



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**ACCIÓN NO GENÓMICA DE LA ANTIPROGESTINA
RU 486 AL INDUCIR RELAJACIÓN DE LA
CONTRACTILIDAD UTERINA HUMANA AL TÉRMINO
DE LA GESTACIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓL. ERIKA NAVARRETE MONROY

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MA. MERCEDES PERUSQUÍA NAVA

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANA ELENA LEMUS BRAVO
DR. FELIPE VADILLO ORTEGA**

MÉXICO, D. F.

AGOSTO, 2010



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.

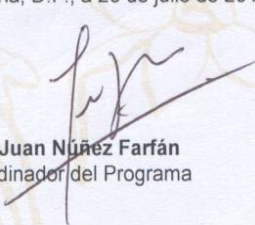
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente.

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de junio de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **NAVARRETE MONROY ERIKA** con número de cuenta **090123430** con la tesis titulada **"ACCIÓN NO GENÓMICA DE LA ANTIPROGESTINA RU 486 AL INDUCIR RELAJACIÓN DE LA CONTRACTILIDAD UTERINA HUMANA AL TÉRMINO DE LA GESTACIÓN"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA:**

Presidente: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
Vocal: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA
Secretario: DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA
Suplente: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Suplente: DR. SEBANTIÁN MANUEL ARTEAGA MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de julio de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Al *Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*; por ser el medio que me permitió enriquecer mi formación académica y por todas las facilidades otorgadas para cubrir los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

A la *Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM*; a través del Programa de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyecto IN202507-3.

A los miembros del *Comité Tutor* que supervisaron el presente proyecto, así como la escritura de esta tesis: *Dra. María Mercedes Perusquía Nava* (Tutora Principal), *Dra. Ana Elena Lemus Bravo* y *Dr. Felipe Vadillo Ortega*; por sus valiosas críticas, las cuales además de enriquecer este proyecto, han contribuido principalmente en mi formación académica.

A la *Dra. Gloria Soberón Chávez*, Directora del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por otorgarme el permiso para estudiar un Posgrado.

Al *Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM*, por el uso de sus instalaciones para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Mercedes Perusquía Nava, por sus valiosas enseñanzas académicas durante la dirección de esta tesis, por enseñarme a ser autocrítica y que la única manera de alcanzar los objetivos es la constancia y la dedicación.

A los miembros del Jurado: Dr. Federico Martínez Montes, Dr. Felipe Vadillo Ortega, Dra. Mercedes Perusquía Nava, Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y Dr. Sebastián Manuel Arteaga Martínez, por sus críticas y comentarios, los cuales fueron fundamentales en la conformación final de esta tesis.

A la M. en C. María Julia Espinoza Camacho, por su contribución en la parte experimental de este proyecto, por sus valiosas críticas académicas durante el desarrollo de esta tesis y por todas las horas de trabajo compartidas en el laboratorio.

A la Sra. Juana Trejo González, por su invaluable apoyo en el laboratorio, el cual me permitió desarrollar la parte experimental y escrita de esta tesis, además por los años gratamente compartidos en el laboratorio.

A Irma Rodríguez García, por sus primeras enseñanzas en el laboratorio, las cuales sigo valorando.

A los Drs. Jaime Jasso Kamel, Lorena González Hernández y Nohemi Alejandre Blanco, por su gran disposición en la colecta de muestras uterinas durante sus cirugías.

A la Lic. Lucía Brito Ocampo, por su apoyo técnico para la obtención de la literatura requerida en la conformación de esta tesis.

A Beatriz Vera Cano, por la amabilidad que siempre mostró para la realización de los trámites requeridos durante mi estudios de Posgrado.

DEDICATORIAS

A mi querido esposo:

Hugo, me siento muy afortunada de que compartas tu vida conmigo, gracias por tu apoyo y comprensión, fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis. TE AMO.

A mi hija Abril Andrea:

Te dedico de manera muy especial este logro, por ser el motivo no sólo para el desarrollo de esta tesis, por ser el motivo de mi vida.

A mis hermanos; Leticia, Silvia, Maribel, Sonia y Rafael:

Comparto con ustedes este triunfo, porque con ustedes he compartido y compartiré lo bueno y lo malo en mi vida. Son el mejor regalo de mis Padres.

A mis sobrinos; Quetzali, Yukie, Danaé, Iván, Rafael, Raziel, Irving y Joan:

Cada uno de ustedes representa alegría en mi vida, espero que logren cosas muy especiales en su vida.

A mis cuñados; Martín, Horacio, Alejandro, Arturo, Leticia, Jesús, Silvia, Hilda, Lilian y Ericka:

Valoro todo lo bueno que cada uno de ustedes me ha dado.

A mi suegra Conchita,

De pocas personas hay mucho que aprender, usted es una de ellas.

A la memoria del coraje y honestidad de mis Padres
Martina Monroy García †
Y
Antonio Navarrete Caballero †

Si Dios nos permitiese pasar por nuestras vidas sin encontrar ningún obstáculo,

nos dejaría limitados...

No lograríamos ser tan fuertes como podríamos haber sido

Si pides fuerza... Dios te dará dificultades para hacerte fuerte

Si pides sabiduría... Dios te dará problemas para resolver

Si pides prosperidad... Dios te dará cerebro y músculos para trabajar

Si pides valor... Dios te dará obstáculos para superar

No recibirás nada de lo que pidas.... recibirás todo lo que necesitas

Este estudio fue parcialmente presentado en:

XXXIV Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción A.C. Querétaro, Qro. Junio 24-27, 2009. Nongenomic uterine relaxing effect of RU 486 (mifepristone) prior to its antiprogesterone activity in the human pregnancy.

Este estudio además fue publicado en:

Perusquía M, Espinoza J, Navarrete E. Nongenomic uterine relaxing effect of RU 486 (mifepristone) prior to its antiprogesterone activity in the human pregnancy. *Steroids* 74(10-11): 825-831, 2009. (Anexo 1).

| | |
|--|------|
| ÍNDICE | Pág. |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| I. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1. Generalidades de RU 486 | 3 |
| 2. Uso terapéutico de RU 486 en combinación con prostaglandinas para interrumpir el embarazo | 6 |
| <i>a) Régimen utilizado</i> | 8 |
| <i>b) Farmacocinética y metabolismo</i> | 11 |
| 3. Mecanismo de acción de RU 486 para interrumpir el embarazo | 14 |
| 4. Efecto de RU 486 sobre la contractilidad uterina | 18 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 22 |
| III. HIPÓTESIS | 23 |
| IV. OBJETIVOS | 24 |
| V. MATERIAL Y MÉTODOS | 25 |
| 1. Obtención y manejo de las muestras uterinas | 25 |
| 2. Sistema de registro isométrico para tejido aislado | 26 |
| 3. Diseño experimental | 28 |
| <i>3.1 Determinación del efecto inducido por RU 486 sobre la actividad contráctil espontánea del miometrio humano gestante a término</i> | 28 |
| <i>3.2 Determinación y comparación del efecto inducido por RU 486 y progesterona sobre la contracción espontánea del miometrio humano gestante a término</i> | 29 |
| <i>3.3 Determinación del efecto de RU 486 sobre contracciones inducidas por diferentes agentes uterotónicos en el miometrio humano gestante a término</i> | 30 |
| <i>a) Contracciones inducidas por oxitocina y prostaglandinas</i> | 30 |
| <i>b) Contracción inducida por KCl</i> | 32 |

| | |
|--|----|
| c) <i>Eficacia de RU 486</i> | 33 |
| 3.4 <i>Exploración del mecanismo de acción del efecto relajante inducido por RU 486 en el miometrio humano gestante a término</i> | 33 |
| 3.5 <i>Potencial antagonismo de RU 486 sobre los canales de calcio</i> | 34 |
| 4. Procesamiento de los datos | 35 |
| 5. Compuestos utilizados | 36 |
| VI. RESULTADOS | 37 |
| 1. Efecto relajante de RU 486 sobre la actividad contráctil espontánea del miometrio humano gestante a término | 37 |
| 2. Comparación del efecto relajante inducido por RU 486 y progesterona sobre la contracción espontánea del miometrio humano gestante a término | 43 |
| 3. Efecto relajante inducido por RU 486 sobre diferentes agentes uterotónicos en el miometrio humano gestante a término | 47 |
| a) <i>Contracciones inducidas por oxitocina y prostaglandinas</i> | 47 |
| b) <i>Contracción inducida por KCl</i> | 52 |
| c) <i>Eficacia de RU 486</i> | 54 |
| 4. Mecanismo de acción del efecto relajante uterino inducido por RU 486 | 56 |
| 5. Efecto de RU 486 sobre la contracción inducida por calcio en miometrio humano previamente despolarizado | 58 |
| VII. DISCUSIÓN | 60 |
| VIII. CONCLUSIONES | 65 |
| IX. REFERENCIAS | 66 |
| ANEXO 1. Artículo publicado | 72 |
| ANEXO 2. Aprobación del proyecto por la Comisión de Bioética para Investigación en Humanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas | 79 |

RESUMEN

La antiprogestina RU 486 (mifepristona) es utilizada en el tratamiento para interrumpir el embarazo, RU 486 bloquea la acción quiescente de la progesterona, incrementando la contractilidad uterina, sensibilizando el miometrio a la respuesta contráctil de las prostaglandinas y provocando maduración cervical. Debido a que RU 486 pertenece a una clase de compuestos estructuralmente relacionados a las hormonas esteroides; las cuales poseen efectos relajantes uterinos no genómicos, en este estudio se investigó la potencial acción relajante no genómica de RU 486 en el miometrio humano gestante. Se obtuvieron tejidos miometriales de mujeres gestantes a término sometidas a operación cesárea por indicación y fueron registrados isométricamente. RU 486 causó relajación de la contractilidad espontánea y de contracciones inducidas por potasio alto, pero con menor eficacia que la progesterona. La acción bloqueadora de RU 486 sobre el receptor de la progesterona, no antagonizó la relajación uterina de la progesterona. Por otra parte, contracciones inducidas por oxitocina o diferentes prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 , y un análogo de prostaglandina; misoprostol) fueron inhibidas, y no incrementadas por RU 486. RU 486 provocó un rápido y reversible efecto relajante, el cual no fue afectado por inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas, implicando que RU 486 actúa a través de un mecanismo no genómico. Este trabajo revela que RU 486: (i) reduce la contracción inducida por potasio alto y previene la contracción inducida por calcio en tejidos despolarizados, lo que implica un bloqueo de los canales de calcio operados por voltaje; y (ii) RU 486 relaja las contracciones inducidas por oxitocina y prostaglandinas, sugiriendo un bloqueo de los canales de calcio operados por receptor. Estos datos muestran que la antiprogestina RU 486 puede inducir un rápido efecto antiuterotónico no genómico antes de su acción antiprogestacional.

ABSTRACT

The antiprogestin RU 486 (mifepristone) is used for termination of pregnancy, as RU 486 blocks the quiescent action of progesterone, increases uterine contractility, sensitizes the myometrium to prostaglandins, and elicits cervical ripening. Since RU 486 represents a class of compound that is structurally related to steroid hormones, some of which possess a nongenomic uterine relaxing effect, we investigated the potential nongenomic relaxing action of RU 486 on the human pregnant myometrium. Myometrial tissues were obtained from pregnant women undergoing elective cesarean section at term and were isometrically recorded. RU 486 caused relaxation on spontaneous contractility and high potassium-induced contractions with lower relaxing efficacy than progesterone. The progesterone receptor-blocking activity of RU 486 did not antagonize the uterine relaxation of progesterone. Moreover, contractions induced by oxytocin or different prostaglandins (PGF_{2α}, PGE₂, and a prostaglandin analogue, misoprostol) were inhibited rather than increased by RU 486. RU 486 induced a rapid and reversible relaxing effect, which was unaffected by inhibitors of protein synthesis and transcription, implying that RU 486 acts through a nongenomic mechanism. This study reveals that RU 486: (i) reduced high potassium-induced contraction and prevented calcium-induced contraction in depolarized tissue; and (ii) relaxed the oxytocin and prostaglandin-induced contractions, indicating a blockade of voltage- and receptor-operated calcium channels by RU 486. These data show that this antiprogestin may induce a rapid nongenomic antiuterotonic effect prior to its antiprogestin action.

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de RU 486

En 1980 Phillibert y Teutsch de la firma farmacéutica Roussel-Uclaf, sintetizaron un esteroide al que denominaron RU 38486 (Phillibert *et al.*, 1981). Posteriormente el nombre fue simplificado a RU 486 y actualmente es conocido con el nombre genérico de mifepristona. Inicialmente Phillibert y colaboradores (1981) reportaron a este compuesto como potente antiglucocorticoide, capaz de unirse al receptor de glucocorticoides con una afinidad 3 veces mayor a la de la dexametasona. Tres años más tarde, se reporta que este compuesto también es capaz de unirse al receptor de progesterona (PR), con una afinidad 5 veces mayor respecto a la propia progesterona, provocando una potente acción como antiprogestina. Asimismo, RU 486 también es capaz de unirse al receptor de andrógenos, aunque con baja afinidad (25% respecto a la testosterona), y provocar acciones antiandrogénicas (Phillibert, 1984).

Por su capacidad de unirse a diferentes receptores de hormonas esteroides, el RU 486 es capaz de actuar en diferentes sitios, provocando sus efectos principalmente en el útero (miometrio y endometrio), gónadas (femeninas y masculinas) y en las glándulas suprarrenales.

Una gran diversidad de estudios han sustentado el uso terapéutico de este compuesto: (i) como anticonceptivo, por su capacidad para prevenir la implantación e inhibir la ovulación (Baulieu, 1997; Bydeman *et al.*, 1997; Baird *et al.*, 2003); (ii) como

anticonceptivo de emergencia (Cheng *et al.*, 2008); (iii) en el tratamiento del síndrome premenstrual (Weiss, 1993); (iv) en el tratamiento de varios tipos de cánceres como el mamario (Purmonen *et al.*, 2002), prostático (Cabeza *et al.*, 2007) y leiomioma uterino (Engman *et al.*, 2009) y (v) para el tratamiento el síndrome de Cushing's (Schteingart, 2009), glaucoma (Tsukahara *et al.*, 1986) y meningiomas (Chamberlain, 2001).

Cabe resaltar, que por sus propiedades antiprogestacionales, RU 486 ha sido aprobado para cuatro indicaciones: (i) interrupción del embarazo temprano; (ii) dilatación cervical previa a la interrupción del embarazo por método quirúrgico; (iii) preparación para la interrupción del embarazo con prostaglandinas (PGs) durante el segundo trimestre de embarazo; y (iv) expulsión de un feto muerto durante el tercer trimestre de embarazo (Sitruk-Ware y Spitz, 2003). De manera notoria, el uso terapéutico de RU 486 sólo es legalmente aceptado para los tratamientos anteriores.

RU 486 comparte la estructura básica de todas las hormonas esteroides (ciclopentanoperhidrofenantreno), su síntesis fue a partir de la noretindrona; en la figura 1 se muestran las estructuras químicas de RU 486 y la noretindrona. RU 486 presenta un grupo fenil 4 dimetil amino en el C₁₁ (responsable de su acción antagonista) y una cadena 17 α -propinil de alta afinidad a diversos receptores de hormonas esteroides, además presenta un doble enlace entre el C₉ y el C₁₀ (Spitz *et al.*, 1996).

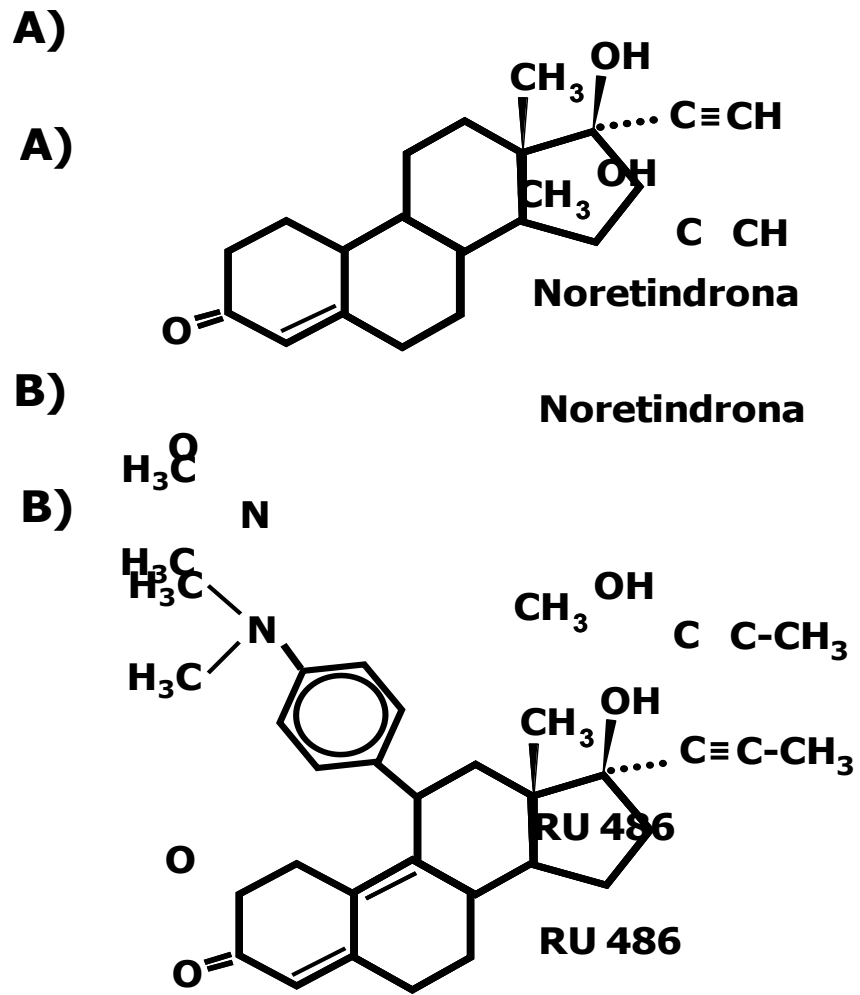


Fig. 1. Estructuras químicas de Noretindrona y RU 486.

2. Uso terapéutico de RU 486 en combinación con prostaglandinas para interrumpir el embarazo

En 1988, RU 486 fue aprobado en Francia con el nombre comercial de Mifegyne[®], para interrumpir el embarazo de hasta 49 días de gestación en combinación con misoprostol o gemeprost (análogos de la PGE₁). Años más tarde, la combinación RU 486/misoprostol o RU 486/gemeprost fue aprobada en diversos países de Europa. En forma notable en Inglaterra y Suecia, el uso de RU 486/gemeprost fue aprobado para interrumpir el embarazo de hasta 63 días. Doce años más tarde, en el año 2000, la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos, aprobó el uso de RU 486/misoprostol para interrumpir el embarazo de hasta 49 días. En la actualidad, más de 40 países han aprobado el uso de RU 486 en combinación con misoprostol o gemeprost. Al principio la aprobación de RU 486 fue sólo en países desarrollados, pero actualmente países en vías de desarrollo como Vietnam, India, Sudáfrica y Guyana también han aprobado su uso (Bartz y Goldberg, 2009) (Tabla 1).

Tabla 1. Países que han aprobado el régimen RU 486/PG* para interrumpir el embarazo.

| | |
|---|---|
| 1988 Francia y China. | 2003 Estonia |
| 1991 Inglaterra | 2004 Guyana y Moldova. |
| 1992 Suecia | 2005 Albania, Hungría y Mongolia. |
| 1999 Austria, Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Alemania, Grecia, Israel, Luxemburgo, Holanda, España y Suiza. | 2006 Kazajstán |
| 2000 Noruega, Rusia, Taiwan, Túnez, Ucrania y Estados Unidos de América. | 2007 Armenia, Portugal, Kyrgyzstan y Tajikistan. |
| 2001 Nueva Zelanda y Sudáfrica. | 2008 Rumania y Nepal. |
| 2002 Azerbaiyán, Belarús, Georgia, India, Latvia, Serbia, Uzbekistán y Vietnam. | 2009 Italia |

*misoprostol o gemeprost

Fuente: Gynuity Health Projects, 2009.

Es importante resaltar que en el continente americano el uso de RU 486 sólo ha sido aprobado en Estados Unidos de América y Guyana. En otros países de América donde la interrupción del embarazo es legal, como Canadá, Cuba, Puerto Rico y México (sólo en el Distrito Federal) no se ha aprobado el uso de RU 486. Específicamente en nuestro país, el aborto médico es aceptado utilizando sólo misoprostol (Gaceta Oficial del Distrito Federal, 4/05/2007).

a) Régimen utilizado

El esquema de tratamiento autorizado por la FDA (2000) para interrumpir el embarazo de hasta 49 días (Food and Drug Administration, 2010) es el siguiente:

Día 1: Administración de RU 486; una dosis de 600 mg vía oral (3 tabletas de 200 mg).

Día 3: Administración de misoprostol; una dosis de 0.4 mg vía oral (dos tabletas de 0.2 mg).

Día 14: Post-tratamiento; la paciente debe regresar al consultorio para confirmar la interrupción del embarazo, en caso de fracaso, se recomienda interrumpir el embarazo por método quirúrgico.

A pesar de que los países que han aprobado el uso de RU 486 para interrumpir el embarazo han establecido perfectamente los regímenes para utilizar RU 486 en combinación con misoprostol o gemeprost, con los cuales se obtiene una alta eficacia (del 92 al 98%) (Bydgeman, 2000; Christin-Maitre *et al.*, 2000); los esquemas de tratamiento vigentes han sido variados en diversos estudios clínicos, *i.e.*, se ha modificado la dosificación, la vía de administración y el intervalo de tiempo entre la

administración de RU 486 y la PG con la finalidad de reducir el tiempo para obtener el resultado (evacuación del útero).

Es aceptado que la dosis terapéutica de 600 mg de RU 486 es muy alta y se han realizado esfuerzos por disminuirla. Así, se ha reportado que la dosis de 600 mg ha mostrado la misma eficacia que la dosis de 200 mg para producir un aborto completo durante el primer trimestre (Bygdeman *et al.*, 2000); también existen evidencias de que la dosis mínima efectiva podría ser 100 mg (Creinin *et al.*, 2001a), ya que a dosis menores, de 50 mg, RU 486 en combinación con gemeprost resulta menos eficaz (87.6%) para interrumpir el embarazo (World Health Organization, 2001).

También se ha variado el intervalo de tiempo entre la administración de RU 486 y la PG, en este sentido, se ha establecido administrar misoprostol 48 h después de RU 486, observándose que acortar el intervalo de tiempo de 6 a 8 h entre RU 486 (600 mg) y misoprostol (0.4 mg; vía oral), no fue efectivo, ya que no se provocó el aborto en las primeras 24 h, en comparación con el tratamiento a un intervalo de 48 h (Creinin *et al.*, 2001b). Sin embargo, existe el hallazgo de que la administración simultánea de RU 486 (200 mg) y misoprostol (0.8 mg; vía vaginal) resulta efectiva para interrumpir el embarazo (Creinin *et al.*, 2007). En este sentido parece ser que la efectividad del tratamiento depende más de la dosis y vía de administración de la PG y no del intervalo de tiempo entre RU 486 y misoprostol. En forma interesante, un estudio reciente ha reportado que la combinación de RU 486 (200 mg) y misoprostol (0.8 mg; vía sublingual) en embarazos de 49 días produce 100% de abortos completos (Tang *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha documentado que las usuarias prefieren la administración oral y no vaginal de misoprostol, aunque esta última favorece la biodisponibilidad del fármaco, disminuyendo el tiempo de evacuación del útero y presenta mayor eficacia en embarazos mayores a 49 días. La administración vaginal de misoprostol es asociada con menor incidencia de efectos colaterales gastrointestinales, pero favorece la presencia de infecciones en el tracto reproductor femenino.

En general, es aceptado que el tratamiento con RU 486/PG tiene una alta efectividad para detener el embarazo, con pocas complicaciones serias en su uso clínico de rutina (Sitruk-Ware y Spitz, 2003; Henderson *et al.*, 2005; Bartz y Goldberg, 2009; Schaff, 2010). De forma contrastante, se han reportado a la FDA 607 casos de efectos adversos derivados del tratamiento con RU 486/misoprostol, los cuales señalan que las complicaciones más frecuentes fueron: hemorragias prolongadas y severas infecciones entre las usuarias (Gary y Harrison, 2006). Como una medida preventiva a los efectos adversos del tratamiento, la Federación de Planificación Familiar de América (The Planned Parenthood Federation of America, PPFa); reemplazó la administración vaginal de misoprostol por administración bucal, además fue incluido el uso de antibióticos de rutina, el resultado fue una reducción significativa en la tasa de infecciones severas (Fjerstad *et al.*, 2009). Cabe también mencionar que el tratamiento con RU 486/misoprostol durante el segundo trimestre, ha mostrado mayor riesgo de complicaciones como perforación o ruptura uterina y hemorragias respecto al método quirúrgico (Grossman *et al.*, 2008).

b) Farmacocinética y metabolismo

La absorción de RU 486 después de su administración por vía oral es alta (70%), aunque su biodisponibilidad es reducida hasta un 40%, debido al metabolismo hepático (Marions, 2006). De 1 a 2 h después de la administración oral de 200 y 600 mg de RU 486, se alcanza el pico máximo de concentraciones plasmáticas en un intervalo de 3.8 a 5.3 $\mu\text{mol/L}$ (Sarkar, 2002). Cuando RU 486 es administrado por vía vaginal, su absorción es insuficiente en el humano, ya que las concentraciones plasmáticas alcanzan un pico máximo en intervalo nanomolar, en el cual no se observan efectos biológicos de RU 486 (Heikinheimo *et al.*, 1987). Además, es importante enfatizar que la vida media del compuesto es de 25 a 30 h (Sarkar, 2002).

Un aspecto interesante de RU 486 es que presenta una farmacocinética no lineal, posiblemente debido a la saturación de la proteína del suero, alfa 1-glicoproteína ácida (AAG), principal encargada del transporte de RU 486 (Heikinheimo, 1990), las concentraciones séricas del compuesto se incrementan después de administrar dosis menores de 50 a 100 mg, pero no se incrementan a dosis de 100 a 800 mg (Heikinheimo y Kekkonen, 1993).

En cuanto al metabolismo de este compuesto, se ha demostrado que RU 486 es capaz de metabolizarse en preparaciones de microsomas del hígado de rata y humano (Lähteenmäki *et al.*, 1987). Los primeros pasos en su metabolismo son: desmetilaciones del anillo dimetilaminofenil del C_{11} e hidroxilación de la cadena 17-propinil para producir los metabolitos de RU 486 (Fig. 2): monodesmetilado (RU 42633), didesmetilado (RU 42848) e hidroxilado (RU 42698) (Heikinheimo, 1990),

siendo la CYP3A4, la principal enzima responsable del metabolismo de RU 486 (Heikinheimo *et al.*, 2003).

Los metabolitos de RU 486, también son capaces de unirse al PR, aunque con menor afinidad (del 20 al 50% respecto a la progesterona); sin embargo, es probable que en las acciones descritas para RU 486 también participen sus metabolitos (Lähteenmäki *et al.*, 1987), ya que estos alcanzan el pico máximo de su concentración plasmática de 2 a 4 h después de la administración de RU 486, presentando una farmacocinética lineal: a mayor dosis de administración de RU 486, mayor concentración sérica de los metabolitos (Heikinheimo *et al.*, 2003).

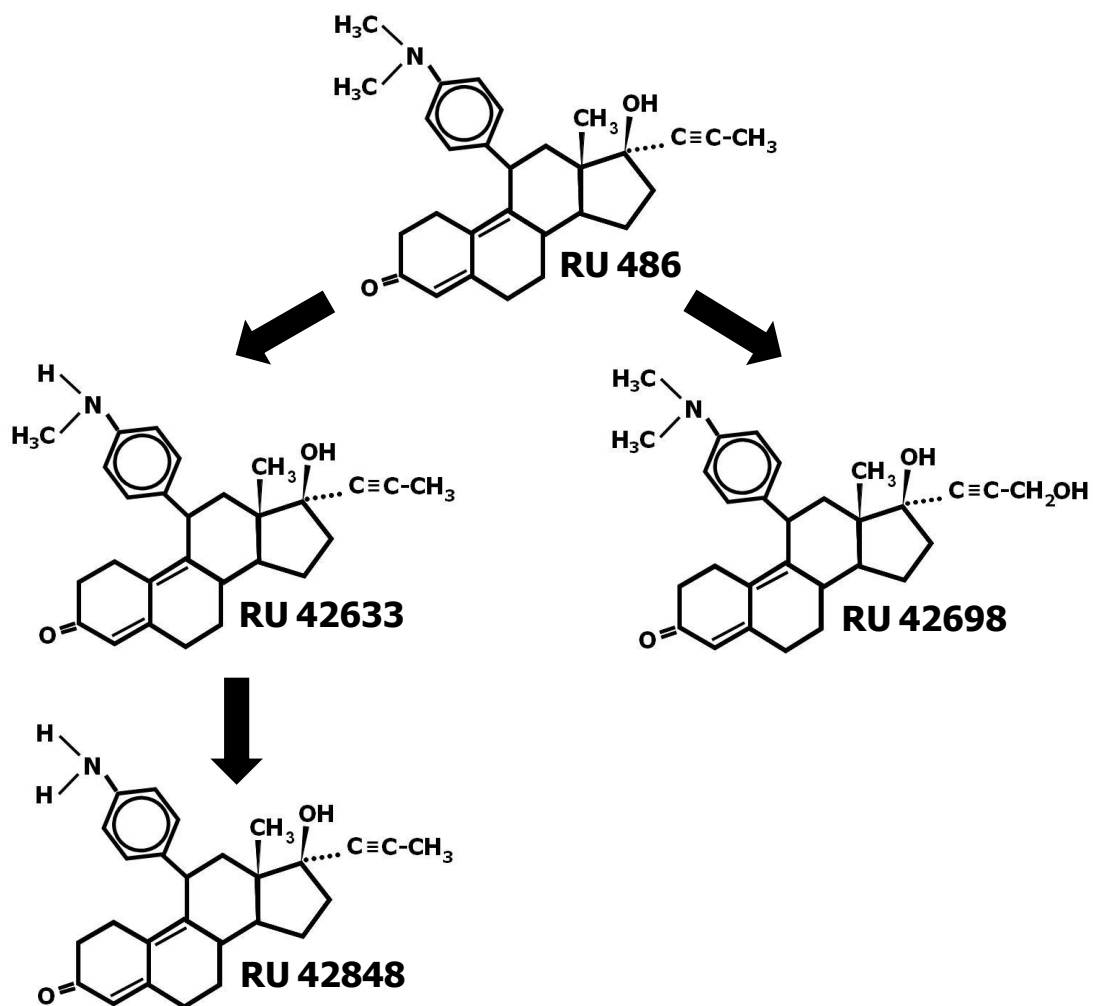


Fig. 2. Esquema del metabolismo de RU 486. Metabolitos; monodesmetilado (RU 42633), didesmetilado (RU 42848) e hidroxilado (RU 42698), modificado de Lähteenmäki *et al.*, 1987.

Finalmente, la excreción de RU 486 y sus metabolitos es principalmente a través del sistema biliar, poco es eliminado a través de los riñones. También RU 486 atraviesa la barrera placentaria, encontrándose una relación en la concentración de los niveles plasmáticos madre-feto de 9:1 (Goldberg *et al.*, 1998).

3. Mecanismo de acción de RU 486 para interrumpir el embarazo

En cuanto al mecanismo de acción de RU 486 para interrumpir el embarazo, este compuesto ejerce su acción como antiprogestina a través de su interacción con el PR, el cual presenta dos isoformas; PR_A y PR_B, las acciones de la progesterona dependen de la presencia del tipo de isoforma del PR en el tejido blanco. En el miometrio y endometrio, la progesterona actúa principalmente a través del PR_A y su acción sobre las glándulas mamarias es a través del PR_B (Gellersen *et al.*, 2009).

En este contexto, RU 486 ejerce su acción antiprogestacional a través del PR_A, pero en ausencia de la progesterona también es capaz de ejercer una acción agonista a través del PR_B (Spitz y Bardin, 1993; Spitz *et al.*, 1996) que puede ser mediada por: (1) regulación cruzada de AMPc (Beck *et al.*, 1993) o; (2) por el coactivador JDP-2 del dominio amino-terminal, que provoca la conformación activa requerida para la fosforilación de Serina400 y la posterior transcripción de genes (Wardell *et al.*, 2010).

En ausencia de ligando, el PR existe primariamente como monómero unido a proteínas de choque térmico hsp90, la unión de la progesterona a su receptor provoca;

la disociación de las hsp90 y la unión de dos monómeros (dimerización), la translocación de los dímeros al núcleo, fosforilación de proteínas, unión a secuencias de DNA específicas y la activación de la transcripción de genes blanco (Im y Appleman, 2010).

La unión de RU 486 al PR también induce disociación de las hsp90, dimerización del receptor y translocación del complejo RU 486-PR al núcleo. El DNA unido al complejo progesterona-PR es idéntico en el complejo RU 486-PR, pero debido a que el RU 486 forma contactos con residuos de aminoácidos unidos al dominio terminal C del PR, el complejo asume una estructura tridimensional diferente a la adquirida con la progesterona, que no le permite unirse a proteínas transcripcionales coactivadoras, por el contrario recluta proteínas correpresoras como NCoR y SMRT, por lo tanto no se desencadena la transcripción de genes (Im y Appleman, 2010) (Fig. 3).

Por lo anterior, RU 486 inhibe las diversas acciones fisiológicas de la progesterona que permiten la implantación y mantenimiento del embarazo, como son: maduración y desarrollo endometrial, transformación del endometrio de la fase proliferativa a la fase secretoria; alteración de los potenciales eléctricos de las células del miometrio, evitando así la estimulación de la contractilidad uterina; inhibición de la ciclooxigenasa II, evitando la síntesis de PGs; e insensibilidad del miometrio al efecto de uterotónicos, como oxitocina (Oxy) y PGs (Espinoza *et al.*, 2002).

Así, las acciones de RU 486 son resultado de la regulación negativa de genes dependientes de la progesterona, siendo capaz este antagonista de interrumpir el

embarazo al inducir necrosis decidual (Johannisson *et al.*, 1989); revirtiendo la hiperpolarización de la membrana celular inducida por la progesterona, promoviendo la formación de uniones *gap* (Garfield *et al.*, 1988; Chwalisz *et al.*, 1991); incrementando la concentración de PGs deciduales por reducir la actividad de la PG deshidrogenasa (Norman *et al.*, 1991a), sensibilizando al miometrio al efecto contráctil de las PGs (Swahn y Bygdeman, 1988) y provocando maduración y dilatación del cérvix (Rådestad *et al.*, 1988; World Health Organization, 1994) (Fig. 3).

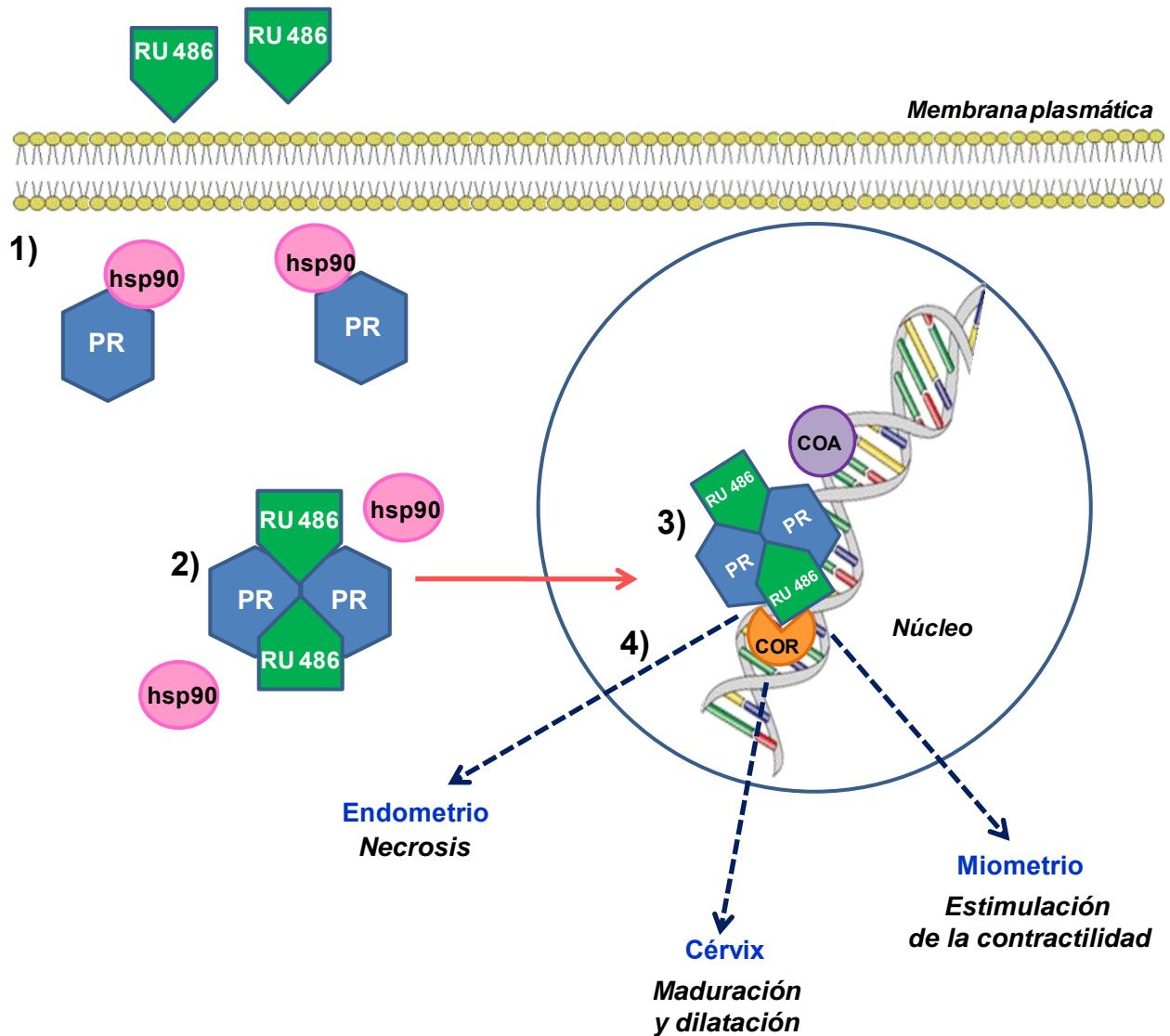


Fig. 3. Mecanismo de acción de RU 486 para interrumpir el embarazo. 1) En ausencia de ligando, el receptor de progesterona (PR) se encuentra en forma de monómero unido a proteínas de choque térmico hsp90; 2) La unión de RU 486 al PR, promueve la disociación de las hsp90 e induce la dimerización del PR; 3) El complejo RU 486-PR se transloca al núcleo y se une al DNA, pero a diferencia del complejo progesterona-PR, no es capaz de unirse a proteínas coactivadoras (COA), por el contrario se une a proteínas correpressoras (COR) como NCoR y SMRT; 4) La transcripción no se lleva a cabo y por lo tanto no se expresan diversos genes regulados por la progesterona, como resultado del bloqueo de la progesterona, se inducen diversas acciones biológicas en el endometrio, cérvix y miometrio, que promueven la interrupción del embarazo.

4. Efecto de RU 486 sobre la contractilidad uterina

Cinco años después de la síntesis de RU 486, Bygdeman y Swahn (1985) mostraron que el tratamiento con RU 486 incrementaba la contractilidad del útero gestante y aumentaba la sensibilidad del miometrio a la acción de las PGs, pero no a la acción de Oxy (Swahn y Bygdeman, 1988). A este respecto, Norman y colaboradores (1991) reportaron que misoprostol provoca un efecto excitador sobre la contracción uterina, que era potenciado después del pretratamiento con RU 486 (Norman *et al.*, 1991b).

Por otra parte, estudios experimentales *in vivo* han mostrado que RU 486 estimula la contractilidad uterina, siendo capaz de inducir el parto en ratas preñadas al término de la gestación (Ikuta *et al.*, 1991; Zhao y Sherwood, 2004). En útero de rata a mitad de la gestación, RU 486 provocó un incremento en la actividad eléctrica miometrial 3 h después de su administración (Bouftila y Clabaut, 2001). En contraste, se ha documentado que en el mono Rhesus gestante a término, RU 486 provoca una disminución transitoria de la actividad contráctil y 8 h después del tratamiento, produce un incremento progresivo de la contractilidad uterina, con contracciones de mayor duración y amplitud, pero menor frecuencia, siendo el patrón de las contracciones irregular e insuficiente para inducir el parto (Haluska *et al.*, 1987). Otro estudio realizado en primates no humanos, reporta que RU 486 induce ligeras contracciones, las cuales son insuficientes para inducir el parto (Wolf *et al.*, 1989).

Un estudio en mujeres con embarazos prolongados (≥ 41 semanas de gestación), señala que RU 486 es capaz de inducir maduración cervical y reducir la duración del trabajo de parto, pero no fue capaz de reducir la tasa de cesáreas, es decir, no desencadenó el parto (Giacalone *et al.*, 1998). Por otra parte, el tratamiento con RU 486 en mujeres con operación cesárea previa o con embarazo prolongado, induce maduración cervical, reduciendo las dosis requeridas de clásicos agentes uterotónicos (Oxy o misoprostol) utilizados para inducir el parto (Lelaidier *et al.*, 1994; Wing *et al.*, 2000). En embarazo a término, otro estudio reporta que RU 486 no es un buen inductor del parto, siendo capaz de inducir el trabajo de parto, pero no acorta su duración, lo cual facilita muy poco el proceso del parto (Stenlund *et al.*, 1999).

La ineficiencia de RU 486 para inducir el parto promoviendo contracciones uterinas está también apoyada por un estudio *in vitro*, donde se muestra, por primera vez, que RU 486 era capaz de inhibir la contractilidad espontánea del útero no gestante de la rata, en este estudio se indicó que la rápida acción de RU 486 no podía involucrar una acción de tipo genómico (Perusquía y Kubli Garfias, 1994). Posteriormente, Parra y colaboradores (2000) reportan que RU 486 también podía inhibir contracciones uterinas inducidas por KCl en la rata y además señalan que los bloqueadores de la transcripción y síntesis de proteínas no eran capaces de inhibir el efecto útero relajante inducido por RU 486, caracterizando el mecanismo por el cual RU 486 inducía relajación uterina como de tipo no genómico, donde el GMPc podría estar involucrado (Parra *et al.*, 2000).

En otros estudios *in vitro*, con tiras de miometrio humano no gestante, RU 486 provocó una disminución en la frecuencia, pero incrementó la amplitud y duración de las

contracciones (Lobaccaro-Henri *et al.*, 1992), observándose un decremento en la liberación de la PGI₂ (Lobaccaro-Henri *et al.*, 1996); en estos trabajos se sugirió que RU 486 podría estar actuando como inhibidor de la movilización de calcio intracelular. Sin embargo, es importante señalar que no existen reportes sobre el efecto directo de RU 486 en el miometrio humano gestante; condición fisiológica en la cual es utilizado este compuesto con la finalidad de interrumpir el embarazo o para desencadenar el trabajo de parto.

Es importante destacar que debido a que esta antiprogestina es un esteroide sintético con la estructura básica esteroidal, también podría producir los efectos no genómicos de esta familia de hormonas. Así, es fundamental considerar que las hormonas esteroides pueden actuar por dos diferentes vías de acción: la vía genómica y la vía no genómica.

La vía genómica involucra la unión de los esteroides con su receptor intracelular y subsecuentemente la transcripción es iniciada con efectos positivos o negativos sobre la expresión de genes blanco (Beato y Klung, 2000; Heinlein y Chang, 2002). La considerable latencia de los efectos genómicos de los esteroides es la consecuencia de pasos que se consumen a lo largo del tiempo (> 30 min) para su acción, caracterizados por su retraso específico y una alta sensibilidad hacia los inhibidores de la transcripción (actinomicina D) y síntesis de proteínas (cicloheximida), así como su sensibilidad al bloqueo por antihormonas (Bygdeman *et al.*, 2000).

En marcado contraste, la vía no genómica incluye efectos caracterizados por: 1) su rápido inicio de acción (de segundos a minutos); 2) su insensibilidad a inhibidores de

la transcripción y síntesis de proteínas; 3) por no ser bloqueados por antihormonas; y 4) los efectos son producidos aún sin tener acceso al núcleo (ligandos unidos en forma covalente a macromoléculas impermeables a la membrana o que actúan en células que carecen de núcleo) (Falkenstein *et al.*, 2000a; 2000b; Coleman y Smith, 2001; Losel y Wehling, 2003).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

RU 486 es una potente antiprogestina utilizada en diversos países para la interrupción del embarazo. Este compuesto comparte la estructura molecular básica de todas las hormonas esteroides y como resultado de su estructura, la progesterona y otras progestinas, así como varios andrógenos pueden relajar la contracción uterina de la rata (Perusquía, 2001) y el humano (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001; Perusquía *et al.*, 2005) por una acción no mediada por el genoma, llamada acción extragenómica o no genómica. Además, existe la evidencia directa de que RU 486 es capaz de relajar el útero aislado de la rata (Perusquía y Kubli Garfias, 1994; Parra *et al.*, 2000).

Con estas bases, es pertinente proponer que además del conocido efecto que RU 486 ejerce como antihormona, este compuesto podría inducir acciones de tipo no genómico con relevancia en la función miometrial 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 RU 486 sobre la contractilidad del miometrio humano gestante, el presente proyecto pretende evaluar el efecto directo de RU 486 sobre la actividad contráctil espontánea e inducida por Oxy, PGs y una solución de potasio alto (KCl 40 mM) e indagar acerca de su mecanismo de acción.

III. HIPÓTESIS

Debido a que RU 486 comparte la estructura básica de todas las hormonas esteroideas, se espera que también participe en acciones de tipo no genómico que antecedan a su acción genómica; provocando una rápida disminución de la contractilidad uterina humana.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el efecto de RU 486 sobre la actividad contráctil espontánea e inducida por Oxy, PGs y KCl en el miometrio humano gestante a término, para esclarecer de qué manera podría estar modulando la contractilidad uterina y relacionar dicha acción con su uso clínico para interrumpir el embarazo.

Objetivos específicos:

1) Evaluar el efecto de RU 486 a diferentes concentraciones (0.1-100 μ M) sobre la contractilidad uterina espontánea.

2) Comparar el potencial efecto relajante inducido por RU 486 con el efecto relajante inducido por la progesterona sobre contracciones uterinas espontáneas, determinando el posible antagonismo, sinergismo o potenciación del efecto antiuterotónico de la progesterona en presencia de RU 486.

3) Evaluar y comparar el efecto de RU 486 en contracciones espontáneas e inducidas por Oxy, PGs (PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ y misoprostol) y KCl.

4) Determinar la participación del genoma, en el potencial efecto relajante inducido por RU 486, utilizando inhibidores de la transcripción (actinomicina D) y de la síntesis de proteínas (cicloheximida).

5) Explorar el mecanismo de la potencial acción relajante de RU 486 al evaluar su posible acción calcio antagónica.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención y manejo de las muestras uterinas

El presente estudio fue aprobado por la Comisión de Bioética para Investigación en Humanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Anexo 2). Las muestras uterinas de humano fueron obtenidas (previo consentimiento informado) de mujeres sanas con embarazo a término de 37 a 40 semanas de gestación sometidas a operación cesárea por indicación médica, sin aplicación previa de medicamentos útero-relajantes o útero-tónicos, sin manifestaciones clínicas de trabajo de parto y con integridad de membranas corioamnióticas.

La biopsia miometrial de aproximadamente 3.0 X 1.0 X 1.0 cm fue tomada realizando un corte transversal en la región media del segmento durante el procedimiento quirúrgico e inmediatamente fue colocada en solución Hartmann (Baxter de México) a 4°C, para ser transportada de los diferentes hospitales donde fue colectada (Dalinde, Ángeles México, Metropolitano, etc.) al laboratorio (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), donde se realizó un recambio de la solución Hartmann y la muestra se mantuvo en refrigeración (4°C) durante 24 y 48 h antes de su procesamiento.

El día del experimento, la muestra uterina fue colocada en una caja de Petri de doble pared, que contenía solución Ringer Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): NaHCO₃ (25), NaCl (119), KCl (4.6), KH₂PO₄ (1.2), MgSO₄ (1.2),

CaCl₂ (1.5) y glucosa (12). La solución Ringer se mantuvo a una temperatura de 37°C y el pH fue estabilizado previamente y mantenido a 7.4, mediante el burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 5% de CO₂ en 95% de O₂. El miometrio se dividió en segmentos de aproximadamente 1.0 x 0.5 x 0.5 cm cada uno, cortados a lo largo de las fibras musculares longitudinales

2. Sistema de registro isométrico para tejido aislado

Para realizar este estudio, se utilizó un sistema de registro isométrico para tejido aislado. Los segmentos miometriales fueron colocados en cámaras de incubación con 10 ml de la solución Ringer Krebs-Henseleit, con burbujeo constante de la mezcla gaseosa O₂/CO₂, y temperatura controlada, mediante un baño recirculador, a 37°C. Cada segmento miometrial fue sujetado 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, Quincy, MA), el cual recibió las señales mecánicas del tejido y posteriormente las envió a un polígrafo (Grass Instruments, modelo 79, Quincy, MA) de 4 canales, que a su vez estaba acoplado a una computadora con el sistema de captura analógico/digital polyView 2.5, ADM-20002 (Grass Instruments Division/Astro-Med Inc, West Warwick, RI) (Fig. 4). Los tejidos en cada cámara de incubación fueron sometidos a una fuerza de tensión de 10 mN (1 g de tensión) durante todo el experimento.

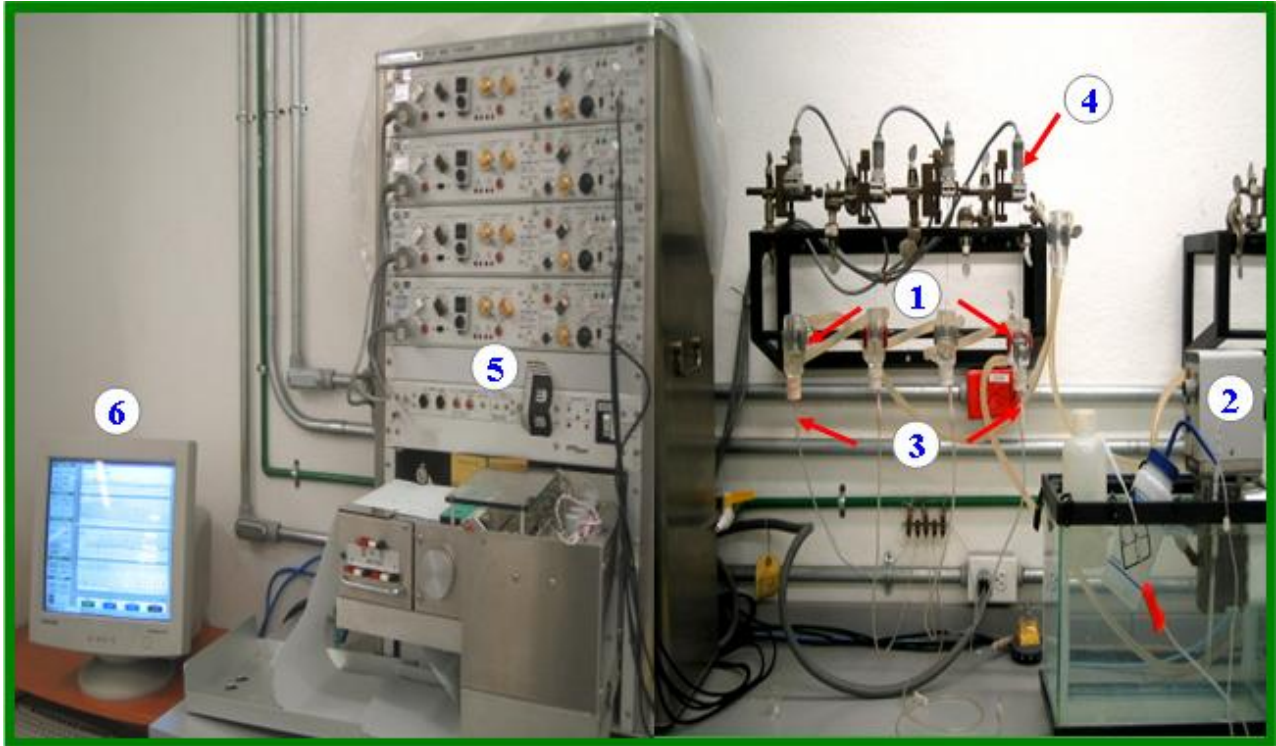


Fig. 4. Sistema de registro isométrico para tejido aislado: 1) cámaras de incubación, 2) baño recirculador para mantener la temperatura constante a 37° C, 3) suministro de la mezcla O₂/CO₂ para mantener el pH a 7.4, 4) transductor de tensión, 5) polígrafo y 6) computadora con convertidor analógico digital.

3. Diseño experimental

Después de tensionar el tejido y antes de iniciar cada uno de los experimentos (para cada protocolo experimental), los tejidos permanecieron en las cámaras de incubación un periodo de 60 a 90 min para permitir su adaptación a las condiciones *in vitro* (periodo de estabilización).

3.1 Determinación del efecto inducido por RU 486 sobre la actividad contráctil espontánea del miometrio humano gestante a término

En este estudio sólo se utilizaron segmentos miometriales con contracciones espontáneas de amplitud >1 g y frecuencia >1 contracción cada 7 min. Después del periodo de estabilización, se seleccionaron los segmentos miometriales que presentaran un patrón de actividad constante, es decir, sin modificación de la amplitud y la frecuencia de las contracciones, se registró la actividad contráctil durante 30 min (tiempo control) y posteriormente (con base al intervalo de concentración en el que ha sido reportado que progestinas y andrógenos ejercen relajación del miometrio humano gestante), se adicionó RU 486 a diferentes concentraciones (0.1, 1.0, 10 y 100 μM), de manera independiente y en forma no acumulativa y el efecto fue registrado durante 30, 60 y 90 min. Con los datos obtenidos, se construyó la curva concentración-respuesta del compuesto a 30 min y el curso temporal para cada concentración. Cada concentración fue ensayada de manera independiente y por lo menos 6 veces en muestras de diferentes pacientes. Una vez transcurrido el tiempo en el que se registró

el efecto, se realizaron tres recambios de la solución Ringer (lavados), para retirar el compuesto y observar la recuperación del tejido.

El compuesto fue previamente disuelto en etanol absoluto (ETOH), en un volumen de 10 μ l en la cámara de incubación de 10 ml, lo cual corresponde a un volumen final de 0.1% v/v en la cámara de incubación para cada una de las concentraciones, la concentración de 100 μ M fue la concentración máxima para su solubilidad en 0.1% de ETOH. El efecto del vehículo fue evaluado en experimentos por separado.

En otros experimentos, se exploró el efecto de RU 486 a mayor concentración, 500 μ M, pero debido a las propiedades hidrofóbicas del compuesto, las cuales limitan su solubilidad, fue necesario la adición acumulativa de RU 486 (5 adiciones de 100 μ M, una cada 5 min). El efecto del volumen final de vehículo adicionado (5 adiciones de 0.1%, una cada 5 min; ETOH 0.5 %), fue evaluado en experimentos independientes.

3.2 Determinación y comparación del efecto inducido por RU 486 y progesterona sobre la contracción espontánea del miometrio humano gestante a término

En otra serie de experimentos, con el objeto de comparar el efecto de RU 486 y progesterona sobre la actividad contráctil uterina espontánea, después del periodo de tensión y una vez transcurrido el periodo de estabilización, se consideraron 30 min de la actividad como control y se adicionó progesterona 100 μ M, el efecto fue evaluado a 30,

60 y 90 min y fue comparado con el efecto inducido por RU 486 a la concentración equimolecular de 100 μ M, a los mismos tiempos de evaluación.

Además, se determinó el posible antagonismo de RU 486 sobre el efecto relajante inducido por la progesterona, para lo cual el tejido fue preincubado con RU 486 100 μ M durante 30 min y posteriormente se adicionó progesterona 100 μ M, evaluando su efecto a los 30 min. El efecto de progesterona fue comparado en ausencia y presencia de RU 486. De manera similar, los tejidos fueron preincubados durante 30 min con 100 μ M de progesterona y posteriormente se adicionó RU 486 y se evaluó el efecto a los 30 min, el efecto de RU 486 fue comparado en ausencia y presencia de la progesterona. Paralelamente se hicieron los ensayos pertinentes con 0.1% de ETOH; vehículo en el cual se disolvieron los compuestos de prueba (RU 486 o progesterona).

3.3 Determinación del efecto de RU 486 sobre contracciones inducidas por diferentes agentes uterotónicos en el miometrio humano gestante a término

a) Contracciones inducidas por oxitocina y prostaglandinas

Después del periodo de tensión y estabilización del tejido, se adicionó en diferentes cámaras con segmentos miometriales que presentaron escasa actividad contráctil, 100 nM de Oxy y una vez que la actividad contráctil inducida se estabilizó, es decir que presentó un patrón de actividad constante, se consideraron 30 min de la actividad contráctil como control (100%) y posteriormente se adicionó RU 486 (0.1-100

μM) en forma independiente y de manera no acumulativa y la respuesta fue registrada durante 30 min (debido a que el efecto de la Oxy es transitorio).

Para comparar la sensibilidad de la contracción inducida por Oxy con la sensibilidad de respuestas inducidas con PGs al efecto relajante inducido por RU 486, en tiras miométriales con un patrón de actividad espontánea constante, se adicionó 1 μM de diferentes PGs, dos naturales ($\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2) y una sintética (misoprostol) cada una por separado. Después de que la actividad inducida por cada agente uterotónico presentó un patrón de actividad constante, se consideraron 30 min de la actividad como control y se adicionó 100 μM de RU 486, el efecto fue evaluado a 30, 60 y 90 min, cada respuesta fue comparada con el control (100%) y expresada en términos del porcentaje de modificación de la respuesta control. Después de transcurrido el tiempo de registro del efecto, 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, después del periodo de tensión y estabilización, en tiras que presentaron contracciones espontáneas con un patrón de actividad constante, se consideraron 30 min de la actividad como control y posteriormente se adicionó 100 μM de RU 486 y 30 min después, se adicionó por separado 1 μM de cada una de las PGs utilizadas ($\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 y misoprostol). El efecto de cada PG previo tratamiento con RU 486 fue evaluado a los 90 min.

b) Contracción inducida por KCl

En otras preparaciones, se procedió a despolarizar al tejido haciendo un recambio de la solución Ringer Krebs-Henseleit por una solución Ringer alta en potasio (KCl 40 mM), la cual fue preparada a partir de la solución Ringer Krebs-Henseleit por sustitución equimolecular de KCl (40 mM) por NaCl (84 mM). La solución de KCl 40 mM produjo una contracción tónica sostenida, que fue registrada durante 5 min (preestímulo), posteriormente el tejido fue repolarizado; cambiando la solución de KCl por Ringer Krebs-Henseleit en su composición original (lavado) y se dejó reposar al tejido 5 min para posteriormente realizar otros dos preestímulos. Después de realizados tres preestímulos, se dejó reposar al tejido durante 30 min antes de inducir una nueva contracción con KCl, la cual se mantuvo durante ~120 min (respuesta control), después de este periodo, se dejó reposar al tejido durante 30 min antes de un segundo estímulo con KCl y, una vez que se alcanzó la amplitud máxima y el tono se mantuvo estable, se adicionó por separado RU 486 100 ó 500 μM (5 adiciones acumulativas de 100 μM de RU 486, una cada 5 min) y el efecto fue evaluado a 30, 60 y 90 min. Posteriormente se realizó un lavado para repolarizar al tejido y retirar al compuesto, 60 min después se provocó un tercer estímulo con KCl para verificar la viabilidad del tejido y la recuperación de la contracción.

Bajo las mismas condiciones experimentales, se evaluó el efecto de 100 μM de progesterona previo tratamiento con 100 nM de Oxy, 1 μM de PGE₂, PGF_{2 α} , misoprostol y KCl (40 mM) para comparar la eficacia de la progesterona y de RU 486.

c) Eficacia de RU 486

La eficacia de RU 486, expresada como $R_{m\acute{a}x}$ (relajaci3n máxima a 100 μM) fue comparada en los diferentes agentes uterot3nicos utilizados (Oxy, PGs y KCl) respecto a la $R_{m\acute{a}x}$ de RU 486 sobre la contracci3n espontánea. Tambi3n se compar3 la $R_{m\acute{a}x}$ de RU 486 y progesterona sobre la contracci3n espontánea e inducida por los diferentes agentes uterot3nicos empleados en este estudio.

3.4 Exploraci3n del mecanismo de acci3n del efecto relajante inducido por RU 486 en el miometrio humano gestante a t3rmino

Para determinar el mecanismo de acci3n del efecto relajante inducido por RU 486, en diferentes segmentos miometriales, despu3s del periodo de tensi3n y estabilizaci3n, se realizaron tres preestímulos con KCl y despu3s de 30 min, nuevamente se provoc3 una contracci3n t3nica sostenida con KCl, la cual fue mantenida durante ~140 min (respuesta control) y se realiz3 un lavado, despu3s de 30 min, se provoc3 otra contracci3n con KCl y, cuando la contracci3n alcanz3 su punto máximo, en algunos tejidos se adicion3 el inhibidor de la transcripci3n (actinomicina D, 10 μM) y en otros el inhibidor de síntesis de proteínas (cicloheximida, 40 μM), 30 min despu3s, se adicion3 100 μM de RU 486. Con este tratamiento el efecto de RU 486 fue evaluado a 90 min. Así, el efecto relajante inducido por RU 486 fue comparado en presencia y ausencia de los inhibidores de la transcripci3n y síntesis de proteínas.

3.5 Potencial antagonismo de RU 486 sobre los canales de calcio

En otros experimentos, se evaluó el efecto de RU 486 en tiras de miometrio despolarizadas con una solución KCl 40 mM modificada por la adición de 2 mM de EGTA y libre de calcio ($\text{KCl}\emptyset\text{Ca}^{2+}$), induciendo una contracción fásica. Una vez que el tejido alcanzó su condición basal, se provocó una contracción con 2.5 mM de CaCl_2 , la cual se mantuvo durante ~30 min (hasta que alcanzó su máxima amplitud), posteriormente se realizaron tres recambios (lavados) con la solución $\text{KCl}\emptyset\text{Ca}^{2+}$. En estas condiciones el tejido reposó durante 20 min y posteriormente se adicionó 100 μM de RU 486, 10 min después se provocó una segunda contracción con 2.5 mM de CaCl_2 , esta respuesta fue registrada durante ~30 min y se realizaron tres lavados, a los 10 min nuevamente se realizaron tres lavados para retirar completamente el compuesto del tejido. Finalmente, se dejó reposar al tejido durante 60 min para provocar una tercera contracción con 2.5 mM de CaCl_2 para observar la viabilidad y recuperación del tejido.

Bajo las mismas condiciones experimentales y en preparaciones independientes, el efecto del vehículo (ETOH 0.1%), fue determinado sobre la contracción inducida con 2.5 mM de CaCl_2 en tejidos despolarizados.

4. Procesamiento de los datos

Los datos fueron monitoreados en tiempo real, evaluando el área bajo la curva de la actividad contráctil, mediante el programa de captura de señales biológicas polyView 2.5, ADM-20002 (Grass Instruments Division/Astro-Med Inc, West Warwick, RI). Los valores fueron reportados en términos de porcentaje de relajación con respecto al control, el cual fue considerado como 100%. En el caso de las contracciones inducidas con 2.5 mM de CaCl₂, el efecto se evaluó en términos de la diferencia en la amplitud máxima de las contracciones antes y después del tratamiento con RU 486.

Todas las comparaciones estadísticas fueron realizadas con la prueba t de *Student* no pareada, considerando valores significativamente diferentes cuando $p < 0.05$.

Cada dato representa la media de 6 experimentos \pm error estándar de la media (E.E.M.) donde cada “n” representa una paciente.

5. Compuestos utilizados

Los compuestos utilizados en este estudio fueron:

RU 486 (11 β -(4-dimetilamino)fenil-17 β -hidroxi-)-17 α -(1-propinil)estra-4,9-dien-3-ona), progesterona (4-pregnen-3,20-diona), prostaglandina E₂ (PGE₂; ácido (5Z,11 α ,13E,15S)-11,15-dihidroxi-9-oxoprostano-5,13-dienoico), prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α} ; ácido (5Z,9 α ,11 α ,13E,15S)-9,11,15-trihidroxi-9-oxoprostano-5,13-dienoico sal tris), misoprostol (ácido (11 α ,13E)-11,16-dihidroxi-16-metil-9-oxoprostano-13-en-1-oico metil ester), oxitocina (Oxy; Syntocinon), actinomicina D (Dactinomicina) y cicloheximida (3-[2-(3,5-dimetil-2-oxociclohexil-2-hidroxietil)]glutarimida).

La oxitocina (Oxy) fue adquirida en Novartis Farmacéutica México, S.A. de C.V., y fue disuelta en agua bidestilada. El resto de los compuestos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. St. Louis MO., USA., y fueron disueltos en etanol absoluto (ETOH) (Merck, México, S.A.); adicionados en 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

1. Efecto relajante de RU 486 sobre la actividad contráctil espontánea del miometrio humano gestante a término

El volumen del vehículo en el cual fue disuelto el RU 486 (ETOH 0.1%), no modificó de forma significativa ($p > 0.05$) la contractilidad espontánea del miometrio humano gestante a término (4.6 ± 1.5 % a 90 min). De forma contrastante, RU 486 en el intervalo de concentraciones probadas (0.1-100 μ M), provocó un efecto relajante significativo ($p < 0.05$) respecto al efecto inducido por el vehículo, el cual fue observado en forma inmediata (~ 3 min) después de la adición del compuesto, como una disminución en la amplitud de las contracciones uterinas a todas las concentraciones probadas. La relajación inducida por el compuesto fue más evidente a mayor tiempo de exposición. A las concentraciones de 10 y 100 μ M, además de la disminución en la amplitud, también se observó un ligero incremento en la frecuencia de las contracciones. Sin embargo, la evaluación global (área bajo la curva) mostró un efecto inhibitorio de la actividad contráctil, es decir, relajación uterina (Fig. 5).

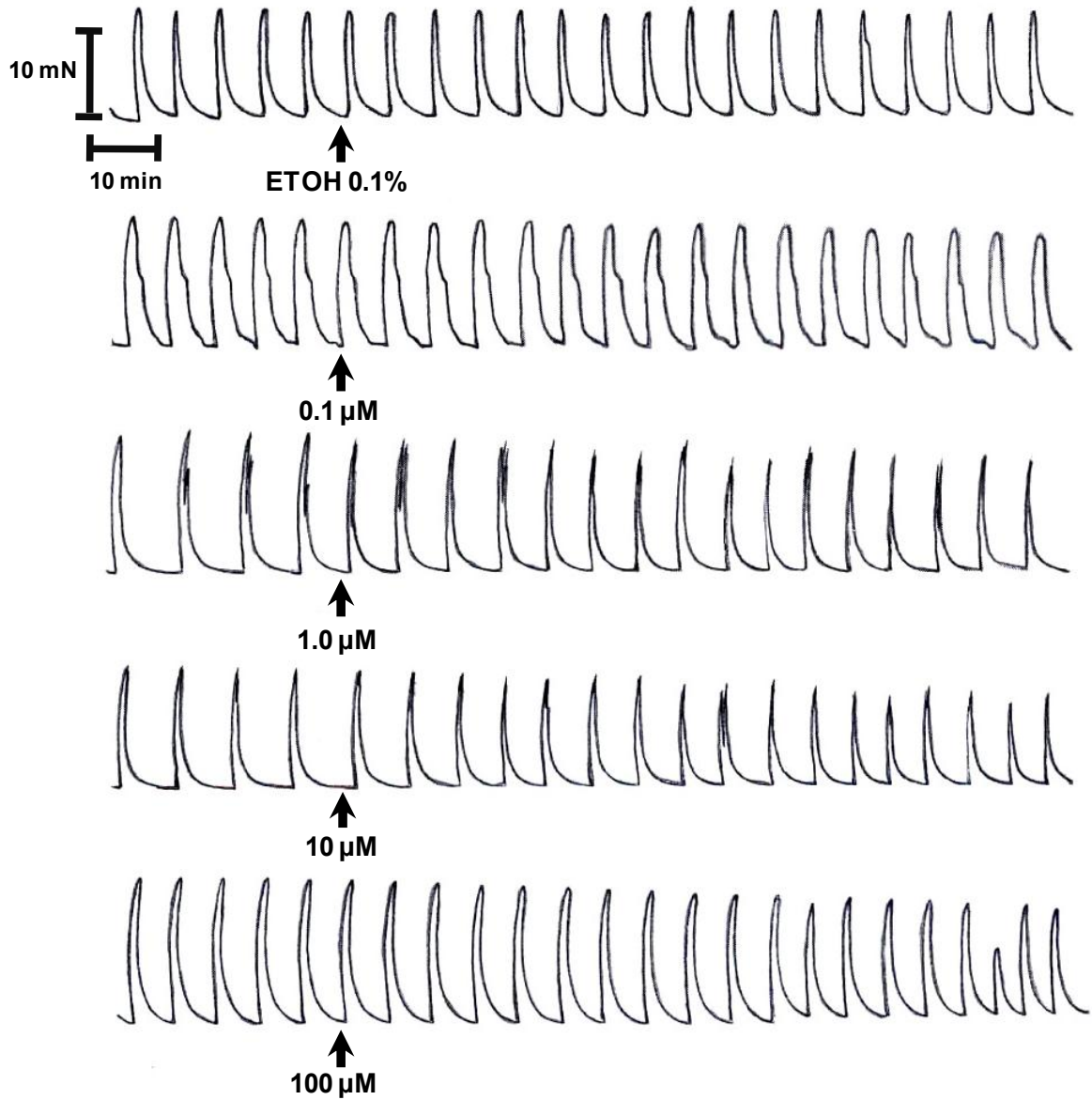


Fig. 5. Registros típicos de la actividad contráctil espontánea del miometrio humano gestante a término, donde se muestra el efecto relajante inducido por RU 486 a diferentes concentraciones. Nótese que el vehículo (ETOH 0.1%) en el cual RU 486 fue disuelto, no modificó la actividad contráctil uterina.

La relajación uterina inducida por RU 486, a las diferentes concentraciones probadas, evaluada a los 30 min, no mostró un comportamiento dependiente de la concentración, ya que no fue mayor al incrementarse la concentración (Fig. 6).

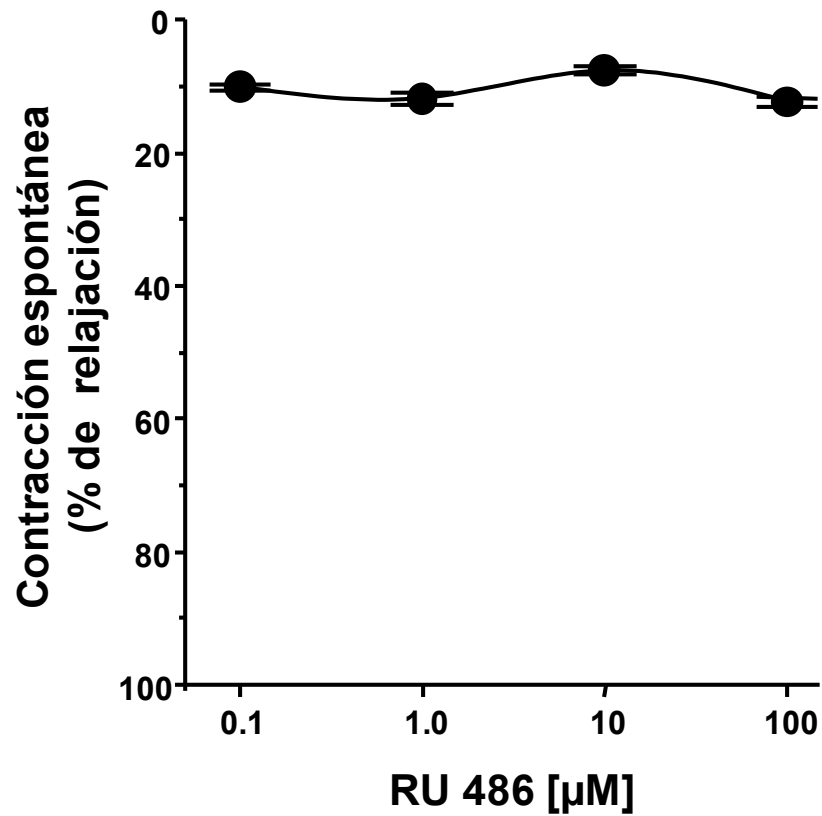


Fig. 6. Curva concentración-respuesta del efecto de RU 486 (a 30 min) sobre la contracción espontánea del miometrio humano gestante a término. Cada punto representa $n = 6 \pm \text{E.E.M.}$

Como se observa en la Fig. 6, RU 486 a la máxima concentración probada (100 μM) provocó sólo 12% de relajación uterina a los 30 min de su adición. Por lo tanto no fue posible hacer un ajuste de la curva por regresión lineal para obtener la concentración inhibitoria media (CI_{50}) y calcular la potencia del compuesto. Sin embargo, es importante hacer notar que a mayor tiempo de exposición del tejido al RU 486 (60 y 90 min), mayor relajación fue observada, lo cual fue más evidente a las concentraciones de 10 y 100 μM (Tabla 2 y Fig.7), demostrándose que la relajación inducida por RU 486 fue dependiente del tiempo.

| Tabla 2. Porcentajes de relajación inducidos por RU 486 a diferentes concentraciones sobre la contracción espontánea del miometrio humano gestante a término | | | | |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Tiempo (min) | 0.1 μM | 1.0 μM | 10 μM | 100 μM |
| 30 | 10.18 \pm 0.41 | 11.84 \pm 1.02 | 7.64 \pm 0.69 | 12.34 \pm 0.66 |
| 60 | 12.73 \pm 1.63 | 17.85 \pm 0.90* | 16.51 \pm 0.62** | 25.30 \pm 1.68** |
| 90 | 21.21 \pm 1.48** | 18.72 \pm 1.57* | 23.27 \pm 0.91*** | 43.51 \pm 2.02*** |

Cada valor representa la media de $n=6 \pm \text{E.E.M.}$ Diferencias significativas al comparar el efecto a 60 y 90 min vs. el efecto a 30 min (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$).

Además, se observó que la relajación inducida por la concentración aditiva de 500 μM de RU 486, no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) respecto a la relajación inducida por 100 μM de RU 486 a 30, 60 y 90 min (Fig. 7B). Sin embargo, la relajación inducida por 500 μM de RU 486, fue significativamente diferente respecto al efecto del vehículo en el cual fue disuelto y aplicado (ETOH, 0.5%), el cual provocó 6.82 ± 1.5 % de relajación a 90 min.

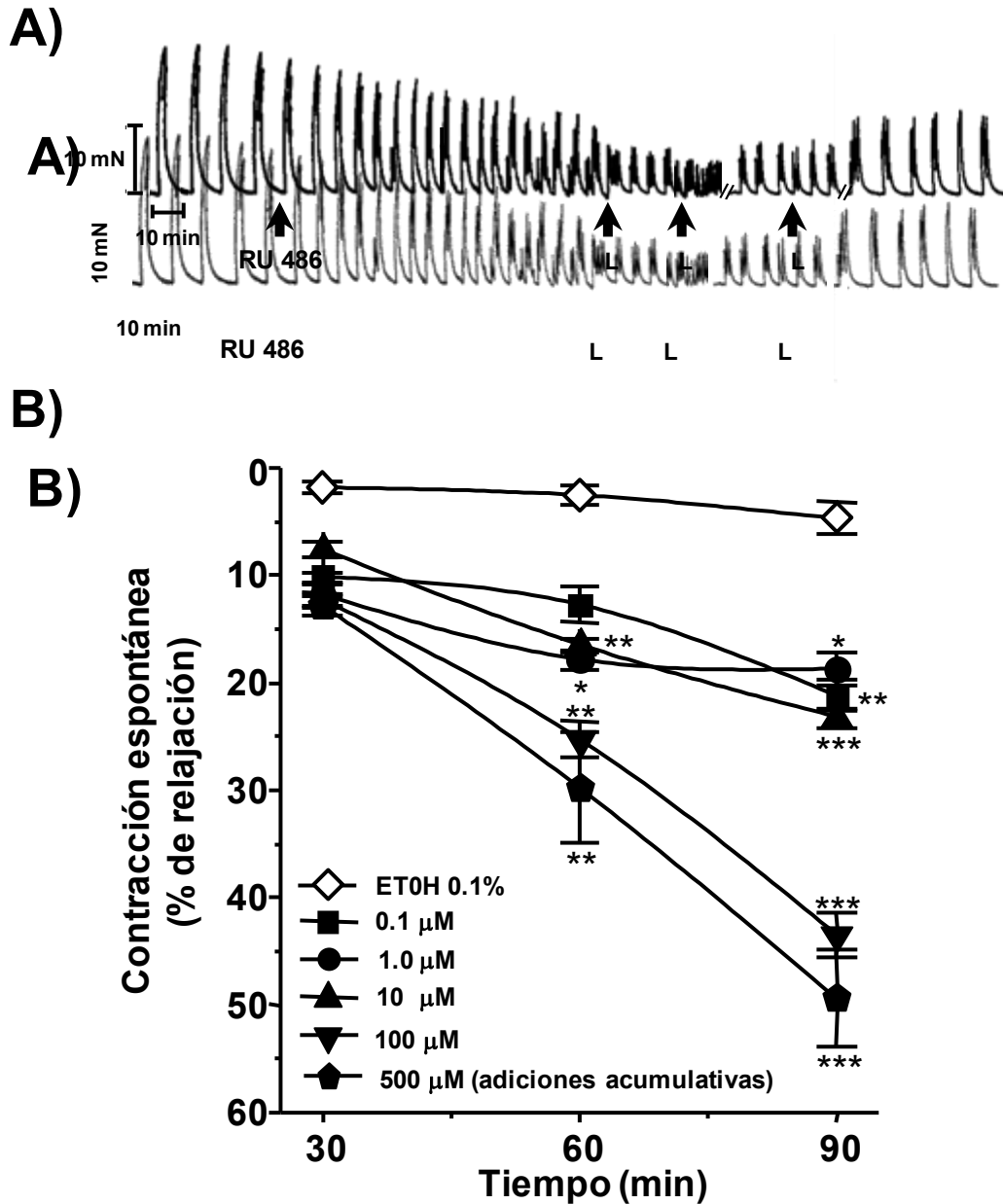


Fig. 7. Efecto relajante de RU 486 sobre la actividad contráctil espontánea del miometrio humano gestante a término. A) Registro típico de la actividad contráctil espontánea donde se muestra el rápido efecto relajante inducido por RU 486 100 μM; nótese la recuperación de la actividad contráctil después de los lavados (L), mostrando que el efecto inducido por RU 486 es reversible. B) Curso temporal del efecto relajante inducido por RU 486 a las diferentes concentraciones evaluadas hasta 90 min sobre la contractilidad espontánea. Diferencias significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$) vs. el efecto inducido a 30 min. Cada concentración probada de RU 486 fue significativamente diferente ($p < 0.0005$) cuando se comparó con el vehículo (ETOH 0.1%). El efecto inducido a 100 μM no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) al compararlo con el efecto a 500 μM. Cada símbolo en la gráfica representa la media \pm E.E.M. de 6 experimentos independientes.

Después de transcurrido el tiempo de exposición del tejido a RU 486, se realizaron varios lavados para retirar el compuesto del tejido, con la finalidad de determinar si el efecto relajante inducido por RU 486 era reversible. Como se muestra en la Fig. 7A, al retirar el compuesto del tejido, se observó una recuperación de la actividad contráctil, la cual fue variable en cada experimento, dependiendo de la concentración de RU 486, el número de lavados y el tiempo de estabilización del tejido.

Las características del efecto relajante inducido por RU 486; observado en forma rápida (detectable en ~3 min) y reversible, son evidencias de un mecanismo no genómico independiente a los receptores intracelulares a progesterona.

2. Comparación del efecto relajante inducido por RU 486 y progesterona sobre la contracción espontánea del miometrio humano gestante a término

Los resultados mostraron que a 30 min de evaluación, la relajación uterina inducida por 100 μ M de progesterona, no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) a la relajación uterina inducida por 100 μ M de RU 486 (12.34 ± 0.6 y $12.68 \pm 1.5\%$ de relajación, respectivamente). Sin embargo, a 60 y 90 min, la progesterona provocó mayor relajación ($p < 0.05$; 36.87 ± 2.4 y $50.13 \pm 2.7\%$ de relajación para cada periodo) que RU 486 (25.30 ± 1.6 y $43.51 \pm 2.0\%$ de relajación para cada periodo); es decir, RU 486 fue menos eficaz que la progesterona para inhibir la contracción espontánea del miometrio gestante a término (Fig. 8).

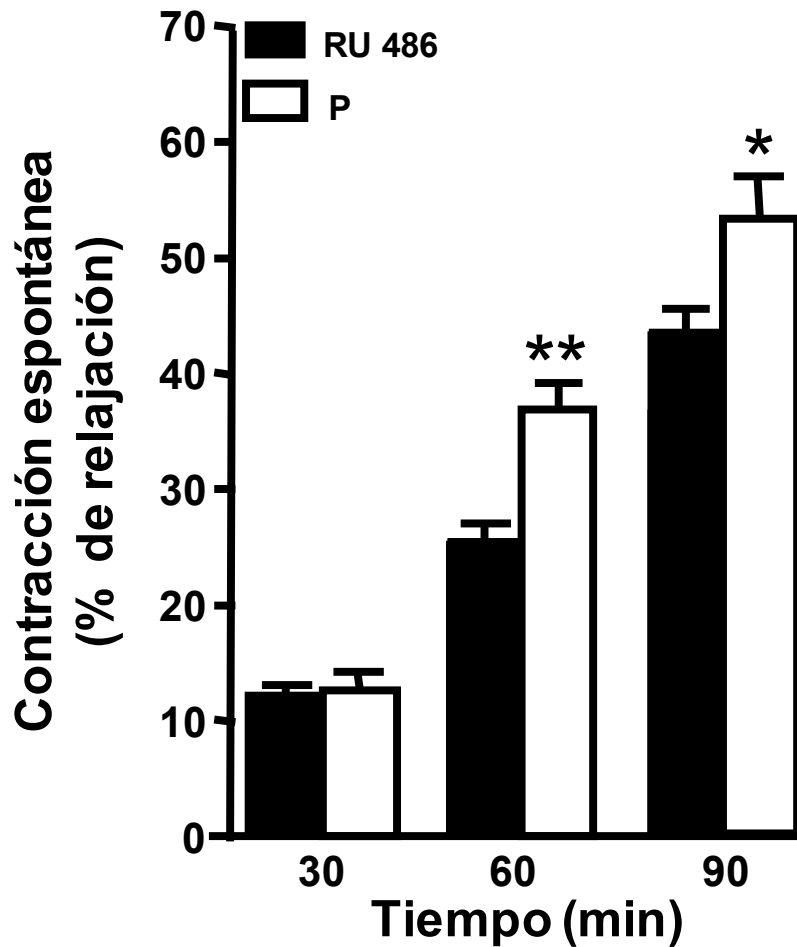


Fig. 8. Relajación inducida por RU 486 y progesterona (P) sobre la contractilidad espontánea del miometrio humano gestante a término. Diferencias significativas ($*p < 0.05$, $**p < 0.005$) al comparar el efecto relajante de P y RU 486 probados equimolecularmente a 100 μ M. Cada barra representa la media \pm E.E.M; n = 6.

Por otra parte, la progesterona fue capaz de inducir relajación uterina en presencia de la antiprogestina. Así, la antiprogestina no antagonizó el efecto relajante de la progesterona. De igual manera, la relajación uterina inducida por RU 486 no fue bloqueada en presencia de la progesterona, por el contrario, la combinación de ambos

compuestos provocó mayor relajación que la relajación inducida por cada compuesto en forma independiente, revelando así un sinergismo en el efecto relajante de ambos compuestos (Fig. 9).

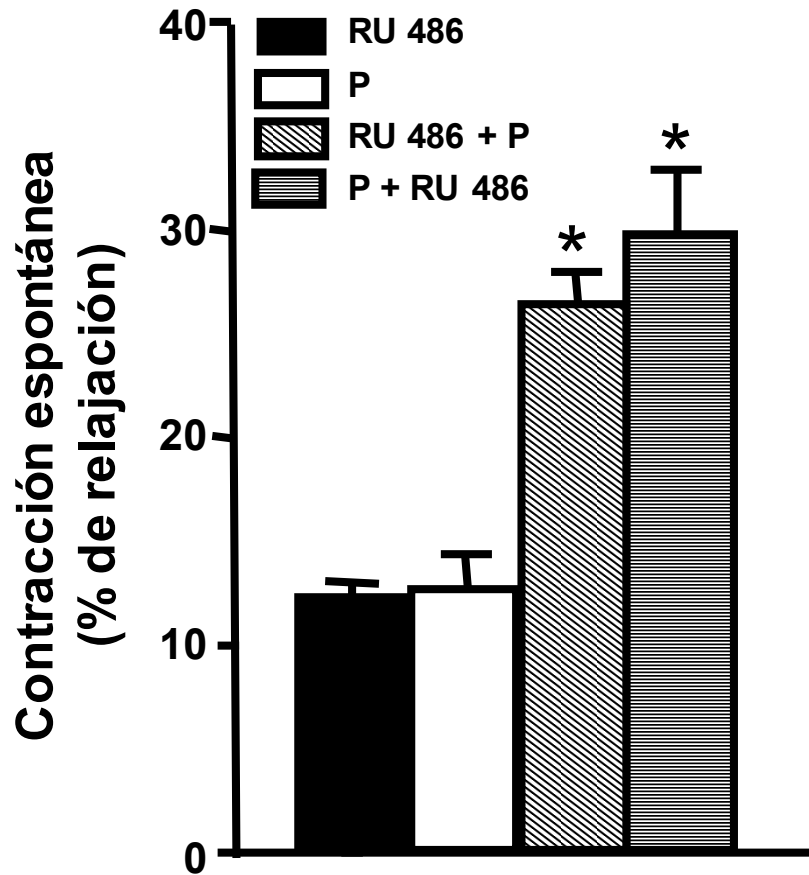


Fig. 9. Relajación inducida por RU 486 y progesterona (P) sobre la contractilidad espontánea del miometrio humano gestante a término. La relajación inducida por 100 μ M de P, evaluada a 30 min, no fue afectada en presencia de 100 μ M de RU 486 y la relajación inducida por RU 486 a 100 μ M no fue prevenida por P a 100 μ M, la relajación producida por estas combinaciones fue significativamente mayor ($*p < 0.0005$) a la relajación inducida por cada compuesto por separado. Cada barra representa la media \pm E.E.M; n = 6.

Además, el efecto inducido por la combinación de ambos compuestos, fue significativo respecto al efecto del vehículo, el cual sólo provocó 1.8 ± 0.6 % de relajación para cada uno de los compuestos.

3. Efecto relajante inducido por RU 486 sobre contracciones inducidas por diferentes agentes uterotónicos en el miometrio humano gestante a término

a) Contracciones inducidas por oxitocina y prostaglandinas

El ETOH 0.1% no modificó de manera significativa ($p > 0.05$) la contracción inducida por Oxy ($1.97 \pm 0.5\%$ de inhibición). Sin embargo, RU 486 a las diferentes concentraciones probadas, provocó de manera rápida (~5 min) una inhibición significativa (6-19% de relajación) de la actividad inducida por Oxy (Fig. 10 y Fig. 11B).

RU 486 produjo una inhibición máxima sobre la contracción inducida por Oxy de $19.95 \pm 0.6\%$ de inhibición, presentando, al igual que sobre la contracción espontánea, una curva incompleta y en consecuencia no fue posible hacer un ajuste de la curva por regresión lineal para obtener la CI_{50} y calcular la potencia del compuesto.

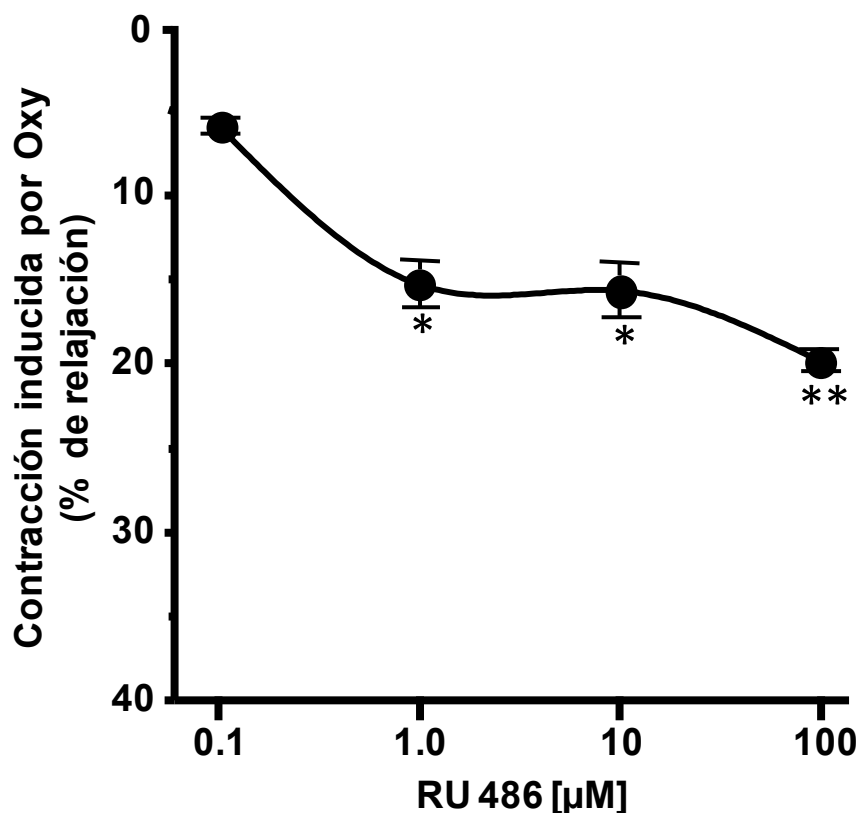


Fig. 10. Efecto relajante inducido por RU 486 a diferentes concentraciones sobre la contracción inducida por Oxy (100 nM) en el miometrio humano gestante a término. Diferencias significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$) respecto a la concentración menor. Cada punto representa la media de $n \geq 6 \pm$ E.E.M.

La relajación inducida por RU 486 sobre la contracción inducida por Oxy ($19.95 \pm 0.64\%$ de relajación) fue significativamente menor ($p < 0.005$) a la inhibición inducida por la progesterona ($30.23 \pm 1.82\%$ de relajación), resultando RU 486 menos eficaz que la progesterona para inhibir la contracción inducida por Oxy.

Respecto al efecto de RU 486 sobre contracciones inducidas por PGs, la antiprogestina provocó una marcada disminución en la amplitud de las contracciones, provocadas por cada una de las PGs (PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ y misoprostol), observándose claramente un efecto inhibitorio sobre las respuestas de cada uno de los agentes contráctiles (Fig. 11C-E). En el caso de la prueba en presencia de misoprostol (Fig. 11D), en algunos casos se pudo también apreciar que RU 486 provocó un ligero incremento en la frecuencia de las contracciones; sin embargo, el resultado final fue inhibición de la contractilidad. Además, el efecto inhibitorio de RU 486 fue observado en ~5 min (Fig. 11B-E) y fue parcialmente reversible cuando se retiró el tratamiento mediante lavados (recambios de solución Ringer). La relajación inducida por RU 486 sobre contracciones inducidas por Oxy (~20 %), evaluada a 30 min, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación a la relajación que induce sobre las diferentes PGs en el mismo tiempo (Fig. 11B-E). Los datos mostraron que a 90 min, el efecto relajante de RU 486 sobre las contracciones inducidas por cada una de las PGs, fue significativamente menor ($p < 0.05$) en el caso de la PGE_2 y no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) sobre las contracciones de $PGF_{2\alpha}$ o misoprostol (Fig. 12A).

El vehículo utilizado para disolver las PGs o el RU 486 (ETOH 0.1%), no modificó de manera significativa ($p > 0.05$) la contracción espontánea en el útero humano gestante a término (Fig. 11A). Asimismo, la adición del vehículo de RU 486 (ETOH 0.1%) no modificó significativamente ($p > 0.05$) cada una de las respuestas de las diferentes PGs.

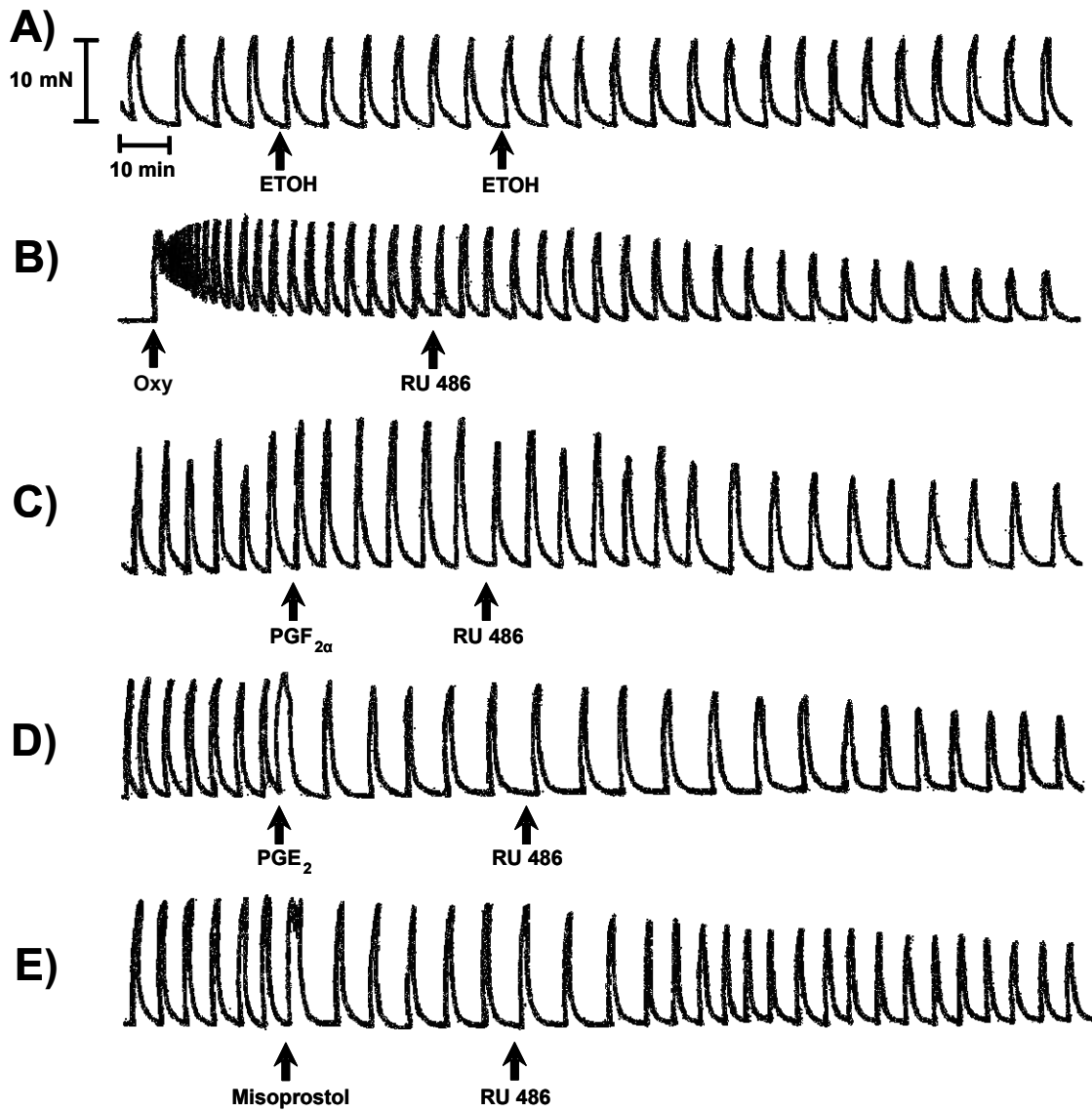


Fig. 11. Registros típicos de la actividad contráctil del miometrio humano gestante a término. A) El vehículo (ETOH 0.1%) en el cual se administró cada prostaglandina (primera adición) y en el cual se administró RU 486 (segunda adición), no modificó de manera significativa ($p > 0.05$) la actividad contráctil. Nótese el efecto relajante inducido por RU 486 100 μ M sobre la respuesta contráctil generada por B) oxitocina (Oxy; 100 nM); C) prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α} ; 1 μ M); D) prostaglandina E₂ (PGE₂; 1 μ M) y E) Misoprostol 1 μ M.

Al comparar la eficacia de RU 486 y progesterona a la concentración equimolecular de 100 μM sobre la respuesta inducida por las diferentes PGs, se observó claramente una mayor sensibilidad de las contracciones inducidas por estos agentes uterotónicos a la acción de la progesterona respecto a RU 486 ($p < 0.0005$) (Fig.12A y 12B).

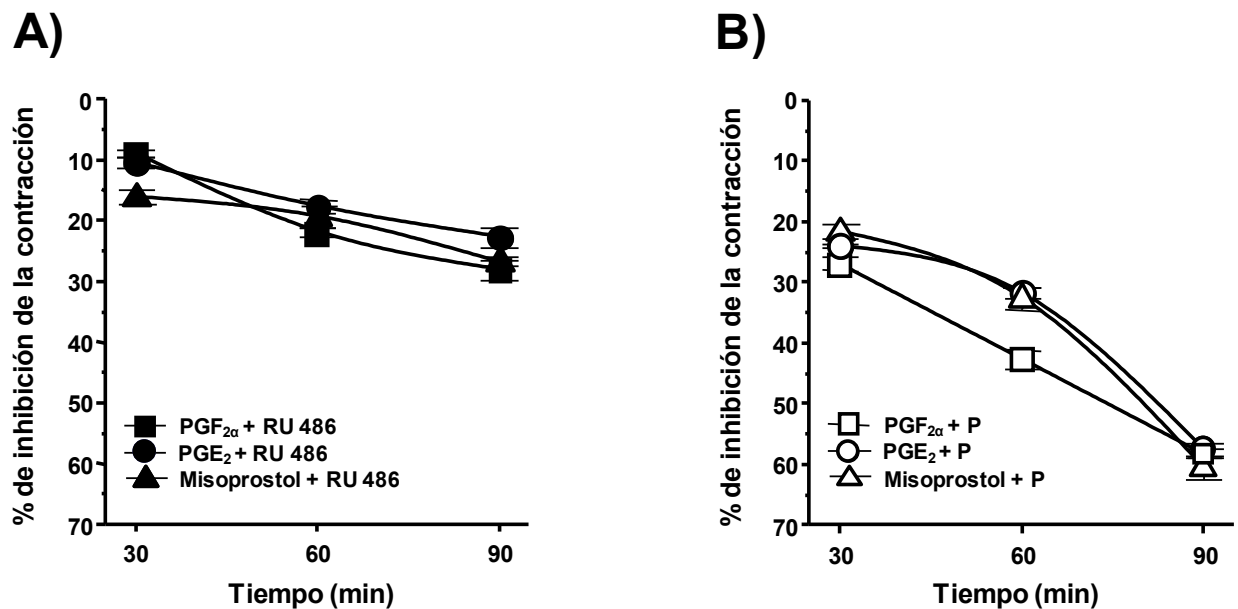


Fig. 12. Curso temporal del efecto relajante de: A) RU 486 100 μM y B) de progesterona (P), 100 μM en presencia de cada una de las prostaglandinas (PGF_{2α}, PGE₂ y misoprostol; a la concentración de 1 μM cada una). Diferencias significativas fueron observadas ($p < 0.0005$) al comparar el efecto de RU 486 vs. el efecto de la P.

Es importante resaltar que después del pretratamiento con 100 μ M de RU 486, no se observó un incremento en la respuesta de cada una de las PGs a 90 min de evaluación, por el contrario, se observó una disminución en la respuesta contráctil inducida por las PGs, para $\text{PGF}_{2\alpha}$, ($47.5 \pm 2.5\%$), PGE_2 ($74.3 \pm 5.4\%$) y misoprostol ($55.2 \pm 6.0\%$).

b) Contracción inducida por KCl

Sobre la contracción inducida por KCl (40 mM), el vehículo (ETOH 0.1 % o ETOH 0.5 %, adiciones acumulativas), no modificó de manera significativa el tono de la contracción, provocando 3.80 ± 1.32 y $4.18 \pm 0.90\%$ de relajación respectivamente. En contraste, RU 486 a 100 μ M modificó de manera inmediata (~ 2 min) el tono de la contracción de manera dependiente del tiempo (Fig. 13A) y además, después de realizar varios lavados, se observó la recuperación del tejido. A la concentración de 500 μ M, RU 486 provocó un efecto relajante significativamente mayor ($p < 0.005$), (Fig.13B). El efecto relajante de RU 486 a 100 y 500 μ M fue significativamente diferente ($p < 0.0005$) respecto al efecto del vehículo correspondiente (ETOH 0.1 ó 0.5%).

La relajación inducida por la progesterona a 100 μ M, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) a la relajación inducida por 100 μ M de RU 486 a 30, 60 y 90 min de evaluación; es decir, la progesterona resultó más eficaz que RU 486 para relajar la contracción inducida por KCl (Fig.13B).

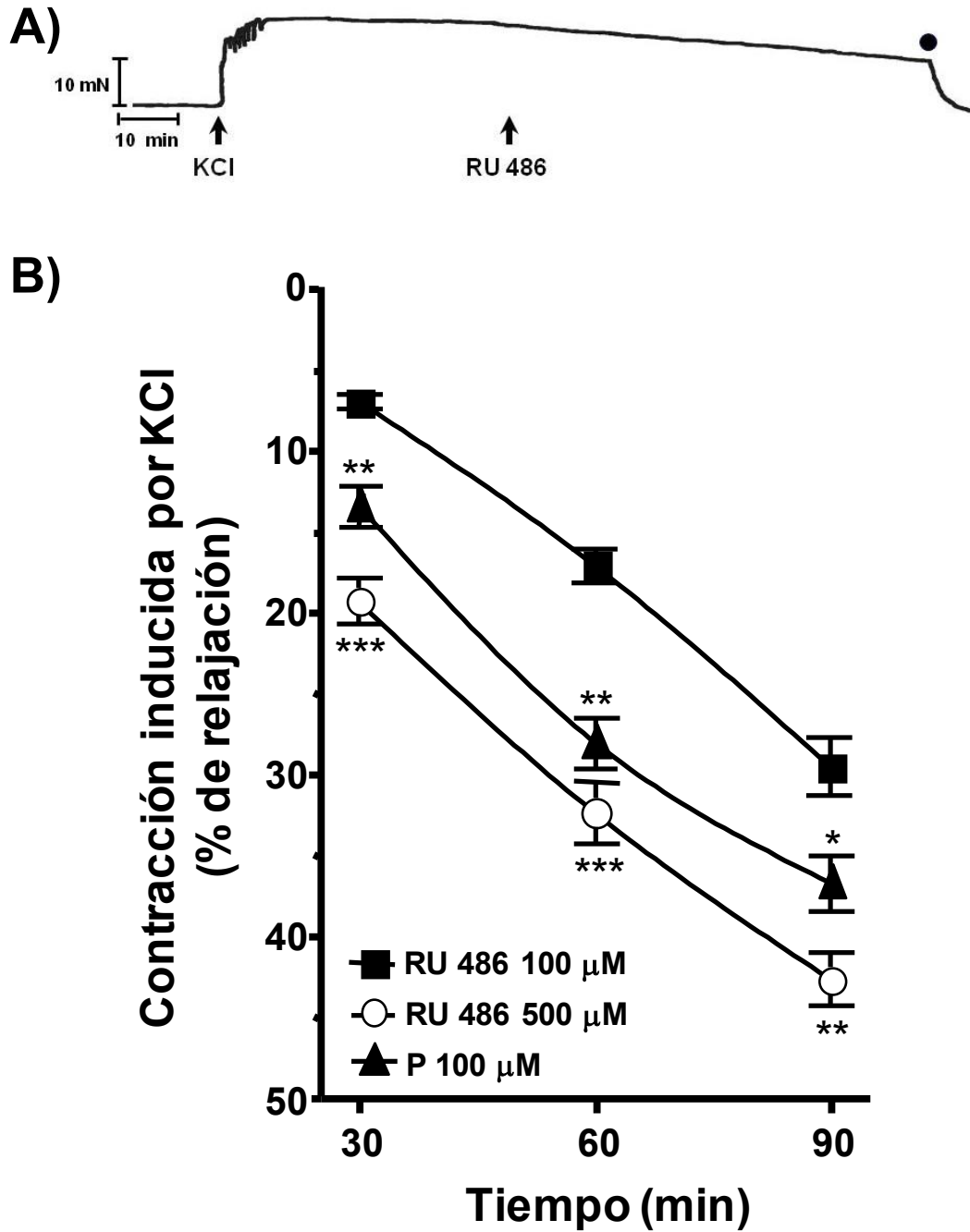


Fig. 13. Efecto relajante inducido por RU 486 y progesterona (P) sobre la contracción inducida por KCl. A) Registro representativo de la contracción inducida por KCl (40 mM) donde se muestra el efecto relajante inducido por RU 486 a 100 μM, nótese que el efecto es mayor a mayor tiempo de exposición del tejido al compuesto. El círculo sólido representa el momento del lavado. B) Relajación inducida por RU 486 y P sobre la contracción inducida por KCl (40 mM). Diferencias significativas fueron observadas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$) al comparar el efecto de RU 486 100 μM vs. la relajación inducida por RU 486 500 μM y P 100 μM.

c) Eficacia de RU 486

La comparación de la $R_{m\acute{a}x}$ de RU 486 en los diferentes tipos de contracciones, es mostrada en la Fig. 14. Las pruebas estadísticas señalan que RU 486 fue más eficaz sobre la contracción espontánea, respecto a las contracciones inducidas por los diferentes agentes uterotónicos a 30, 60 y 90 min, siendo más evidente a 60 y 90 min. Sólo en el caso de la contracción inducida por Oxy (evaluación del efecto a 30 min), RU 486 fue más eficaz que sobre la contracción uterina espontánea.

Por otra parte, la $R_{m\acute{a}x}$ de la progesterona sobre la contracción espontánea, no fue significativamente diferente de la $R_{m\acute{a}x}$ de RU 486 a 30 min de evaluación ($p > 0.05$), pero si a 60 y 90 min de evaluación. Asimismo, sobre las contracciones inducidas por los diferentes agentes uterotónicos empleados en este estudio (Oxy, PGs y KCl), la $R_{m\acute{a}x}$ de la progesterona fue significativamente mayor a la $R_{m\acute{a}x}$ de RU 486, demostrándose que la progesterona es más eficaz que RU 486 para inhibir la contractilidad uterina del miometrio humano gestante a término

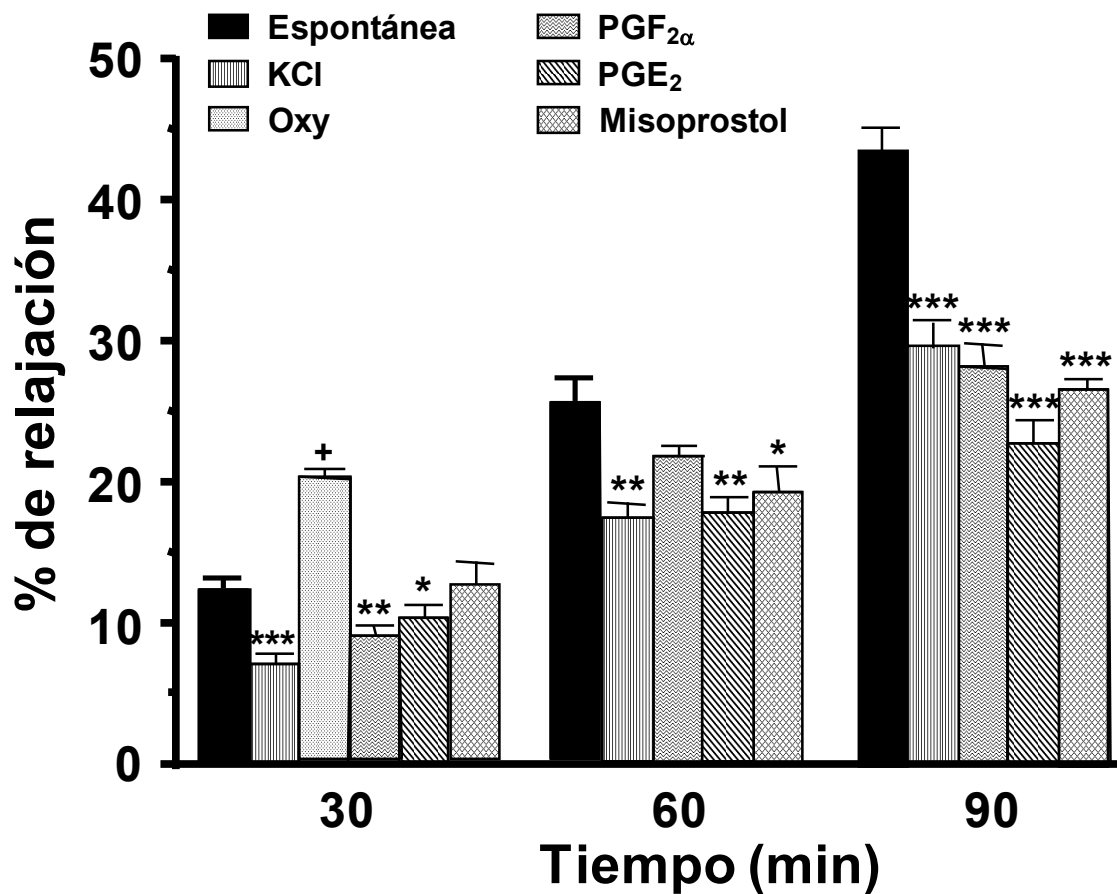


Fig. 14. Comparación del efecto relajante inducido por RU 486 a 100 μ M evaluado a 30, 60 y 90 min sobre la actividad contráctil espontánea e inducidas por KCl (40 mM), Oxy (100 nM) y prostaglandinas (PGF_{2α}, PGE₂ y misoprostol; 1 μ M). El efecto relajante inducido por RU 486 fue significativamente menor (* p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.0005) o mayor (⁺ p < 0.0005) cuando se comparó con el efecto producido sobre la contracción espontánea. Cada barra representa la media \pm EEM; n = 6.

4. Mecanismo de acción del efecto relajante uterino inducido por RU 486

El efecto relajante inducido por 100 μ M de RU 486 sobre la contracción inducida por KCl ($29.58 \pm 1.82\%$ de relajación), no fue bloqueado cuando el tejido fue preincubado, durante 30 min, con cicloheximida ($28.17 \pm 1.61\%$ de relajación) o actinomicina D ($30.20 \pm 2.5\%$ de relajación) (Fig. 15). Asimismo, el vehículo utilizado (ETOH 0.1%) para disolver los inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas, no modificó de manera significativa ($p > 0.05$) el tono de la contracción inducida por KCl (40 mM).

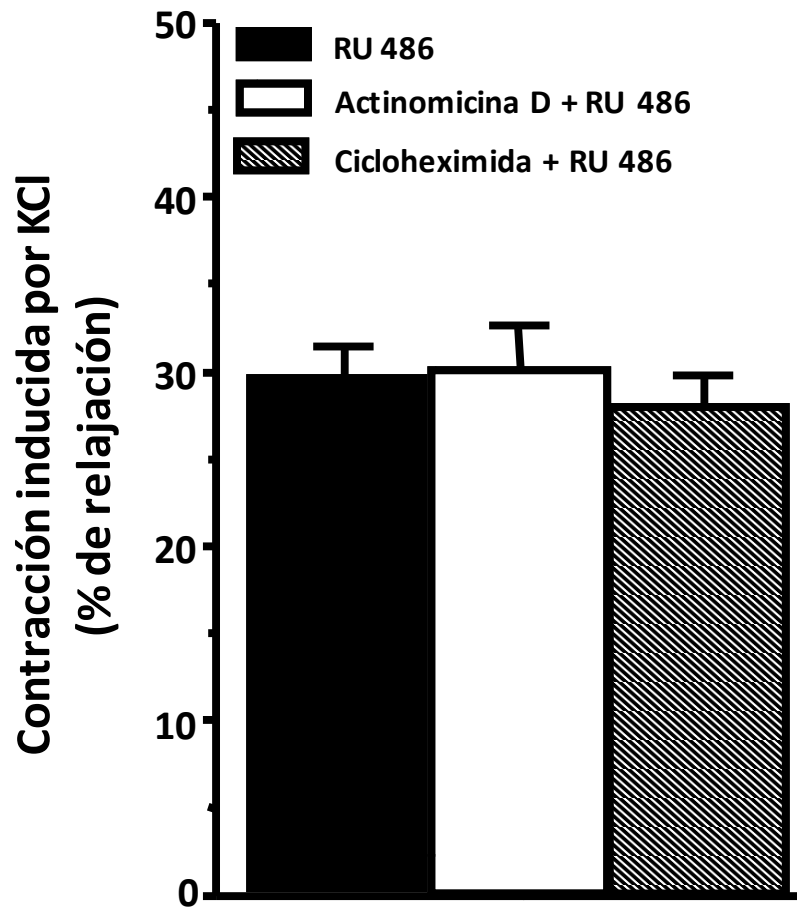


Fig. 15. Efecto relajante de RU 486 a 100 μ M evaluado a 90 min, sobre la contracción inducida por KCl (40 mM) en el miometrio humano gestante a término, sólo y en presencia de los inhibidores de la transcripción (actinomicina D 10 μ M) y de la síntesis de proteínas (cicloheximida 40 μ M), mostrando que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$). Cada barra representa la media \pm E.E.M; n = 6.

5. Efecto de RU 486 sobre la contracción inducida por calcio en miometrio humano previamente despolarizado

El ETOH 0.1%, no modificó de manera significativa la contracción inducida por 2.5 mM de CaCl_2 (2.3 ± 0.5 % de inhibición) en tejidos previamente despolarizados sin calcio extracelular. Sin embargo, la contracción inducida por CaCl_2 , fue significativamente prevenida por RU 486 a 100 μM ($30.6 \pm 0.9\%$ de inhibición) (Fig. 16). El antagonismo ejercido por RU 486 sobre la contracción inducida por CaCl_2 , fue revertido al retirar el compuesto mediante lavados, mostrando la recuperación de la contracción de CaCl_2 en la última adición. De manera interesante, al comparar la $R_{\text{máx}}$ de RU 486 sobre la contracción inducida por CaCl_2 ($30.6 \pm 0.9\%$ de inhibición), respecto a la $R_{\text{máx}}$ sobre la contracción espontánea ($12.34 \pm 0.6\%$ de relajación), se observó que RU 486 fue notablemente más eficaz para prevenir la contracción inducida por CaCl_2 en tejidos previamente despolarizados.

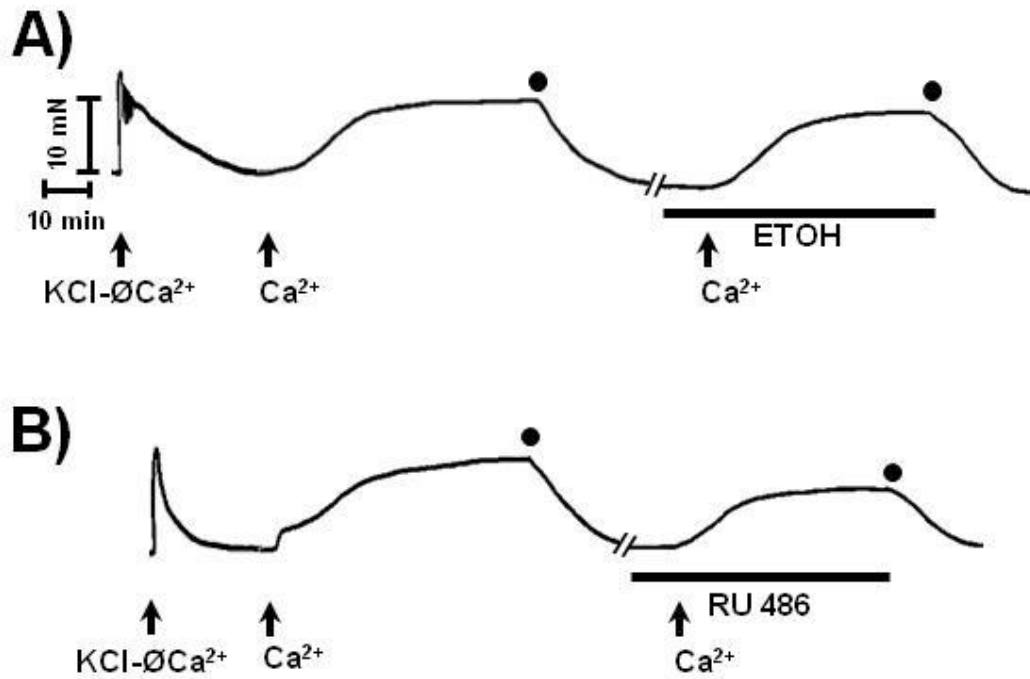


Fig. 16. Efecto de RU 486 a $100 \mu\text{M}$ sobre la contracción inducida por 2.5 mM de CaCl_2 (Ca^{2+}) en el miometrio humano gestante a término previamente despolarizado por solución alta en potasio libre de calcio ($\text{KCl}-\text{ØCa}^{2+}$). A) El vehículo utilizado para disolver el RU 486 (ETOH 0.1%) no modificó de manera significativa ($p > 0.05$) la contracción inducida por Ca^{2+} . B) La contracción de Ca^{2+} fue notablemente prevenida por RU 486 a $100 \mu\text{M}$. La barra sólida indica el tiempo de incubación con ETOH o RU 486 y los círculos sólidos representan el momento del lavado.

VII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación señalan que RU 486 es capaz de inducir un efecto relajante rápido y reversible sobre la contractilidad uterina espontánea e inducida por diferentes agentes uterotónicos. Así, éste es el primer estudio sistemático que reporta un efecto relajante inicial de la antiprogestina RU 486 en el miometrio humano gestante, que revela que esta antiprogestina puede inducir un efecto antiuterotónico antes de su acción antiprogestacional genómica.

Como muestran los resultados, los inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas no modificaron la relajación inducida por RU 486; así, el efecto relajante uterino rápido y reversible de RU 486 no requiere la expresión de genes o síntesis de proteínas. Con base a lo anterior; los presentes hallazgos muestran que RU 486 como la progesterona, puede inducir relajación uterina por una vía no genómica, previo a su efecto antagonista sobre el receptor de progesterona. RU 486 es clásicamente descrito como una antiprogestina, pero los presentes datos revelan una acción agonista a nivel no genómico por inducir relajación miometrial de manera similar a la progesterona, pero con menor eficacia. Asimismo, los resultados experimentales indican que RU 486 no actúa como un antagonista no genómico de la progesterona, ya que la relajación miometrial inducida por la progesterona ocurre en tejidos uterinos pretratados con RU 486; indicando que esta antiprogestina no interfirió con la acción no genómica de la progesterona en el útero. Asimismo, la progesterona no bloqueó la relajación inducida por RU 486; por el contrario, ambos compuestos, progesterona y RU 486 se sinergizaron para producir mayor relajación que la que ejerce cada uno por separado.

En forma notable, se observó que RU 486 no fue capaz de incrementar las respuestas contráctiles a Oxy o PGs; por el contrario, estas respuestas fueron disminuidas en presencia de RU 486.

En forma consistente con nuestros resultados, estudios previos *in vitro* han demostrado que RU 486 puede inducir relajación uterina no genómica en ratas no gestantes (Perusquía y Kubli Garfias, 1994; Parra *et al.*, 2000). De acuerdo con estas observaciones, también en dos estudios *in vitro* se observó indirectamente que RU 486 era capaz de producir un efecto rápido relajante sobre la contractilidad espontánea del útero no gestante, con implicaciones patológicas en mujeres en el período perimenopáusico (Lobaccaro *et al.*, 1992; 1996). Sin embargo, no existían evidencias sobre la contractilidad uterina del humano gestante (la condición endocrina para el uso terapéutico de RU 486), por lo que, el presente estudio es la primera evidencia de una relajación uterina no genómica inducida por RU 486 en humano gestante. No obstante, es importante considerar que numerosas evidencias han demostrado que RU 486 aumenta la contractilidad uterina por una acción genómica antiprogestacional, aunque algunos informes han documentado que RU 486 no es capaz de inducir el parto (Haluska *et al.*, 1987; Wolf *et al.*, 1989). En este contexto, se ha reportado que en monos verdes gestantes, RU 486 provoca contracciones uterinas, pero estas fueron insuficientes para inducir el parto (Wolf *et al.*, 1989). De manera similar, en el mono Rhesus gestante a término, la antiprogestina induce una disminución transitoria de la actividad contráctil uterina y 8 h después del tratamiento produce un incremento en las contracciones, las cuales fueron irregulares e insuficientes para inducir el parto (Haluska *et al.*, 1987). Por lo anterior, es inevitable proponer que la ineficiencia de RU

486 para promover el parto sea debida al efecto relajante no genómico inicial inducido por RU 486.

Los presentes hallazgos muestran que RU 486 es capaz de relajar varios tipos de contracciones uterinas. La contractilidad espontánea, de manera general, fue la más sensible al efecto relajante inducido por RU 486, respecto a las contracciones inducidas con KCl, Oxy y PGs. También fue evidente que RU 486 provocó un efecto relajante ligero 30 min después de su adición, pero la eficacia fue notablemente mayor a 60 y 90 min. Sin embargo, es notorio que el intervalo de concentración de RU 486 probado en el presente estudio (0.1 a 500 μ M) fue mucho menor (500 a 1500 veces) que sus dosis terapéuticas (200-600 mg) empleadas en los regímenes clínicos vigentes; implicando que RU 486 fue probado en un bajo intervalo de concentración en este estudio, lo cual fue debido a la naturaleza hidrofóbica del compuesto. Sin embargo, las concentraciones probadas en este estudio se encuentran en el mismo intervalo μ M, en el que se encuentran los niveles plasmáticos de RU 486 en mujeres embarazadas después de la ingesta de RU 486 a las dosis de 400 y 600 mg (revisado por Sitruk-Ware y Spitz, 2003). Debido a que no fue posible examinar el efecto de RU 486 a concentraciones mayores a 500 μ M en nuestro sistema, se especula que la eficacia de RU 486 para inducir relajación uterina pudiera ser mayor a concentraciones más cercanas a las dosis terapéuticas.

El presente estudio sugiere que el efecto relajante uterino inducido por RU 486 es mediado por una acción no genómica. La relajación provocada por RU 486 sobre la contracción inducida por KCl y la parcial prevención de la contracción inducida por Ca^{2+}

en miometrio despolarizado con solución de KCl- Ca^{2+} , sugiere que el efecto relajante de RU 486 involucra, al menos en parte, una reducción del influjo de Ca^{2+} por bloqueo de canales de Ca^{2+} operados por voltaje. Por otra parte, la evidencia de que RU 486 también es capaz de relajar las respuestas contráctiles inducidas por Oxy y PGs, implica que esta antiprogestina, también podría bloquear canales de Ca^{2+} operados por receptor, como previamente ha sido reportado para progestinas y andrógenos (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001; Perusquía *et al.*, 2005).

Es importante considerar que RU 486 es un compuesto relacionado estructuralmente con las hormonas esteroides; por esta razón, esta antiprogestina al igual que las hormonas esteroides sexuales (progestinas y andrógenos) puede poseer la misma propiedad de provocar relajación miometrial por una vía no genómica, aunque con diferente eficacia.

Desde el punto de vista clínico, el tiempo mínimo necesario para que RU 486 provoque la sensibilización del útero a la acción contráctil de las PGs, ha sido un tema de gran interés, actualmente diversos estudios clínicos están investigando la posibilidad de acortar el intervalo de tiempo entre la administración de RU 486 y la PG con la finalidad de acelerar la interrupción del embarazo; estos estudios deben considerar que RU 486 induce un efecto relajante inicial sobre la actividad contráctil uterina. Los datos disponibles en la literatura y los obtenidos en el presente estudio, indican que RU 486 inhibe (no genómicamente) y estimula (genómicamente) la actividad contráctil miometrial dependiendo del tiempo transcurrido después de la administración de RU

486. Por consiguiente, los resultados de este estudio, ayudan a entender mejor la completa acción de RU 486.

Finalmente, es importante tomar en cuenta que el intervalo de tiempo entre la administración de RU 486 y la aparición de contracciones uterinas producidas por una mayor sensibilidad a las PGs, es de 24 a 36 h, siendo máxima de 36 a 48 h (Swahn y Bygdeman, 1988). Tomando en cuenta estos intervalos de tiempo, es fundamental analizar el posible papel de factores farmacocinéticos en la acción de este fármaco, ya que RU 486 (administrado por vía oral) se absorbe y metaboliza rápidamente (de 1 a 2 h), presentando una vida media de 25 a 30 h, con un extenso metabolismo por desmetilación e hidroxilación (Heikinheimo et al., 2003). Con estas bases, es razonable proponer que RU 486 inicialmente provoca un efecto relajante y su posterior acción genómica, podría ser mediada por sus metabolitos. Un análisis más detallado de la acción relajante no genómica y del metabolismo de RU 486, puede dar nuevas evidencias de las acciones de este compuesto en la función uterina.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo revelan que RU 486 tiene la capacidad de provocar relajación de la contractilidad miometrial en humano gestante a término, al inducir una clara disminución de la actividad contráctil espontánea e inducida por Oxy, PGE₂, PGF_{2α}, misoprostol y KCl.

2. Las características del efecto relajante uterino inducido por RU 486, rápido, reversible y no modificado por inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas, indican que RU 486 es capaz de inducir relajación uterina por un mecanismo de acción de tipo no genómico, antes de ejercer su conocida acción genómica como antiprogestina.

3. RU 486 al igual que la progesterona, aunque con menor eficacia, ejerce un efecto antiuterotónico, posiblemente por compartir la estructura básica de las hormonas esteroideas, comportándose como agonista a nivel no genómico.

4. RU 486 podría ejercer relajación uterina por diferentes mecanismos de acción, la inhibición sobre contracciones inducidas por Oxy y PGs, sugiere un bloqueo de canales de calcio operados por receptor, mientras que la inhibición de la contracción inducida por KCl y la prevención de la contracción inducida por Ca²⁺, indican un bloqueo de canales de calcio operados por voltaje.

IX. REFERENCIAS

Baird DT, Brown A, Cheng L, Critchley HO, Lin S, Narvekar N, Williams AR. (2003). Mifepristone: a novel estrogen-free daily contraceptive pill. *Steroids* 68: 1099-1105.

Baulieu EE. (1997). RU 486 (mifepristone). A short overview of its mechanisms of action and clinical uses at the end of 1996. *Ann N Y Acad Sci* 828: 47-58.

Beato M, Klung J. (2000). Steroid hormone receptors. An update. *Hum Reprod Update* 6: 225-236.

Beck CA, Weigel NL, Moyer ML, Nordeen SK, Edwards DP. (1993). The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4441-4445.

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

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

Bygdeman M, Danielsson KG, Swahn ML. (1997). The possible use of antiprogestins for contraception. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 164: 75-77.

Bygdeman M, Gemzell DK, Marions L, Swahn M. (2000). Pregnancy termination. *Steroids* 65: 801-805.

Cabeza M, Bratoeff E, Heuze I, Guzman A, Gomez G, Berrios H, Rosales AM. (2007). Antiandrogenic and apoptotic effects of RU-486 on animal prostate. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104: 321-325.

Chamberlain MC. (2001). Meningiomas. *Curr Treat Options Neurol* 3: 67-76.

Cheng L, Gulmezoglu AM, Piaggio G, Ezcurra E, Van Look PF. (2008). Interventions for emergency contraception. *Cochrane Database Syst Rev* 16: CD001324.

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

Chwalisz K, Fahrenholz F, Hackenberg M, Garfield R, Elger W. (1991). The progesterone antagonist onapristone increases the effectiveness of oxytocin to produce delivery without changing the myometrial oxytocin receptor concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1760-1770.

Coleman KM, Smith CI. (2001). Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci* 1: D1379-D1391.

Creinin MD, Pymar HC, Schwartz JL. (2001a). Mifepristone 100 mg in abortion regimens. *Obstet Gynecol* 98: 434-439.

Creinin MD, Schwartz JL, Pymar HC, Fink W. (2001b). Efficacy of mifepristone followed on the same day by misoprostol for early termination of pregnancy: report of a randomised trial. *BJOG* 108: 469-473.

Creinin MD, Schreiber CA, Bednarek P, Lintu H, Wagner MS, Meyn LA. (2007). Mifepristone and misoprostol administered simultaneously versus 24 hours apart for abortion: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 109: 885-894.

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

Engman M, Granberg S, Williams AR, Meng CX, Lalitkumar PG, Gemzell-Danielsson K. (2009). Mifepristone for treatment of uterine leiomyoma. A prospective randomized placebo controlled trial. *Hum Reprod* 24: 1870-1879.

Espinoza H, Ellertson C, García S, Schiavon R, Langer A. (2002). Medicamentos para la interrupción de la gestación: una revisión de la literatura y sus posibles implicaciones para México y América Latina. *Gaceta Med Mex* 138: 347-356.

Falkenstein E, Tillmann, HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. (2000a). Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52: 513-555.

Falkenstein E, Norman AW, Wehling M. (2000b). Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action (s). *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2072-2075.

Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm111323.htm> Updated 02/24/2010.

Fjerstad M, Trussell J, Sivin I, Lichtenberg ES, Cullins V. (2009). Rates of serious infection after changes in regimens for medical abortion. *N Engl J Med* 361: 145-151.

Garfield RE, Blennerhassett MG, Miller SM. (1988). Control of myometrial contractility: role and regulation of gap junctions. *Oxf Rev Reprod Biol* 10: 436-490.

Gary MM, Harrison DJ. (2006). Analysis of severe adverse events related to the use of mifepristone as an abortifacient. *Ann Pharmacother* 40: 191-197.

Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. (2009). Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update* 15: 119-138.

Giacalone PL, Targosz V, Laffargue F, Boog G, Faure JM. (1998). Cervical ripening with mifepristone before labor induction: a randomized study. *Obstet Gynecol* 92: 487-492.

Goldberg JR, Plescia MG, Anastasio GD. (1998). Mifepristone (RU 486): current knowledge and future prospects. *Arch Fam Med* 7: 219-222.

Grossman D, Blanchard K, Blumenthal P. (2008). Complications after second trimester surgical and medical abortion. *Reprod Health Matters* 16: 173-182.

Gynuity Health Projects. List of Mifepristone Approval. http://gynuity.org/downloads/mife_approval_2009_list.pdf Updated 11/04/2009.

Haluska GJ, Stanczyk FZ, Cook MJ, Novy MJ. (1987). Temporal changes in uterine activity and prostaglandin response to RU486 in rhesus macaques in late gestation. *Am J Obstet Gynecol* 157: 1487-1495.

Heikinheimo O, Croxatto H, Salvatierra AM, Chang CC, Luukkainen T, Lähteenmäki P. (1987). Intravaginal administration of RU 486 in humans and rats: inadequate absorption in humans. *Hum Reprod* 2: 645-648.

Heikinheimo O. (1990). Antiprogestone steroid RU486. Pharmacokinetics and receptor binding in humans. *Acta Obstet Gynecol Scand* 69: 357-358.

Heikinheimo O, Kekkonen R. (1993). Dose-response relationships of RU 486. *Ann Med* 25: 71-76.

Heikinheimo O, Kekkonen R, Lahteenmaki P. (2003). The pharmacokinetics of mifepristone in humans reveal insights into differential mechanisms of antiprogestin action. *Contraception* 68: 421-426.

Heinlein CA, Chang C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: An overview. *Endocr Rev* 23: 175-200.

Henderson JT, Hwang AC, Harper CC, Stewart FH. (2005). Safety of mifepristone abortions in clinical use. *Contraception* 72: 175-178.

Ikuta Y, Matsuura K, Okamura H, Oyamada I, Usuku G. (1991). Effects of RU486 on the interstitial collagenase in the process of cervical ripening in the pregnant rat. *Endocrinol Jpn* 38: 491-496.

Im A, Appleman LJ. (2010). Mifepristone: pharmacology and clinical impact in reproductive medicine, endocrinology and oncology. *Expert Opin Pharmacother* 11: 481-488.

Johannisson E, Oberholzer M, Swahn ML, Bygdeman M. (1989). Vascular changes in the human endometrium following the administration of the progesterone antagonist RU 486. *Contraception* 39: 103-117.

Lahteenmaki P, Heikinheimo O, Croxatto H, Spitz I, Shoupe D, Birgersson L, Luukkainen T. (1987). Pharmacokinetics and metabolism of RU 486. *J Steroid Biochem* 27: 859-863.

Lelaidier C, Baton C, Benifla JL, Fernandez H, Bourget P, Frydman R. (1994). Mifepristone for labour induction after previous caesarean section. *Br J Obstet Gynaecol* 101: 501-503.

Lobaccaro-Henri C, Descomps B, Thaler-Dao H. (1996). RU 38486 inhibits intracellular calcium mobilization and PGI₂ release from human myometrium: mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59: 63-73.

Lobaccaro-Henri C, Saintot M, Laffargue F, Zahradnik HP, Descomps B, Thaler-Dao H. (1992). Effect of the progesterone antagonist RU486 on human myometrial spontaneous contractility and PGI₂ release. *Prostaglandins* 44: 443-455.

Lösel R, Wehling M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 46-56.

Marions L. (2006). Mifepristone dose in the regimen with misoprostol for medical abortion. *Contraception* 74: 21-25.

Norman JE, Kelly RW, Baird DT. (1991a). Uterine activity and decidual prostaglandin production in women in early pregnancy in response to mifepristone with or without indomethacin in vivo. *Hum Reprod* 6: 740-744.

Norman JE, Thong KJ, Baird DT. (1991b). Uterine contractility and induction of abortion in early pregnancy by misoprostol and mifepristone. *Lancet* 338: 1233-1236.

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

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

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

Perusquía M, Jasso-Kamel J. (2001). Influence of 5 α - and 5 β -reduced progestins on the contractility of isolated human myometrium at term. *Life Sci* 68: 2933-2944.

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

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, RU 38486. An original multifaceted antihormone in vivo. In: *Adrenal Steroid Antagonism*. Agarwal M, ed. Walter de Gruyter and Co., Berlin, 1984: pp 77-101.

Purmonen S, Ahola TM, Pennanen P, Aksenov N, Zhuang YH, Tuohimaa P, YlikomiT. (2002.) HDLG5/KIAA0583, encoding a MAGUK-family protein, is a primary progesterone target gene in breast cancer cells. *Int J Cancer* 102: 1-6.

Rådestad A, Christensen NJ, Stromberg L. (1988). Induced cervical ripening with Mifepristone in first trimester abortion. A double-blind randomized biomechanical study. *Contraception* 38: 301-312.

Sarkar NN. (2002). Mifepristone: bioavailability, pharmacokinetics and use-effectiveness. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 101: 113-120.

Schaff EA. (2010). Mifepristone: ten years later. *Contraception* 81: 1-7.

Schteingart DE. (2009). Drugs in the medical treatment of Cushing's syndrome. *Expert Opin Emerg Drugs* 14: 661-671.

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

Spitz IM, Bardin CW. (1993). Mifepristone (RU 486)--a modulator of progestin and glucocorticoid action. *N Engl J Med* 329: 404-412.

Spitz IM, Croxatto HB, Robbins A. (1996). Antiprogestins: mechanism of action and contraceptive potential. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 47-81.

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

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

Tang OS, Chan CC, Ng EH, Lee SW, Ho PC. (2003). 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* 18: 335-338.

Tsukahara S, Sasaki T, Phillips CI, Gore SM. (1986). Subconjunctival suspension of RU486 lowers intraocular pressure in normal rabbits. *Br J Ophthalmol* 70: 451-455.

Wardell SE, Narayanan R, Weigel NL, Edwards DP. (2010). Partial agonist activity of the progesterone receptor antagonist RU486 Mediated by an amino-terminal domain coactivator and phosphorylation of Serine400. *Mol Endocrinol* 24: 335-345.

Weiss BD. (1993). RU 486. The progesterone antagonist. *Arch Fam Med* 2: 63-69.

Wing DA, Fassett MJ, Mishell DR. (2000). Mifepristone for preinduction cervical ripening beyond 41 weeks' gestation: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 96: 543-548.

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

World Health Organization Task Force on Postovulatory Methods of Fertility Regulation. (1994). Cervical ripening with mifepristone (RU 486) in late first trimester abortion. *Contraception* 50: 461-475.

World Health Organization Task Force on Post-ovulatory Methods for Fertility Regulation. (2001). Lowering the doses of mifepristone and gemeprost for early abortion: a randomised controlled trial. *BJOG* 108: 738-742.

Zhao S, Sherwood OD. (2004). Induction of labor with RU 486 (mifepristone) in relaxin-deficient rats: antepartum administration of relaxin facilitates delivery and increases pup survival. *Am J Obstet Gynecol* 190: 229-238.



Nongenomic uterine relaxing effect of RU 486 (mifepristone) prior to its antiprogesterone activity in the human pregnancy

Mercedes Perusquía^{a,b,*}, Julia Espinoza^a, Erika Navarrete^a

^a Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México D.F., Mexico

^b Department of Veterinary Physiology & Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, TX 77843-4466, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2008

Received in revised form 30 April 2009

Accepted 8 May 2009

Available online 21 May 2009

Keywords:

Antiprogestins

RU 486

Mifepristone

Uterine relaxation

Antiprogesterone action

Nongenomic effect

ABSTRACT

The antiprogesterone mifepristone (RU 486) is used for termination of pregnancy, as RU 486 blocks the quiescent action of progesterone, increases uterine contractility, sensitizes the myometrium to prostaglandins, and elicits cervical ripening. Since RU 486 represents a class of compound that is structurally related to steroid hormones, some of which possess a nongenomic uterine relaxing effect, we investigated the potential nongenomic relaxing action of RU 486 on the human pregnant myometrium. Myometrial tissues were obtained from pregnant women undergoing elective cesarean section at term and were isometrically recorded. RU 486 caused relaxation on spontaneous contractility and high potassium-induced contractions with lower relaxing efficacy than progesterone. The progesterone receptor-blocking activity of RU 486 did not antagonize the uterine relaxation of progesterone. Moreover, contractions induced by oxytocin or different prostaglandins (PGF_{2α}, PGE₂, and a prostaglandin analogue, misoprostol) were inhibited rather than increased by RU 486. RU 486 induced a rapid and reversible relaxing effect, which was unaffected by inhibitors of protein synthesis and transcription, implying that RU 486 acts through a nongenomic mechanism. This study reveals that RU 486: (i) reduced high potassium-induced contraction and prevented calcium-induced contraction in depolarized tissue; and (ii) relaxed the oxytocin- and prostaglandin-induced contractions, indicating a blockade of voltage- and receptor-operated calcium channels by RU 486. These data show that this antiprogesterone may induce a rapid nongenomic antiuterotonic effect prior to its antiprogesterone action.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It is widely recognized that progesterone promotes uterine quiescence by inhibiting myometrial contractions during pregnancy. In 1956, Csapo demonstrated that progesterone induced a significant inhibition of uterine contractile activity [1]. This study was followed by other pioneering investigations, which examined the effect of progesterone on myometrial activity (for review, see [2]). More recent studies have reported that progesterone and its metabolites elicit a nongenomic relaxing effect in the rat [3,4] and human [5,6] myometrium. Therefore, the development of medical abortion has focused to discover drugs with both antiprogesterone and uterotonic activity. Mifepristone (RU 486) was the first synthetic steroid of this class employed as a medical method for early termination of pregnancy; initially used alone at a dose of 600 mg, and then used with a subsequent low dose of prostaglandin [7].

Numerous clinical studies have confirmed that the combination of RU 486 and a prostaglandin analogue (gemeprost or misoprostol) is highly effective in terminating early pregnancy [7–12] and led to development of medical abortion using RU 486 plus a prostaglandin by oral, vaginal or sublingual routes of administration. Treatment with 200–600 mg RU 486 followed by oral administration of 0.4 mg misoprostol 36–48 h later is the most commonly used medical method for termination of pregnancy, but the effect of misoprostol following pretreatment with RU 486 on uterine contractility has not been studied at an interval shorter than 12 h.

The mode of action of RU 486 as an antagonist of progesterone during pregnancy has been documented extensively and has shown that treatment with RU 486: (1) reverses the hyperpolarization of the cell membrane and the progesterone-induced inhibition of gap junction formation [13]; (2) increases decidual prostaglandin release by reducing the activity of prostaglandin dehydrogenase [14]; (3) sensitizes the myometrium to the contractile effect of prostaglandins [7]; and (4) causes ripening of the cervix and dilatation of the cervical canal [15,16].

It is also important to highlight that the molecular structure of RU 486, like all steroid hormones, is composed of a ring complex formed of three cyclohexane rings (A, B, and C) and a cyclopent-

* Corresponding author at: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, 3er Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, México D.F., C.P. 04510, Mexico. Tel.: +52 55 56 22 89 63.
E-mail address: perusqui@servidor.unam.mx (M. Perusquía).

tane ring (D). As a result of this molecular structure, the progestins [2] and androgens [17] are both capable of inducing a nongenomic relaxing effect in human pregnant uterus. Likewise, RU 486 has been used as a pharmacological tool to block the genomic action of progesterone, but only two *in vitro* studies in rats have reported that this antiprogestin has the ability to produce myometrial relaxation by rapid nongenomic actions [18,19]. Based on this background, our study specifically examined the potential initial relaxing effect of RU 486 on spontaneous contractile activity in pregnant human myometrium at term, as well as on the contractions induced by high potassium, oxytocin, natural prostaglandins (PGs): PGF_{2α} and PGE₂, and a PGE₁ analogue, misoprostol. Additionally, in order to investigate the potential mechanism of the nongenomic action, we examined: (1) the possible participation of nuclear transcription/translation mechanisms; and (2) the prevention of calcium influx through the voltage gates.

2. Experimental

2.1. Uterine samples

Written informed consent was obtained for removal of myometrial tissue from women undergoing elective (nonlabor) cesarean section (38–40 week of gestation). None of the pregnant women included in this study had underlying disease, and the indication for cesarean section was breech presentation, placenta previa, or maternal request. Biopsy specimens were taken from the midline of the upper edge of the lower segment incision and placed immediately in cold physiological salt solution (Hartmann, Baxter Laboratories). The present study was approved by the Ethics Committee of Woman's Hospital, Ministry of Health of Mexico (Department of Medical Teaching RE: 597) and was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The sample was transported to the laboratory and kept refrigerated (4 °C) for 24–48 h.

2.2. Samples and general methods

The tissue was transferred to Krebs–Henseleit solution with the following composition (mM): NaHCO₃ (25), NaCl (119), KCl (4.6), KH₂PO₄ (1.2), MgSO₄ (1.2), CaCl₂ (1.5) and glucose (12), and gassed continuously with 95% O₂/5% CO₂ to maintain pH 7.4 and constant temperature (37 °C). The connective tissue was carefully removed and the myometrium dissected in strips parallel to the muscle fiber bundles. Prepared strips were approximately 10 mm long, 5 mm wide and 5 mm thick. Each strip was placed vertically in a temperature-controlled (37 °C) organ bath containing 10 ml Krebs–Henseleit solution for isometric tension recordings. One end of the strip was attached to a fixed support at the bottom of the chamber, and the other end was connected to an isometric force transducer (FTO3C, Grass Instrument, Quincy, MA) via stainless steel wire. The organ bath solution was continuously bubbled with 5% CO₂ in O₂ (pH 7.4). A passive resting tension of 10 mN (1.0 g) was adjusted throughout the experiment. Isometric force was recorded by a polygraph (79, Grass Instruments, Quincy, MA) and the spontaneous contractile activity was allowed to stabilize for approximately 90 min. In previous trials, spontaneous activity was stable for more than 5 h. The data were acquired and analyzed by using PolyView 2.5 (Grass Instruments Division/Astro-Med, Inc, West Warwick, RI) data acquisition software.

2.3. RU 486 response on spontaneous myometrial contractility

After tissue stabilization in Krebs–Henseleit solution, a 30-min of spontaneous contractility was recorded as the control, and immediately afterwards, the effect of noncumulative concentrations (logarithmic concentrations, starting where the lowest

concentration tested had a detectable response: 0.1, 1.0, 10, and 100 μM; only a single concentration was added to each strip) of RU 486 on spontaneous contractions was determined for 30, 60 and 90 min in samples from each donor (thus, *n* = 6 women in independent experiments). Collaterally, in some experiments under the same experimental conditions, myometrial contractility was exposed to the vehicle alone (0.1% absolute ethanol; a volume identical to that used as solvent for RU 486). The limited solubility of RU 486 prevented further experimentation at concentrations higher than 100 μM (at only a single addition); however, in order to investigate the RU 486 effect at higher concentration, some experiments were carried out by applying 5 consecutive additions of 100 μM RU 486 (final concentration 500 μM), given cumulatively with an interval of approximately 5 min between each addition. Accordingly, in different tissues, 0.1% absolute ethanol was also applied five times under the same schedule as a vehicle control.

In a separate group of experiments, the spontaneous myometrial contraction was also exposed to 100 μM progesterone [equimolar concentration to the highest concentration of RU 486 used to induce the maximal relaxation (*R*_{max}) in a noncumulative manner]; its effect was evaluated every 30 min and compared with the relaxing effect induced by RU 486 at the same concentration. To examine the potential blocking effect of RU 486 on progesterone-induced relaxation, the spontaneous contractility was pretreated for 30 min with RU 486 at 100 μM, and then progesterone at 100 μM for 30 min. The response to progesterone was evaluated for 30 min and compared to the response when RU 486 was not present. In the same way, the possible blocking action of progesterone on RU 486-induced relaxation was also analyzed; thus, the relaxing effect induced by RU 486 alone was compared to that of tissues that were preincubated for 30 min with progesterone at 100 μM and then treated with 100 μM RU 486 for 30 min.

2.4. RU 486 response on contraction induced by high potassium

This protocol was employed to examine the effect of RU 486 on the contractile response generated by high potassium (40 mM KCl). The tissues were depolarized by replacing normal Krebs–Henseleit solution with an equimolar substitution of 40 mM KCl and 84 mM NaCl. A tonic contraction was elicited and recorded for approximately 120 min (control response); then, the myometrial tissues were washed with normal Krebs–Henseleit solution (repolarized). When the tone reached baseline, the tissues were allowed to equilibrate for 30 min and then 40 mM KCl was added again. After a stable contractile tension was attained (~30 min), 100 μM RU 486 (highest concentration tested, in a single addition, to induce the *R*_{max} on spontaneous contraction) or 100 μM progesterone were separately added, and the effect of each compound was recorded for 30, 60 and 90 min. Finally, the tissues were washed and allowed to reequilibrate for 30 min before inducing the last contraction to KCl which was recorded for 120 min to assess tissue recovery and viability. In a separate group of vehicle–control experiments, KCl-induced contraction was determined after exposure to the vehicle for each compound (absolute ethanol; the addition never exceeded 0.1% v/v). However, to explore RU 486-induced relaxation at higher concentrations, some experiments were performed by applying 5 consecutive additions of 100 μM RU 486 (final concentration 500 μM), given cumulatively with an interval of approximately 5 min between each addition. Accordingly, in different tissues, 0.1% absolute ethanol was also applied five times under the same protocol.

In other experiments, myometrial strips precontracted with KCl were incubated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (40 μM) or the transcription inhibitor actinomycin D (10 μM) for 30 min. Subsequently, 100 μM RU 486 was added and its effect (evaluated during 30, 60 and 90 min) was compared in the absence

and in the presence of these inhibitors. The inhibitor concentrations used were high enough to completely inhibit protein synthesis [20] and transcription [21]. In addition, the effect produced by the final volume of vehicle (0.1% absolute ethanol) for each substance was analyzed in independent experiments.

2.5. Effect of RU 486 on contractile responses to different uterotonic agents

In these experiments the spontaneous contractility was recorded for 30 min; subsequently, 100 nM oxytocin was added and when the contractile activity generated was stable, a 30-min control time was recorded. Immediately, RU 486 was applied at different noncumulative concentrations (0.1–100 μ M; only a single concentration was added to each strip) and the response was determined for 30 min. The transient action of oxytocin only allowed evaluation of the response for 30 min.

To compare the sensitivity of oxytocin-induced contraction to RU 486-induced uterine relaxation, the same procedure was followed on the contraction induced by different PGs: natural (PGF_{2 α} or PGE₂) and synthetic (misoprostol). Therefore, in other myometrial strips, the relaxant efficacy of RU 486 at 100 μ M (the highest concentration tested on spontaneous contraction) was analyzed for the contractile response to each PG at 1 μ M, and the effect was evaluated for 30, 60 and 90 min. To examine if the response to PGs was potentiated by RU 486, in a series of experiments the opposite treatment was employed: after 30 min of RU 486-induced relaxation at 100 μ M, each PG was separately added at 1 μ M and the effect was recorded for 30, 60 and 90 min.

Additionally, the effect of 100 μ M progesterone was also evaluated in different myometrial strips for the contraction generated by each uterotonic agent under the same experimental protocol. In parallel independent experiments, the effect produced by the final volume of the vehicle (0.1% absolute ethanol) was analyzed on contraction induced by each uterotonic agent.

2.6. Potential calcium channel antagonism

In another assay, RU 486 was analyzed in myometrial strips depolarized with a KCl–Ca²⁺ free solution (KCl–Ca²⁺ Φ ; a depolarizing 40 mM KCl solution modified by addition of 2 mM EGTA and without CaCl₂). A transient contraction was obtained to KCl–Ca²⁺ Φ solution and, when the baseline was reached, 2.5 mM CaCl₂ was added to evoke a reproducible tonic contraction, which was recorded for 30 min (control); then, the tissues were preincubated with 100 μ M RU 486 for 10 min before the addition of CaCl₂ at 2.5 mM. Under these conditions, the contraction induced by CaCl₂ was recorded for 30 min, which was compared with the corresponding control. Subsequently, the tissues were washed and a CaCl₂-induced contraction was elicited again. The washout was done three times with KCl–Ca²⁺ Φ solution after all CaCl₂ contractions. Collaterally, the response produced by the final volume of the RU 486 vehicle (0.1% absolute ethanol) was analyzed in independent experiments under the same experimental conditions.

2.7. Drugs

With the exception of oxytocin (Syntocinon; Novartis Farmacéutica México), the remaining compounds were all purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA) and included: Mifepristone (RU 486; 17 β -hydroxy-11 β -(4-dimethylaminophenyl)-17 α -(prop-1-ynyl)-estra-4,9-dien-3-one), progesterone (4-pregnen-3,20-dione), the protein synthesis inhibitor (cycloheximide; 3-[2-(3,5-dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl]glutarimide), the transcription inhibitor (actinomycin D; dactinomycin), PGF_{2 α} ,

PGE₂, misoprostol. RU 486, progesterone, PGs, and the inhibitors of protein synthesis and transcription were dissolved in absolute ethanol as stock solutions, and then diluted to working concentrations in absolute ethanol; 10 μ l aliquots were added to the 10 ml bath chambers, which never exceeded 0.1% v/v of vehicle. Oxytocin was dissolved in distilled water. Actinomycin D was kept in the dark to avoid light-induced degradation).

2.8. Data presentation and statistical analysis

Each experiment was performed on myometrial strips prepared from different patients. All data in the text and figures are expressed as mean \pm SEM ($n=6$ experiments, where $n=1$ represents one patient). The concentration for each substance is expressed as a final concentration in the organ bath. Changes in contractile force are shown as percentage of the inhibition of the contraction.

The effect of RU 486 on the spontaneous, KCl-, oxytocin-, and PG-induced contraction was evaluated by comparing the area under the curve of the contraction before (control 100%) and after RU 486 addition. The preventive effect of RU 486 on the CaCl₂-induced contraction in depolarized tissues was compared with the experimental responses (the previous control contraction set at 100%). The efficacy of RU 486 is expressed as the R_{max} (the maximal relaxation obtained by RU 486 at 100 μ M). The unpaired Student's t -test was utilized to compare the responses between two groups, where $n=6$ represents one group. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of RU 486-induced relaxation on spontaneous myometrial contractility

RU 486 in the concentration range of 0.1–100 μ M inhibited the spontaneous contractions of pregnant uteri at term. The effect of RU 486 was immediate at onset and after three washouts contractile activity of the uteri was almost completely recovered (Fig. 1A). The degree of recovery was variable for each experiment, depending of the concentration of RU 486, number of washes, and time of tissue stabilization. No difference was found in the effect induced by each concentration evaluated for 30 min, although all concentrations presented a slight but statistically significant ($p < 0.0005$) relaxing effect; the amplitude of the contraction decreased with a small increment in the frequency but an evident relaxation of about 7–12% of relaxation was still observed. The concentration-dependent effect of RU 486 became evident after 60 min, clearly showing that the utero-relaxing effect induced by RU 486 was also time-dependent (Fig. 1B). The relaxing effect of RU 486 at all concentrations tested was significantly different ($p < 0.0005$) when compared to that produced by 0.1% ethanol (a volume identical to that used as a solvent for RU 486), which relaxed no more than $4.6 \pm 1.5\%$ ($n=6$) at 90 min (Fig. 1B). Moreover, 0.5% ethanol (the volume when adding 500 μ M RU 486) relaxed no more than $6.82 \pm 1.5\%$ ($n=6$) at 90 min, which was significantly different ($p < 0.005$) to that produced by RU 486 at 500 μ M. The effect induced by RU 486 at the higher concentration (500 μ M applied in an additive manner) was not significantly different ($p > 0.05$) as compared to the R_{max} induced by 100 μ M at 30, 60, and 90 min (see Fig. 1B).

The relaxation induced by 100 μ M progesterone was not significantly different ($p > 0.05$) when compared to equimolar concentrations of RU 486 over a 30-min period, but at 60 and 90 min progesterone was more efficacious ($p < 0.05$) than RU 486 (Fig. 2A). Additionally, progesterone-induced relaxation was not

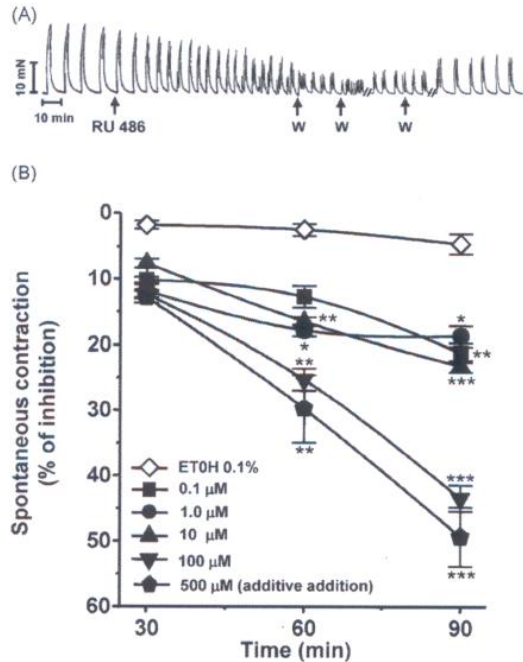


Fig. 1. Relaxing effect of RU 486 on spontaneous contractile activity of pregnant human myometrium at term. (A) Typical recording of the spontaneous contractility and the fast relaxing effect of RU 486 at 100 μ M; note the contraction recovery after washout (W), showing that the effect caused by RU 486 was reversible. (B) Time-dependent effect of RU 486 at different concentrations evaluated for 90 min on spontaneous contractility. Statistical significance ($p < 0.05$, $^{**}p < 0.005$, $^{***}p < 0.0005$) vs. the effect induced at 30 min. Each concentration tested was significantly different ($p < 0.05$) as compared with that of vehicle (absolute ethanol 0.1%; ETOH). The effect induced at 100 μ M was not significantly different ($p > 0.05$) as compared with the effect induced at 500 μ M. Each symbol in the graph represents the mean \pm SEM of six independent experiments.

blocked by pretreatment with RU 486 and likewise, RU 486-induced relaxation was not blocked by pretreatment with progesterone; on the contrary, these combinations induced greater relaxation than either compound alone (Fig. 2B). These effects were significant ($p < 0.0005$) when compared to those produced by the vehicle-controls for progesterone and RU 486 (0.1% absolute ethanol for each one), which relaxed no more than $1.8 \pm 0.6\%$ ($n = 6$).

3.2. Effect of RU 486-induced relaxation on KCl-induced contraction

Tonic contraction induced by KCl was relaxed by RU 486 at 100 μ M, an effect which was induced within ~ 2 min and was time-dependent. A total recovery of the amplitude and tone of KCl-induced contraction was observed after washout. RU 486 at 500 μ M, by additive addition, induced a greater relaxation than that induced at 100 μ M. In addition, 100 μ M progesterone were more effective than RU 486 in producing relaxation of KCl-contracted tissues (Fig. 3A). The relaxing effect of RU 486 was statistically different at all concentrations ($p < 0.0005$) when compared to that produced by 0.1% ethanol or by five consecutive additions ($p < 0.005$), which relaxed no more than $3.80 \pm 1.32\%$ and $4.18 \pm 0.90\%$ at 90 min, respectively. The relaxing effect of RU 486 on the KCl-induced contraction was not prevented by cycloheximide or actinomycin D (Fig. 3B), and their vehicle (0.1% absolute ethanol each) did not alter ($p < 0.005$) KCl-induced contraction (data not shown).

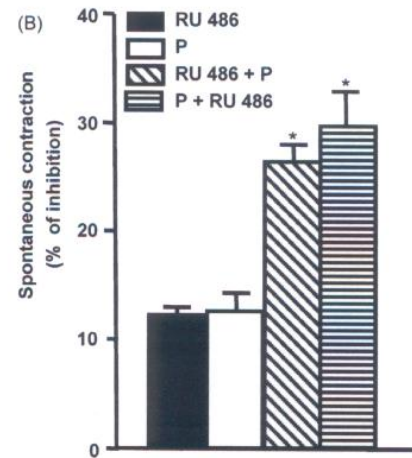
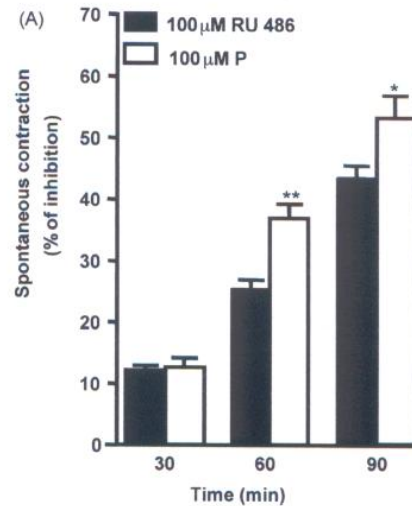


Fig. 2. Relaxation induced by RU 486 and progesterone (P) on the spontaneous contractility of pregnant human myometrium at term. (A) Comparison of the relaxing effect ($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.005$) induced by RU 486 and P tested equimolarly at 100 μ M. (B) P-induced relaxation at 100 μ M, evaluated for 30 min, was unaffected in the presence of 100 μ M RU 486 as well as RU 486-induced relaxation at 100 μ M was not prevented in the presence of 100 μ M P, but the relaxation produced by these combinations was significantly augmented ($^{*}p < 0.0005$). Each bar represents the mean \pm SEM; $n = 6$.

3.3. Effect of RU 486-induced relaxation on contraction induced by oxytocin and PGs

Fig. 4 illustrates the relaxing response elicited by 100 μ M RU 486 on oxytocin- and PG-induced contraction (PGF_{2 α} , PGE₂, or misoprostol). Pretreatment with RU 486 did not enhance the response to PGs, observing a decrease in the contractile response induced by PGF_{2 α} ($47.5 \pm 2.5\%$), PGE₂ ($74.3 \pm 5.4\%$), and misoprostol ($55.2 \pm 6.0\%$) evaluated for 90 min. The contractions generated by these uterotonic agents were significantly more sensitive ($p < 0.0005$) to progesterone-induced relaxation than those induced by RU 486 evaluated at the same concentration (100 μ M) every 30 min. In the particular case of misoprostol-induced activity, a relaxing effect was observed after the addition of RU 486, as the amplitude of the contraction decreased, while the frequency increased slightly (Fig. 4E). The vehicle for RU 486 (0.1% absolute ethanol) did not modify the contraction to oxytocin or different

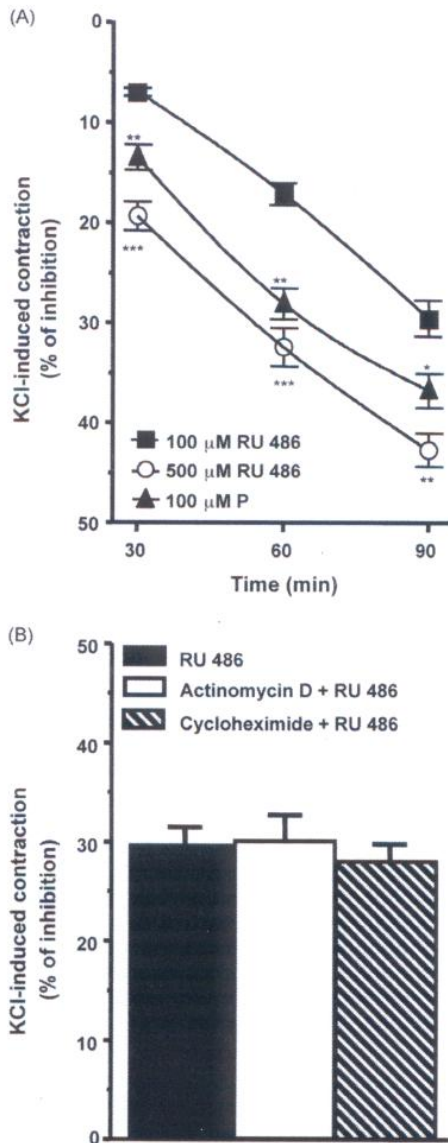


Fig. 3. Inhibitory effect of RU 486 or progesterone (P) on the contraction induced by KCl (40 mM) in pregnant human myometrium. (A) The inhibitory effect of RU 486 at 100 μM was significantly different ($p < 0.05$, $^{**}p < 0.005$, $^{***}p < 0.0005$) from the inhibitory effect elicited by RU 486 at 500 μM and P at 100 μM. (B) The effect of RU 486 at 100 μM evaluated for 90 min on KCl-induced contraction was not modified by the inhibitors of transcription (10 μM actinomycin D) or protein synthesis (40 μM cycloheximide). Each bar represents the mean \pm SEM; $n = 6$.

PGs ($p < 0.0005$; data not shown), as well as the vehicle for RU 486 and PGs (0.1% absolute ethanol for each compound) did not alter the spontaneous contractility (Fig. 4A).

3.4. Efficacy

Fig. 5 shows the statistical evaluation of RU 486-induced relaxation determined at different time points (30, 60, and 90 min; $n = 6$ for each interval) on spontaneous uterine contractility and on the contractile response to each uterotonic agent. The R_{max} value of RU 486 (100 μM) on spontaneous contraction was compared to the effect on KCl-, oxytocin-, and PGs-induced contraction at var-

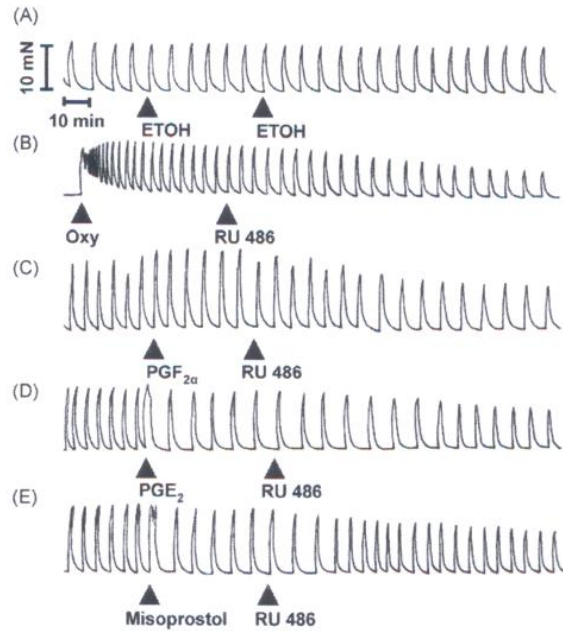


Fig. 4. Typical recordings of contractile activity in pregnant human myometrium at term. (A) The vehicle for prostaglandins and RU 486 (absolute ethanol; ETOH 0.1%) had no significant effect ($p > 0.05$) on myometrial contractility. Note the relaxing effect induced by RU 486 at 100 μM on the contractile response generated by: (B) oxytocin (Oxy; 100 nM); (C) Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$; 1 μM); (D) Prostaglandin E_2 (PGE_2 ; 1 μM); and (E) Misoprostol (1 μM).

ious time points to determine the relaxing efficacy of RU 486. Indeed, the efficacy of RU 486 was different on the response to different uterotonic activities as compared to the spontaneous contraction. In general, contractions stimulated by each uterotonic agents were significantly less sensitive to RU 486-induced relaxation than the spontaneous contractions, but when evaluated for 30 min, the oxytocin-induced contraction was more sensitive to RU 486-induced relaxation than the spontaneous contraction (for further details, see Fig. 5). Remarkably, it was also observed that

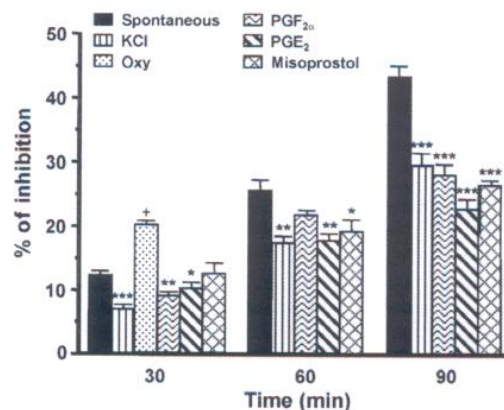


Fig. 5. Comparison of the inhibition caused by RU 486 at 100 μM evaluated for 30, 60, and 90 min on the spontaneous contractile activity and the contraction induced by high potassium (KCl 40 mM), oxytocin (Oxy 100 nM), and prostaglandins ($PGF_{2\alpha}$, PGE_2 , and misoprostol) at 1 μM. The inhibitory effect of RU 486 was significantly reduced ($p < 0.05$, $^{**}p < 0.005$, $^{***}p < 0.0005$) or increased ($^{*}p < 0.0005$) when compared to the effect produced on spontaneous contraction. Each bar represents the mean \pm SEM; $n = 6$.

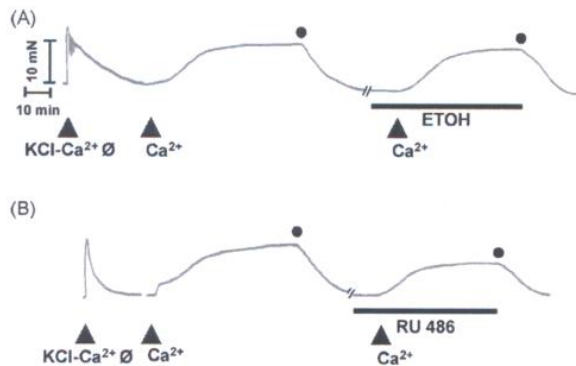


Fig. 6. Effect of RU 486 (100 μ M) on calcium-induced contraction at 2.5 mM (Ca^{2+}) in pregnant human myometrium at term previously depolarized by high potassium–calcium free solution ($\text{KCl-Ca}^{2+}\Phi$). (A) The vehicle for RU 486 (absolute ethanol; ETOH 0.1%) had no effect ($p > 0.05$) on the contraction induced by Ca^{2+} . (B) The Ca^{2+} contraction was notably prevented by 100 μ M RU 486. The solid black line indicates the incubation time with ETOH or RU 486, and the black circles represent the time of washout.

progesterone is more effective than RU 486 in producing myometrial relaxation, due to the fact that when progesterone and RU 486 were separately tested at 100 μ M, the relaxation to progesterone was consistently greater than that induced by RU 486. In this context, it is important to clarify that different concentrations of RU 486 on spontaneous contractility and oxytocin-induced contractions did not produce a complete concentration–response curve; thus, the R_{max} did not attain 50% inhibition ($R_{\text{max}} = 12.34 \pm 0.66$ and $19.95 \pm 0.64\%$ of inhibition, respectively), which did not allow evaluation of the potency of RU 486 calculated through inhibitory concentration 50 (IC_{50}).

3.5. Effect of RU 486 on calcium-induced contraction in depolarized myometrium

In previously depolarized tissues, a tonic contraction was induced by CaCl_2 (2.5 mM), which was partially prevented when tissues were preincubated with 100 μ M RU 486 (30.6 \pm 0.9% of inhibition, $n = 6$), observing that the amplitude was significantly decreased (Fig. 6). The calcium antagonistic effect induced by RU 486 was completely reversible upon washing out the tissue and removing the antiprogesterin (data not shown). Importantly, the prevention of this CaCl_2 contraction by RU 486 was significantly greater than its inhibitory effect on spontaneous contraction (12.34 \pm 0.66%; $n = 6$). The final volume of RU 486 vehicle (0.1% absolute ethanol) did not significantly affect the CaCl_2 -induced contraction (2.3 \pm 0.5% of inhibition; $n = 6$, $p > 0.05$).

4. Discussion

The present findings demonstrate that RU 486 is capable of inducing a rapid and reversible relaxing effect on spontaneous uterine contractility and on contractions induced by various uterotonic agents. To our knowledge, this is the first systematic study to show an initial relaxing effect of the antiprogesterin RU 486 in human pregnant myometrium, which reveals that this antiprogesterin may induce an antiuterotonic effect prior to its genomic antiprogesterone action.

Neither transcriptional nor translational inhibitors altered RU 486-induced relaxation; thus, the rapid and reversible uterine relaxing effect of RU 486 does not require gene expression or protein synthesis. Indeed, this finding supports a progesterone-like, nongenomic mechanism of action prior to its antagonistic effect

on the progesterone receptor. RU 486 is classically described as an antiprogesterin but the present data reveal an agonistic action at the nongenomic level by inducing a myometrial relaxation similar to progesterone but with a lower relaxing efficacy. Likewise, we have observed that RU 486 does not function as a nongenomic antagonist of progesterone, because progesterone-induced myometrial relaxation still occurs in uterine tissues pretreated with RU 486. This indicates that this antiprogesterin did not interfere with the nongenomic action of progesterone in the uterus. In addition, progesterone did not block RU 486-induced relaxation; on the contrary, progesterone and RU 486 synergized to produce a greater relaxation together than either agent did alone. It is noted that RU 486 was incapable of enhancing the contractile responses to oxytocin or PGs; in fact, these contractile responses were diminished in the presence of RU 486.

Consistent with our results, previous *in vitro* studies have shown that RU 486 may induce a nongenomic uterine relaxation in rats [18,19]. In line with these observations, two *in vitro* studies indirectly observed that RU 486 induced a rapid relaxant effect on the spontaneous contractility of the nonpregnant uterus, with pathological implications in women in the perimenopausal period [22,23]. However, no evidence had been shown for pregnant human uterine contractility (the endocrine condition for the therapeutic use of RU 486), whereas nongenomic RU 486-induced uterine relaxation was observed in the present study. Although numerous lines of evidence have demonstrated the genomic antiprogesterone action of RU 486 to increase uterine contractility, some reports have documented that RU 486 fails to induce labor. In monkeys, RU 486 only produces slight uterine contractions, which are insufficient to induce labor [24]. Similarly, during late pregnancy in the rhesus macaque, this antiprogesterin elicits only a transient decrease in uterine contractile activity, followed by an attenuated increment of irregular contractions 8 h later, which are not sufficient to induce delivery [25]. Hence, these findings may be attributed to the early nongenomic relaxant effect induced by RU 486.

The present findings show that RU 486 is capable of relaxing various types of uterine contractions. In general, the spontaneous contractility appears more sensitive to RU 486-induced relaxation than the contractions elicited by KCl, oxytocin and PGs. We observed a slight relaxing effect of RU 486 when evaluated at 30 min, but the efficacy was substantially greater at 60 and 90 min after administration. Admittedly, it is important to acknowledge that the concentration range of RU 486 tested in the present study was much lower (500–1500-fold) than the high therapeutic doses (200–600 mg) employed in the current clinical regimens. The low range of concentrations used in the present study resulted from the hydrophobic nature of RU 486; however, these concentrations are in the same μ M range of plasma levels of RU 486 observed in pregnant women after the intake of 400 and 600 mg doses (reviewed by [26]). Since we were unable to examine the effect at concentrations higher than 500 μ M in our system, it is possible that the efficacy of RU 486-induced relaxation could be enhanced at concentrations closer to its therapeutic doses.

The present study suggests that the uterine relaxing effect of RU 486 is mediated by a nongenomic action. Indeed, the relaxation produced by RU 486 on the KCl-induced contraction, and the partial prevention of the Ca^{2+} -induced contraction by RU 486 in a myometrium depolarized with $\text{KCl-Ca}^{2+}\Phi$ suggests that the relaxing effect of RU 486 involves, at least in part, a reduction of extracellular Ca^{2+} influx by blocking the voltage-operated Ca^{2+} channels. However, the fact that RU 486 is also capable of relaxing the contractile responses induced by oxytocin and PGs implies that this antiprogesterin may also block the receptor-operated Ca^{2+} channels as previously reported by progestins and androgens [5,17].

Remarkably, RU 486 represents a class of compound that is structurally related to steroid hormones; hence, this antiprogesterin may possess the same nongenomic properties as the sex steroid hormones (progesterins and androgens) to induce myometrial relaxation, but with a different efficacy.

From the clinical point of view, the minimal time needed to sensitize the uterus to the contractile action of PGs after treatment with RU 486 has been a matter of much interest. Nevertheless, the paradoxical initial relaxing effect of RU 486 on uterine contractile activity reported in this study should be taken in account in clinical studies that are currently investigating shorter intervals between administration of RU 486 and PG with the goal of acceleration the induction of abortion in medical regimens employing RU 486. Taken together, the available data, together with the present study indicate that RU 486 inhibits (nongenomically) or stimulates (genomically) myometrial contractile activity depending on the time-course of RU 486 administration. Accordingly, the present findings could provide a better understanding on the entire action of RU 486.

Finally, it is important to keep in mind that the time interval between RU 486 administration and the appearance of uterine contractions produced by increased sensitivity to PGs, is 24–36 h, and is maximal at 36–48 h after RU 486 [7]. Considering this time-frame, it is crucial to analyze the possible role of pharmacokinetic factors in the action of this drug. Orally administered, RU 486 is rapidly metabolized *in vivo* (1–2 h) because of rapid absorption and a short half-life of 25–30 h, with extensive metabolism by demethylation and hydroxylation [27]. On this basis, it is reasonable to assume that over this time-frame RU 486 may initially induce relaxing effect, followed by genomic antiprogesterone action mediated by its metabolites. Further analysis of its nongenomic relaxing action as well as its metabolism may shed new light on RU 486 actions on uterine function.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Lorena González and Dr. Nohemi Alejandre for providing the myometrial tissues for this study. This study was financed by a grant from *Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/Dirección General de Asuntos del Personal Académico*, Project No. IN202507-3, and was written during a sabbatical leave of M. Perusquía (September 2008–August 2009) at Texas A&M University, jointly supported by *Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM* (PASPA), and by Texas A&M University. This study was performed during the postgraduate studies of E. Navarrete at the *Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM*.

References

- [1] Csapo AI. Progesterone block. *Am J Anat* 1956;98:273–91.
- [2] Perusquía M. Nongenomic action of steroids in myometrial contractility. *Endocrine* 2001;15:63–72.
- [3] Perusquía M, García-Yañez E, Ibáñez R, Kubli-Garfias C. Non-genomic mechanism of action of Δ -4 and 5-reduced androgens and progesterins on the contractility of the isolated rat myometrium. *Life Sci* 1990;47:1547–53.
- [4] Putnam CD, Brann DW, Kolbeck RC, Mahesh VB. Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites: mediation by progesterone and gamma amino butyric acid_A receptor systems. *Biol Reprod* 1991;45:266–72.
- [5] Perusquía M, Jasso-Kamel J. Influence of 5 α - and 5 β -reduced progesterins on the contractility of isolated human myometrium at term. *Life Sci* 2001;68:2933–44.
- [6] Ruddock NK, Shi SQ, Jain S, Moore G, Hankins GD, Romero R, et al. Progesterone, but not 17- α -hydroxyprogesterone caproate, inhibits human myometrial contractions. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:391–7.
- [7] Swahn ML, Bygdeman M. The effect of the antiprogesterin RU 486 on uterine contractility and sensitivity to prostaglandin and oxytocin. *Br J Obstet Gynaecol* 1988;95:126–34.
- [8] Bygdeman M, Swahn ML. Progesterone receptor blockage: effect on uterine contractility and early pregnancy. *Contraception* 1985;32:45–51.
- [9] Cameron IT, Michie AF, Baird DT. Therapeutic abortion in early pregnancy with antiprogesterin RU 486 alone or in combination with prostaglandin analogue (gemeprost). *Contraception* 1986;34:459–68.
- [10] UK Multicentre Trial. The efficacy and tolerance of mifepristone and prostaglandin in first trimester termination of pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1990;480–6.
- [11] World Health Organization. Termination of pregnancy with reduced dose of mifepristone. *Br Med J* 1993;532–7.
- [12] Ulmann A, Silvestre L, Chemama L, Rezvani Y, Renault M, Aguilhaume CJ, et al. Medical termination of early pregnancy with mifepristone (RU 486) followed by a prostaglandin analogue. Study in 16,369 women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992;71:278–83.
- [13] Garfield RE, Blennerhassett MG, Miller SM. Control of myometrial contractility: role and regulation of gap junctions. *Oxf Rev Reprod Biol* 1988;10:436–90.
- [14] Norman JE, Thong KJ, Baird DT. Uterine contractility and induction of abortion in early pregnancy by misoprostol and mifepristone. *Lancet* 1991;338:1233–6.
- [15] Rådestad A, Christensen NJ, Strömberg L. Induced cervical ripening with mifepristone in first trimester abortion. A double-blind randomized biomechanical study. *Contraception* 1988;38:301–12.
- [16] World Health Organization. Cervical ripening with mifepristone (RU 486) in late first trimester abortion. *Contraception* 1994;461–75.
- [17] Perusquía M, Navarrete E, Jasso-Kamel J, Montaña LM. Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a nongenomic action on L-type calcium channels. *Biol Reprod* 2005;73:214–21.
- [18] Perusquía M, Kubli-Garfias C. Progesterone-like relaxant effect of RU 486 in the rat myometrium. *Life Sci* 1994;54:1501–6.
- [19] Parra J, Cantabrana B, Hidalgo A. Mechanism of mifepristone-induced spasmolytic effect on isolated rat uterus. *Life Sci* 2000;66:2563–9.
- [20] Waring P. DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *J Biol Chem* 1990;265:14476–80.
- [21] Perry RP, Kelley DE. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J Cell Physiol* 1970;76:127–39.
- [22] Lobaccaro-Henri C, Sainot M, Laffargue F, Zahradnik HP, Descomps B, Thaler-Dao H. Effect of the progesterone antagonist RU 486 on human myometrial spontaneous contractility and PGI₂ release. *Prostaglandins* 1992;44:443–55.
- [23] Lobaccaro-Henri C, Descomps B, Thaler-Dao H. RU 38486 inhibits intracellular calcium mobilization and PGI₂ release from human myometrium: mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;59:63–73.
- [24] 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;160:45–7.
- [25] 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;157:1487–95.
- [26] Sitruk-Ware R, Spitz IM. Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies. *Contraception* 2003;68:409–20.
- [27] Heikinheimo O, Kekkonen R, Lahteenmaki P. The pharmacokinetics of mifepristone in humans reveal insights into differential mechanisms of antiprogesterin action. *Contraception* 2003;68:421–6.

Anexo 2. Aprobación del proyecto por la Comisión de Bioética para Investigación en Humanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
APARTADO POSTAL 70228
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MÉXICO, D. F.

DRA. MERCEDES PERUSQUÍA NAVA
Investigador Titular
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Estimada Dra. Perusquía:

La Comisión de Bioética para Investigación en Humanos de este instituto ha revisado el proyecto de investigación "*Determinación de la acción antiuterotónica y vasodilatadora de RU 486 (MIFEPRISTONA) en el miometrio y la arteria umbilical del humano*". De acuerdo a los lineamientos de nuestro Código Ético, este proyecto cae dentro de la categoría que no requiere de una revisión exhaustiva por no implicar riesgo alguno para los participantes. Por lo anterior, esta Comisión emite un **dictamen aprobatorio**.

ATENTAMENTE,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, a 22 de octubre de 2009.
POR LA COMISIÓN

DR. SIMÓN KAWA

C.c.p. Archivo

MEFC/nbb