesta control. Después, el tejido fue lavado mediante tres recambios de la solución Ringer para retirar el tratamiento y verificar la viabilidad y recuperación del tejido. En otros experimentos, el tratamiento fue invertido; es decir, primero se adicionó 100 μM de mifepristona y 30 min después, por separado, cada prostaglandina.

Con fines comparativos, en diferentes tejidos se probó progesterona a 100 μM (concentración equimolecular a mifepristona) bajo las mismas condiciones experimentales (previo tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 , misoprostol y mifepristona).

También se hicieron los ensayos pertinentes con 0.1% de etanol absoluto; vehículo en el cual se disolvieron las compuestos de prueba (mifepristona o progesterona). Los efectos fueron repetidos por lo menos 6 veces en muestras provenientes de diferentes pacientes, donde la “n” significa el número de pacientes.

d) Investigación de la vía de acción de mifepristona

Con la finalidad de indagar si la respuesta producida por mifepristona es por la vía genómica, donde es necesario que mifepristona interaccione con los receptores intracelulares a progesterona y después se modifiquen los procesos de transcripción. Se utilizaron diferentes segmentos miométriales, donde se provocó una contracción tónica sostenida con solución despolarizante de cloruro de potasio

(KCl 40 mM), cuando la contracción alcanzó su punto máximo, en unos tejidos se adicionó el inhibidor de la transcripción (actinomicina D, 10 μ M) y en otros el inhibidor de síntesis de proteínas (cicloheximida, 40 μ M) y después de 30 min, se adicionó mifepristona 100 μ M. Con este pretratamiento el efecto de mifepristona fue comparado en presencia y ausencia de los inhibidores.

e) Procesamiento de los datos

La actividad muscular *i.e.*, la respuesta contráctil miometrial fue evaluada en los mismos intervalos de 30, 60 y 90 min; determinados para el control y el efecto. Mediante el programa de captura de señales biológicas (polyVIEW), los datos fueron monitoreados en tiempo real, evaluando el área bajo la curva de la actividad contráctil. Los valores son reportados en porcentaje con respecto al control, el cual será considerado como 100%. Cada ensayo representa la media de 6 experimentos \pm error estándar de la media (E.E.M).

El efecto relajante de mifepristona fue comparado en presencia de los diferentes agentes uterotónicos utilizados; oxitocina y prostaglandinas (PGF_{2 α} , PGE₂ o misoprostol). También fue comparado en presencia de cada una de las prostaglandinas *vs.* el efecto relajante de progesterona en las mismas condiciones. Finalmente, se comparó el efecto de mifepristona en ausencia y presencia de los inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas (actinomicina D 10 μ M y cicloheximida 40 μ M). Las comparaciones fueron realizadas de acuerdo a la prueba t de *student* no pareada (por ser muestras independientes), considerando valores significativamente diferentes cuando $p < 0.05$.

f) Compuestos

Con excepción de oxitocina, la cual se obtuvo de la empresa Novartis Farmacéutica México, S.A. de C.V., los restantes compuestos, utilizados en este estudio, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. St. Louis MO., USA. En este estudio se incluyó: Mifepristona (RU 486; 11β -(4-dimetilamino)fenil- 17β -hidroxi-)- $17(1$ -propinil)estra-4,9-dien-3-ona), Progesterona (4-pregnen-3,20-diona), Oxitocina (Syntocinon), PGE_2 (ácido (5Z,11 α ,13E,15S)-11,15-dihidroxi-9-oxoprost-5,13-dienoico), $PGF_{2\alpha}$ (ácido (5Z,9 α ,11 α ,13E,15S)-9,11,15-trihidroxi-9-oxoprost-5,13-dienoico sal tris), misoprostol (ácido (11 α ,13E)-11,16-dihidroxi-16-metil-9-oxoprost-13-en-1-oico metil ester), Actinomicina D (Dactinomicina) y Cicloheximida (3-[2-(3,5-dimetil-2-oxociclohexil-2-hidroxietil]glutarimida).

Oxitocina fue disuelta en agua bidestilada y los otros compuestos fueron disueltos en etanol absoluto (Merck, México, S.A.); adicionando un volumen final de 0.1% en el baño de incubación (equivalente a la concentración final de 17.14 mM). Actinomicina D, fue conservada en un frasco ámbar por ser un compuesto fotosensible y de fácil degradación.

VI. Resultados

a) Efecto relajante inducido por mifepristona en contracciones inducidas por agentes uterotónicos.

La adición de mifepristona sobre la actividad inducida por la oxitocina o por cada una de las prostaglandinas, mostró una marcada disminución en la amplitud de las contracciones, mostrando un claro efecto inhibitorio sobre todas las respuestas contráctiles (Fig. 3B-E). En el caso de la prueba en presencia de misoprostol (Fig. 3D), en algunos casos se pudo también apreciar un ligero incremento en la frecuencia de las contracciones; sin embargo, la evaluación final resultó un efecto inhibitorio. Notablemente, el efecto de la mifepristona fue rápido (~ 5 min), afectando la contracción inmediata a su adición (ver Fig. 3B-E). También se pudo observar que el efecto de mifepristona es parcialmente reversible cuando se retira el tratamiento mediante un lavado (recambio de solución Ringer). El análisis de los datos mostró que la relajación inducida por mifepristona a los 30 min fue mayor cuando el tejido está en presencia de oxitocina (~ 20 %), en comparación a las diferentes prostaglandinas. El efecto relajante de mifepristona a los 90 minutos no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) en presencia de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y misoprostol, resultando menor en el caso de la PGE_2 .

El vehículo utilizado para disolver las prostaglandinas o la mifepristona (0.1% de etanol absoluto para cada compuesto) no modificó de manera significativa ($p > 0.05$) la contracción espontánea en el útero humano gestante a término (Fig. 3A). Asimismo, la adición del vehículo de mifepristona (0.1% de etanol absoluto) no modificó significativamente ($p > 0.05$) cada una de las respuestas (a oxitocina o a prostaglandinas).

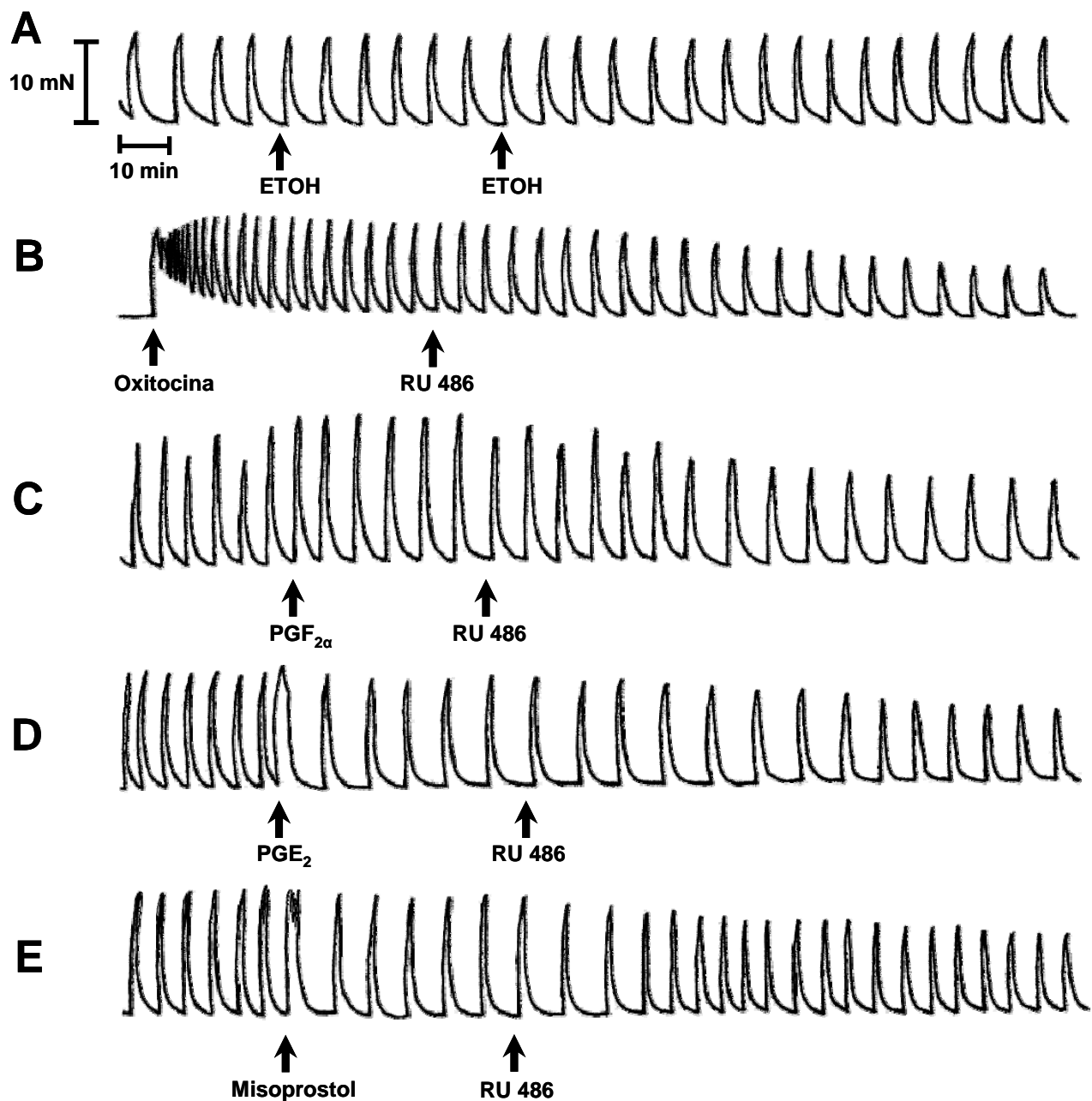


Figura 3. Registro típico de la actividad contráctil espontánea del útero humano gestante a término. (A) Efecto de etanol absoluto (ETOH 0.1%) en el cual se administró la prostaglandina (primera adición) y mifepristona (segunda adición), nótese que la actividad uterina no fue modificada ($p > 0.05$). Efecto relajante inducido por 100 μM de mifepristona (RU 486) sobre la actividad inducida por: (B) 100 nM de oxitocina, (C) 1 μM de PGF_{2 α} , (D) 1 μM PGE₂, y (E) 1 μM misoprostol.

b) Comparación de la eficacia de mifepristona y progesterona en la respuesta inducida por las diferentes prostaglandinas.

El efecto relajante de mifepristona fue evaluado a 30, 60 y 90 min después de su adición, mostrando una clara correlación entre la magnitud del efecto relajante de la mifepristona y el tiempo, *i.e.* que el efecto relajante se incrementa a medida que aumenta el tiempo de exposición del tejido a mifepristona (Fig. 4A). Como era de esperarse, la progesterona produce relajación de la actividad uterina en todos los tratamientos (Fig. 4B). Como se observa en la Fig. 4AB, el efecto relajante de mifepristona resultó significativamente menor ($p < 0.01$) al efecto relajante inducido por progesterona, cuando fueron comparadas equimolecularmente (100 μM cada una) en presencia de cada agente uterotónico y a todos los tiempos de evaluación. El efecto máximo, evaluado al mayor tiempo (90 min), muestra que progesterona produce un efecto $>60\%$ de relajación, mientras mifepristona solo produce 20-30% de relajación.

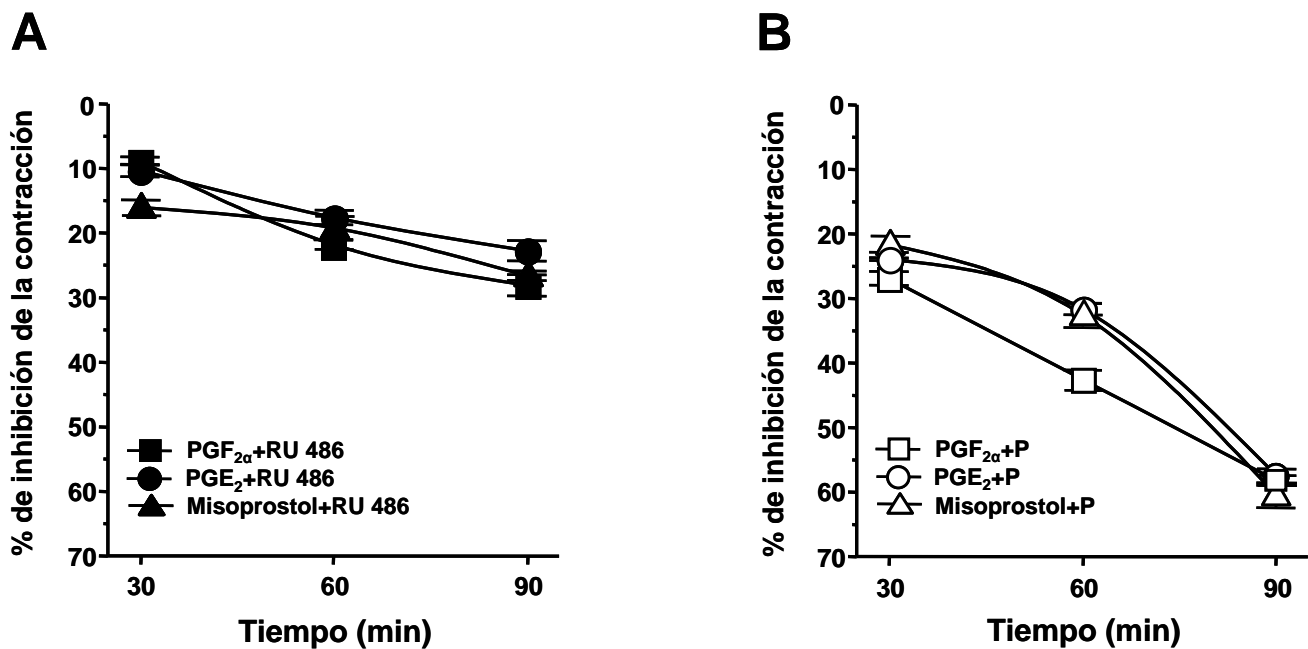


Figura 4. Curso temporal del efecto relajante de: A) 100 μM de mifepristona (RU 486) y B) 100 μM de progesterona (P), en presencia de cada una de las prostaglandinas (PGF_{2α}, PGE₂ y misoprostol; a concentración de 1 μM cada una).

En cuanto al análisis del posible antagonismo, sinergismo o potenciación del conocido efecto antiuterotónico de progesterona en presencia de mifepristona. El efecto relajante de progesterona sobre la contracción espontánea corresponde a 33% a 30 min. En presencia de mifepristona, dicha relajación fue mayor, incrementándose ~15%; el cual corresponde al porcentaje de relajación de mifepristona a los 30 min; es decir, se sinergizó el efecto de ambos compuestos. Además se pudo observar que mifepristona fue incapaz de antagonizar el efecto relajante inducido por la progesterona.

c) Actividad de las prostaglandinas en presencia de mifepristona.

La respuesta a cada prostaglandina no fue incrementada cuando el tejido fue preincubado con mifepristona, mostrando que no hay potenciación del efecto uterotónico de las prostaglandinas. Por el contrario, el deterioro de la actividad uterina espontánea (relajación) que provoca mifepristona muestra que el tejido está menos reactivo al efecto de cada prostaglandina, especialmente para PGE₂ y misoprostol.

d) Modo de acción del efecto relajante de mifepristona.

Este protocolo fue realizado para determinar si el efecto de mifepristona podría ser bloqueado en presencia de los inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas. Se observó que mifepristona (100 μM) también produce pérdida del tono de la contracción tónica sostenida inducida por despolarización (KCl 40 mM). El efecto de mifepristona (29.58±1.82% de relajación) no fue bloqueado cuando el tejido fue preincubado con cicloheximida (28.17±1.61% de relajación) o actinomicina D (30.20±2.5% de relajación), ver Fig. 5.

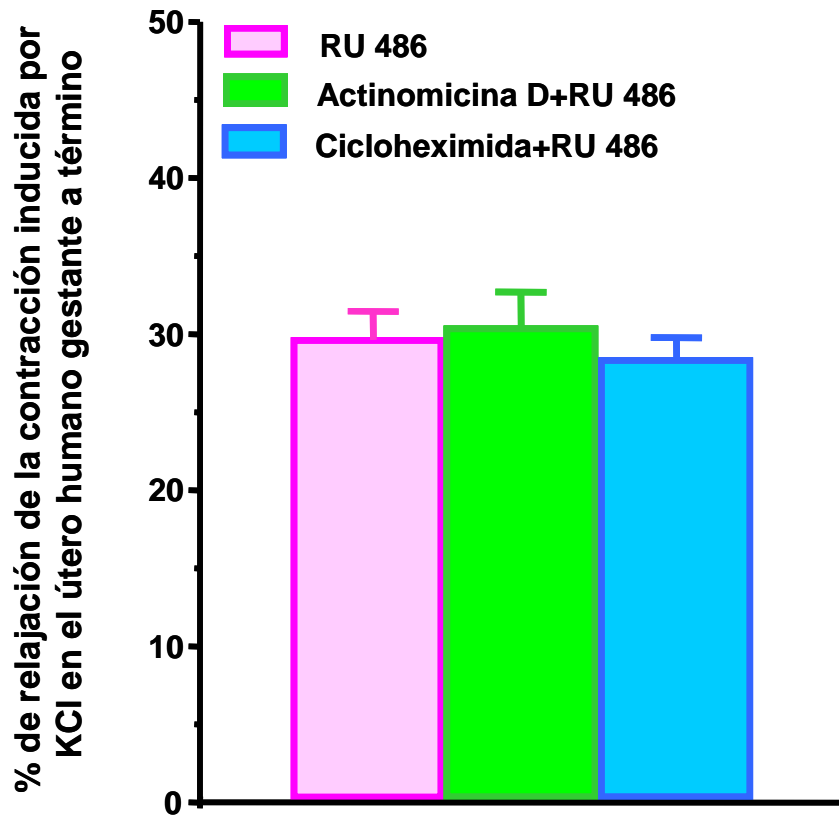


Figura 5. Efecto relajante de mifepristona (RU 486 100 μ M) sobre la contracción inducida por KCl 40 mM en útero humano gestante a término, sólo y en presencia de los inhibidores de la transcripción (actinomicina D 10 μ M) y de la síntesis de proteínas (cicloheximida 40 μ M), mostrando que no hay diferencia significativa ($p>0.05$).

VII. Discusión

Los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo revelan que la mifepristona tiene la capacidad de provocar relajación de la contractilidad uterina, al inducir una clara disminución de la actividad miometrial en presencia de oxitocina y prostaglandinas (PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ y misoprostol).

Reportes previos han documentado que la mifepristona induce relajación de la contractilidad uterina en ratas no gestantes (Perusquía y Kubli-Garfias, 1994; Parra et al., 2000) y gestantes (Bouftila y Clabaut, 2001). En primates subhumanos, la mifepristona no es efectiva para inducir el parto (Wolf et al., 1989), produciendo contracciones irregulares e insuficientes (Haluska et al., 1987). En útero humano no gestante, mifepristona disminuye la frecuencia y no incrementa la amplitud y duración de las contracciones (Lobaccaro-Henri et al., 1992); además, en el útero humano gestante a término la mifepristona no acorta la duración de la labor, lo cuál no facilita el proceso de parto (Stenlund et al., 1999). Estas evidencias, particularmente en primates, sugieren que la mifepristona podría ejercer relajación uterina; sin embargo, no queda definido en estos trabajos. Por tal razón, el presente estudio es el primero en establecer claramente que la mifepristona posee la propiedad de relajar al miometrio humano gestante a término, un hecho que se contrapone con la aceptada estimulación de la actividad miometrial que se le ha atribuido a la mifepristona.

La acción conocida de la mifepristona (activación de la contracción uterina) no es directamente producida por esta antiprogestina, debido a que provoca incremento en la síntesis de prostaglandinas y sensibiliza al útero a la acción uterotónica de estas (Baulieu, 1997). Así, esta estimulación indirecta que al parecer dispara la mifepristona a través de las prostaglandinas, es un proceso que requiere de amplio tiempo y que involucra su interacción con el receptor a progesterona. En este estudio observamos que la

mifepristona produce una rápida inhibición de la contractilidad miometrial (~ 5 min) que puede ser revertida al retirar el tratamiento; siendo una evidencia obvia para descartar la participación del receptor a progesterona involucrado en la vía genómica. Esta sugerencia fue, además, reforzada por el hecho de que al inhibir la transcripción y síntesis de proteínas el efecto relajante de la mifepristona no fue modificado. Estos hallazgos experimentales permiten caracterizar indiscutiblemente al efecto relajante de la mifepristona como un modo de acción de tipo **nogenómico**, una acción independiente de la vía genómica. Lo cual concuerda con la postulación de su efecto nogenómico en el útero de rata (Perusquía y Kubli-Garfias, 1994; Parra et al., 2000).

Aunque la mifepristona es clásicamente descrita como una antiprogestina, con actividad antagonista sobre los receptores a progesterona, los presentes datos demuestran que también produce una **acción agonista** a nivel nogenómico al inducir rápida relajación miometrial, sin acción antagonista por su incapacidad para bloquear la relajación nogenómica de la progesterona. Estableciendo que la mifepristona tiene la capacidad de ejercer un efecto relajante que antecede a su actividad antiprogestacional sobre el receptor a progesterona. En resumen, la mifepristona mimetiza el conocido efecto antiuterotónico de la progesterona (Csapo, 1956; Perusquía, 2001) y otros esteroides como: progestinas (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001) y andrógenos (Perusquía et al., 2005), posiblemente por compartir la misma estructura básica de todos los esteroides.

Por otra parte y debido a que el proceso de abortión por el método farmacológico mifepristona/misoprostol toma un tiempo muy prolongado para ser completado, lo cual puede jugar un papel relevante en la aceptabilidad del método farmacológico, las investigaciones actuales están proponiendo acortar los intervalos de tiempo de la administración mifepristona/misoprostol, dado a que aún no ha sido estudiado a intervalos más cortos de 12 h (Gemzell-Danielsson et al., 2006). Sin

embargo, el hecho de que mifepristona inicialmente produzca relajación miométrial deberá ser considerado en este tipo de estudios, por la posibilidad de que la mifepristona produzca un efecto contraproducente, al antagonizar la actividad contráctil. Aunado a lo anterior, cabe señalar que el intervalo de tiempo entre la aplicación de mifepristona y la aparición de las contracciones uterinas es de 24 a 36 h; así, la incrementada sensibilidad del útero a la acción de prostaglandinas aparece 24 h después de empezar el tratamiento con mifepristona, siendo máximo a las 36 y 48 h (Swahn y Bygdeman, 1988). En este contexto, es elemental considerar que la farmacocinética de la mifepristona es caracterizada por una rápida absorción, con una vida media de 25 a 30 h (Heikinheimo et al., 2003). A este respecto, es tentado a sugerir que la mifepristona inicialmente inhibe la actividad contráctil miométrial y posteriormente, los productos de su metabolismo, por hidroxilación, podrían resultar los responsables de aumentar la síntesis de prostaglandinas. En este estudio confirmamos la baja acción uterotónica de las prostaglandinas a término de la gestación, un hecho que puede variar en etapas tempranas de la gestación y que por razones éticas no podemos confirmar en nuestro ensayo.

Por lo tanto, la presente Tesis y los datos en relación a la falla de mifepristona para inducir el parto (Wolf et al., 1989; Haluska et al., 1987; Lobaccaro-Henri et al., 1992; Stenlund et al., 1999) postulan que el régimen mifepristona/misoprostol puede ser ineficaz para la indicación de expulsión de un feto muerto durante el tercer trimestre de gestación (Sitruk-Ware y Spitz, 2003). Tomando en conjunto esta línea de evidencias, es probable que el método mifepristona/misoprostol para la interrupción del embarazo, sea causado primordialmente por la prostaglandina; dado a que se ha reportado que misoprostol induce un fuerte efecto uterotónico y es usado ilegalmente para la terminación del embarazo en algunos países (Blanchard et al., 1999; Costa, 1998). El rango reportado para producir aborto completo por misoprostol varía entre 61% para una sola dosis y 93% para dosis repetidas (Bugalho et al., 1996; Carbonell et al., 1997).

Es importante destacar que además la administración de PGE₂ o de oxitocina producen una eficacia de 93% y 91% respectivamente para interrumpir el embarazo (Winkler et al., 1991). Este hecho también evidencia que la combinación de mifepristona/misoprostol podría no superar el tratamiento directo con oxitocina o prostaglandinas, las cuales producen el mismo rango de eficacia que la combinación mifepristona/misoprostol, que además, requiere de mayor tiempo para obtener el resultado.

Finalmente, en el presente estudio admitimos que la concentración usada de mifepristona (100 µM; equivalente a 0.4 mg) está lejos de la mínima dosis terapéutica usada (200 mg), esta limitante en nuestro sistema in vitro fue debida a las características fisicoquímicas de este compuesto, como su alta hidrofobicidad. Sin embargo, es prematuro descartar el efecto reportado en esta Tesis, sin tomar en cuenta la importante contribución al conocimiento de los diferentes efectos y modos de acción de esta antiprogestina en el útero humano.

VIII. Conclusiones

El presente trabajo mostró que la mifepristona puede inducir otro efecto antes de su conocida acción antiprogestacional. La principal aportación de esta tesis fue describir el panorama completo de la vía de acción de esta antiprogestina en el útero humano, llegando a las siguientes conclusiones:

1. La mifepristona no potencia la acción uterotónica de las prostaglandinas o de la oxitocina, por el contrario la inhibe.
2. La mifepristona produce inicialmente un efecto relajante sobre la contractilidad miometrial, el cual antecede a su efecto progestacional.
3. La mifepristona inhibe las contracciones uterinas a través de un mecanismo nogenómico, independiente al receptor a progesterona.
4. La mifepristona mimetiza el conocido efecto antiuterotónico de la progesterona, comportándose como agonista, posiblemente por compartir la misma estructura básica de todos los esteroides.
5. La mifepristona no ejerce actividad antagonista sobre el efecto relajante de progesterona.

IX. Referencias

Baird DT, Sukcharoen N, Thong KJ. Randomized trial of misoprostol and cervagem in combination with a reduced dose of mifepristone for induction of abortion. *Hum Reprod* 1995, 10(6): 1521-1527.

Baulieu EE. RU 486 (mifepristone). A short overview of mechanism of action and clinical uses at the end of 1996 *Ann NY Acad Sci* 1997, 26(828): 47-58.

Beck CA, Estes PA, Bona BJ, Muro-Cacho CA, Nordeen S, Edwards DP. The steroid antagonist RU 486 exerts different effects on the glucocorticoid and progesterone receptors. *Endocrinology* 1993, 133(2): 728-740.

Blanchard K, Winikoff B, Ellertson C. Misoprostol used alone for the termination of early pregnancy. A review of the evidence. Contraception 1999, 59(4): 209-217.

Bouftila B, Clabaut M. Effects of RU 486 on electrical activity, on sexual steroid and prostaglandin F_{2α} concentrations in the myometrium at mid-pregnancy in the rat. *C R Acad Sci III* 2001, 324(9): 805-813.

Bugalho A, Faundes A, Jamisse L, Usfa M, Maria E, Bique C. Evaluation of the effectiveness of misoprostol to induce first trimester abortion. *Contraception* 1996, 53(4): 244-246.

Bygdeman M, Bygdeman M, Christensen N, Gréen K, Lundström V. A comparison of two stable prostaglandin E analogues for termination of early pregnancy and for cervical dilatation. *Contraception* 1980, 22(5): 471-483.

Bygdeman M, Swahn ML. Progesterone receptor blockage. Effect on uterine contractility and early pregnancy. *Contraception* 1985, 32(1): 45-51.

Bygdeman M, Gemzell-Danielsson K, Marions L, Swahn ML. Pregnancy termination. *Steroids* 2000, 65(10-11): 801-805.

Carbonell LL, Varela L, Velazco A, Fernandez C. The use of misoprostol for termination of early pregnancy. *Contraception* 1997, 55(3): 165-168.

Chen FG, Koh KF, Chong YS. Cardiac arrest associated with sulprostone use during caesarean section. *Anaesth Intensive Care* 1998, 26(3): 298-301.

Christin-Maitre S, Bouchard P, Spitz IM. Medical termination of pregnancy. *N Engl J Med* 2000, 342(13): 946-956.

Costa SH. Commercial availability of misoprostol and induced abortion in Brazil. Int J Gynaecol Obstet 1998, 63 (Suppl 1):S131-S139.

Csapo A. Progesterone block. *Am J Anat* 1956, 98(2): 273-291.

- Dodd JM, Crowther CA. Misoprostol versus cervagem for the induction of labour to terminate pregnancy in the second and third trimester: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006, 125(1): 3-8.
- El-Refaey H, Rajasekar D, Abadía M, Calder L, Templeton A. Induction of abortion with mifepristone (RU 486) and oral or vaginal misoprostol. *N Engl J Med* 1995, 332(15): 983-987.
- Gemzell-Danielsson K, Bygdeman M, Arosson A. Studies on uterine contractility following mifepristone and various routes of misoprostol. *Contraception* 2006, 74:31-35.
- Haluska GJ, Stanczyk FZ, Cook MJ, Novy MJ. Temporal changes in uterine activity and prostaglandin response to RU 486 in rhesus macaques in late gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1987, 157(6): 1487-1495.
- Heikinheimo O, Kekkonen R, Lähteenmäki P. The pharmacokinetics of mifepristone in humans reveal insights into differential mechanisms of antiprogesterin action. *Contraception* 2003, 68(6):421-426.
- Herrmann W, Wyss R, Riondel A, Philibert D, Teutsch G, Sakiz E, Baulieu EE. Effects of an antiprogesterone steroid in women: interruption of the menstrual cycle and of early pregnancy. *Acad Sci* 1982, 294(18): 933-938.
- Ho PC, Ngai SW, Liu KL, Wong GC, Lee SW. Vaginal misoprostol compared with oral misoprostol in termination of second trimester pregnancy. *Obstet Gynecol* 1997, 90(5): 735-738.
- Jain JK, Mishell DR. A comparison of intravaginal misoprostol with prostaglandin E₂ for termination of second trimester pregnancy. *N Engl J Med* 1994, 331(5): 324-335.
- Johannisson E, Oberholzer M, Swahn ML, Bygdeman M. Vascular changes in the human endometrium following the administration of the progesterone antagonist RU 486. *Contraception* 1989, 39(1): 103-117
- Klein R, Raymond J, Dumble L. RU 486: Misconceptions, myths and morals. Spinifex Press., Australia, 1991: 9-18.
- Lin M, Li YT, Chen FM, Wu SF, Tsai CW, Chen TH, Kuo TC. Use of mifepristone and sublingual misoprostol for early medical abortion. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006, 45(4): 321-324.
- Lobaccaro-Henri C, Saintot M, Laffargue F, Zahradnik HP, Descomps B, Thaler-Dao H. Effect of the progesterone antagonist RU486 on human myometrial spontaneous contractility and PGI₂ release. *Prostaglandins* 1992, 44(5):443-445.
- McKinley C, Thong KJ, Baird DT. The effect of dose of mifepristone and gestation on the efficacy of medical abortion with mifepristone and misoprostol. *Hum Reprod* 1993, 8(9): 1502-1505.
- Norman JE, Thong KJ, Baird DT. Uterine contractility and induction of abortion in early pregnancy by misoprostol and mifepristone. *Lancet* 1991, 338(8777): 11233-11236.

Parra J, Cantabrana B, Hidalgo A. Mechanism of mifepristone-induced spasmolytic effect on isolated rat uterus. *Life Sci* 2000, 66(6): 2563-2569.

Paulo AS, Reis-Morais AC, Sá-Correia M. Use of sulprostone in the medical evacuation of uterine contents. *Acta Med Port* 1996, 9(4-6): 157-161.

Penney GC, McKessock L, Rispin R, El-Rafaey H, Templeton A. An effective low-cost regimen for early medical abortion. *Br J Fam Plann* 1995, 21: 5-6.

Perusquía M, Kubli-Garfias C. Progesterone-like relaxant effect of RU 486 in the rat myometrium. *Life Sci* 1994, 54(20): 1501-1506.

Perusquía M. Nongenomic action of steroids in myometrial contractility. *Endocrine* 2001, 15(1): 63-72.

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(26): 2933-2944.

Perusquía M, Navarrete E, Jasso-Kamel J, Montañó LM. Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a nongenomic action on L-type calcium channels. *Biol Reprod* 2005, 73(2): 214-221.

Peyron R, Aubeny E, Targosz V, Silvestre L, Renault M, Elkik F, Lecler P, Ulmann A, Baulieu EE. Early termination of pregnancy with mifepristone (RU 486) and the oral active prostaglandin misoprostol. *N Engl J Med* 1993, 328(21): 1509-1513.

Philibert D, Deraedt R, Testsch E. RU 38486 a potent antiglucocorticoid in vivo. Proceedings of the 8th International Congress of Pharmacology. Tokio, Japan 1981, Abstract 1463.

Philibert D. RU38486. An original multifaceted antihormone in vivo. In: *Adrenal Steroid Antagonism*. Agarwal M, ed. Walter de Gruyter and Co., Berlin, 1984: 77-101.

Sang GW, Weng LJ, Shao QX, Du MK, Wu XZ, Lu YL, Cheng LN. Termination of early pregnancy by two regimens of mifepristone with misoprostol and mifepristone with PG05 a multicentre randomized clinical trial in China. *Contraception* 1994, 50(6): 501-510.

Schaff EA, Eisinger SH, Stadalius LS, Franks P, Gore BZ, Poppema S. Low dose mifepristone 200 mg and vaginal misoprostol for abortion. *Contraception* 1999, 59(1): 1-6.

Sitruk-Ware R, Spitz IM. Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies. *Contraception* 2003, 68(6): 409-420.

Spitz IM, Bardin CW, Benton L, Robbins A. Early pregnancy termination with mifepristone and misoprostol in the United States. *N Engl J Med* 1998, 338(18): 1241-1247.

Stendlund PM, Ekman G, Aedo AR, Bydeman M. Induction of labor with mifepristone -a randomized, double-blind study versus placebo. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999, 78(9): 793-798.

Swahn ML, Bydeman M. The effect of the antiprogesterin RU 486 on uterine contractility and sensitivity to prostaglandin and oxytocin. *Br J Obstet Gynaecol* 1988, 95(2): 126-134.

Tang OS, Chan CC, Ng EH, Lee SW, Ho PC. A prospective, randomized, placebo-controlled trial on the use of mifepristone with sublingual or vaginal misoprostol for medical abortions of less than 9 weeks of gestation. *Hum Reprod* 2003, 18(11): 335-338.

Ulmann A, Silvestre L, Chemama , Rezvani Y, Renault M, Aguillaume CJ, Baulieu EE. Medical termination of early pregnancy with mifepristone (RU 486) followed by a prostaglandin analogue: study in 16, 369 women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992, 71(4): 278-283.

Winikoff B, Sivin I, Coyaji KJ, Cabezas E, Xiao B, Gu S, Du MK, Krishna UR, Eschen A, Ellertson C. Safety, efficacy and acceptability of medical abortion in China, Cuba and India: a comparative trial of mifepristone-misoprostol versus surgical abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1997, 176: 431-437.

Winkler CL, Gray SE, Hauth JC, Owen J, Tucker JM. Mid-second-trimester labor induction: concentrated oxytocin compared with prostaglandin E₂ vaginal suppositories. *Obstet Gynecol* 1991, 77(2): 297-300.

Wolf JP, Sinosich M, Anderson TL, Ulmann A, Baulieu EE, Hodgen GD. Progesterone antagonist (RU 486) for cervical dilation, labor induction, and delivery in monkeys: effectiveness in combination with oxytocin. *Am J Obstet Gynecol*. 1989, 160(1): 45-47.

World Health Organization Task Force on Post-ovulatory Methods of Fertility Regulation. Termination of pregnancy with reduced doses of mifepristone. *BMJ* 1993, 307(6903): 532-537.

Wu S, Gao J, Wu Y, Wu M, Fan H, Yao G, Zheng S, Wang P, Du M, Huang Z. Clinical trial of termination of early pregnancy with RU 486 in combination with prostaglandin. *Contraception* 1992, 46(3): 203-210.