



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFEECTO ÚTERO-RELAJANTE Y ANTIINFLAMATORIO DE DOS  
ANÁLOGOS DE TALIDOMIDA EN ÚTERO AISLADO DE RATA  
GESTANTE

T E S I S  
QUE PARA OBTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
VICTOR MANUEL MUÑOZ PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. HÉCTOR ANTONIO PONCE MONTER  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZA VALETA  
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar mi agradecimiento, al Programa de Ciencias Biomédicas, y a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, al Instituto de Ciencias de Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, UAEH, así como también, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por permitirme realizar y concluir con mi Doctorado.

Me gustaría también agradecer a mi tutor, el Dr. Héctor Antonio Ponce Monter, y a los miembros de mi comité tutor, a la Dra. Leticia Rocha Zavaleta y al Dr. Emilio Rojas del Castillo, así como también, al Dr. Tomas Eduardo Fernández Martínez, por toda la ayuda y apoyo que me brindaron en la parte experimental del proyecto, y en la revisión de mi Tesis, y estoy muy agradecido por la amistad y los consejos que me brindaron durante mi doctorado.

Estoy profundamente agradecido con toda mi familia por su paciencia, el amor, la orientación y el apoyo que me brindaron. En especial a mi mujer, la Dra. Elena Cecilia Romero Romero, quien me motivo a continuar con mi formación profesional.

# Contenido

Lista de Abreviaciones .....	5
Anexo .....	6
1. Resumen .....	7
2. Introducción.....	8
2.1. Parto Prematuro.....	8
2.2. Etiología .....	9
2.3. Tocolíticos para el Parto Prematuro .....	11
2.4. Infección, Inflamación e Inmunomodulación en el Parto Prematuro .....	16
2.5. AMPc en la relajación del músculo liso uterino del Parto Prematuro .....	19
2.6. Inhibidores de Fosfodiesterasas 4, PDE4 .....	22
2.7. Talidomida y sus análogos.....	25
3. Objetivos .....	27
3.1. Objetivo General .....	27
3.2. Objetivos Particulares.....	27
4. Materiales y Métodos .....	28
4.1. Animales.....	28
4.2. Fármacos y Soluciones .....	29
4.3. Estudio funcional de contractilidad <i>in vitro</i> .....	29
4.4. Acumulación de AMPc en útero de rata gestante .....	31
4.4.1. Cultivo tisular de útero de rata gestante.....	31
4.4.2. Homogenización de útero de rata .....	32
4.4.3. Cuantificación de AMPc .....	33
4.5. Estudio del efecto antiinflamatorio e inmunomodulador .....	33
4.5.1. Cultivo tisular .....	33
4.5.2. Cuantificación de <i>TNF-<math>\alpha</math></i> , <i>IL-1<math>\beta</math></i> e <i>IL-10</i> .....	34
4.5.3. Análisis Estadístico.....	35
5. Resultados .....	36

<b>5.1. Análogos inhiben la contracción fásica y tónica en útero de rata gestante .....</b>	<b>36</b>
<b>5.2. Análogos de talidomida incrementan el AMPc en útero de rata gestante .....</b>	<b>42</b>
<b>5.3. Análogos de talidomida inhiben citocinas proinflamatorias TNF-<math>\alpha</math> e IL-1<math>\beta</math> inducidas por LPS, e incrementan la citocina antiinflamatoria IL-10 .....</b>	<b>44</b>
<b>6. Discusión .....</b>	<b>50</b>
<b>7. Conclusión.....</b>	<b>55</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>56</b>

## Lista de Abreviaciones

Todos los símbolos y abreviaciones fueron usados de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB: Nomenclatur and symbolism for Amino Acids and Peptides [1].

AC	Adenililciclase o Adenilato Ciclase
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
BCC	Bloqueadores de canales de calcio
Gi	Proteína-G inhibidora
Gs	Proteína-G estimuladora
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
ic	intracelular
IL	interleucina
IU	infección intrauterina
LPS	Lipopolisacarido
PDEs	Fosfodiesterasas
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PP	Parto Prematuro
Proteína-G	Proteína heterotrimérica reguladora de unión a nucleótidos-guanina
RPM	Ruptura Prematura de Membranas
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral-alfa

## Anexo

El siguiente artículo está relacionado con este trabajo de tesis doctoral, se anexaran tres links para su búsqueda en línea.

**AMA** Muñoz-Pérez VM, Fernández-Martínez E, Ponce-Monter H, Ortiz MI. Relaxant and anti-inflammatory effect of two thalidomide analogs as PDE-4 inhibitors in pregnant rat uterus. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2017;21(4):429-437. doi:10.4196/kjpp.2017.21.4.429.

**MLA** Muñoz-Pérez, Víctor Manuel et al. “Relaxant and Anti-Inflammatory Effect of Two Thalidomide Analogs as PDE-4 Inhibitors in Pregnant Rat Uterus.” *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 21.4 (2017): 429–437. *PMC*. Web. 14 Aug. 2017.

**APA** Muñoz-Pérez, V. M., Fernández-Martínez, E., Ponce-Monter, H., & Ortiz, M. I. (2017). Relaxant and anti-inflammatory effect of two thalidomide analogs as PDE-4 inhibitors in pregnant rat uterus. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 21(4), 429–437. <http://doi.org/10.4196/kjpp.2017.21.4.429>

# 1. Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto útero-relajante y antiinflamatorio de dos análogos de talidomida como inhibidores de la enzima fosfodiesterasa-4 (PDE-4) en útero aislado de rata gestante. Los úteros de ratas de la cepa Wistar fueron aislados en el día 19 de gestación. Las muestras uterinas fueron empleadas en estudios funcionales para evaluar el efecto inhibitorio de los análogos, 3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenilo)-propanoato de metilo (4NO2FDPM<sub>e</sub>) y el segundo el 3-(4-aminoftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenilo)-propanoato de metilo (4AFDPM<sub>e</sub>), sobre las contracciones fásicas inducidas por prostaglandina-F<sub>2</sub> $\alpha$ , y las contracciones tónicas inducidas con K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. La acumulación de AMPc fue cuantificada con la técnica de ELISA. El efecto antiinflamatorio fue evaluado usando ELISA para determinar las citocinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-(IL)-1 $\beta$ , y la citocina antiinflamatoria IL-10, en explantes uterinos estimulados con lipopolisacárido (LPS). Nifedipina, forskolin y rolipram fueron usados como controles positivos. Los análogos inhibieron significativamente las contracciones uterinas inducidas por los estímulos fármaco- y electromecánicos. Nifedipina y forskolin fueron más potentes que rolipram, y el 4AFDPM<sub>e</sub> fue equiefectivo con nifedipina. Los análogos incrementaron los niveles uterinos de AMPc en forma dependiente de la concentración. La secreción uterina de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducida por LPS fue disminuyendo en forma dependiente de la concentración, mientras que la secreción de la IL-10 incremento significativamente. Los análogos mostraron el efecto útero-relajante y antiinflamatorio, que fue asociado con el incremento de AMPc en útero de rata gestante. Estas propiedades los coloca como agentes tocolíticos efectivos y potencialmente seguros en el área de la ginecología, como en los casos de parto prematuro.

## **2. Introducción**

### **2.1. Parto Prematuro**

En México y en el mundo el parto prematuro y el aborto espontáneo son partícipes de los principales problemas de morbilidad y mortalidad perinatal. En algunos países de bajos recursos, sigue siendo un grave problema de salud reproductiva, ya que no se cuenta con los medicamentos suficientes, seguros y eficientes para su control, además de causar varios efectos secundarios serios [2].

El parto prematuro (PP) es definido médicamente como el parto producido antes de la semana 37 de gestación, representa una complicación obstétrica frecuente en el embarazo, constituyendo una de las principales causas de muerte perinatal y de secuela a largo plazo en el sobreviviente [3]. Anualmente, se estiman casi 15 millones de partos prematuros en todo el mundo, y ocurre entre 15 - 20% de los nacimientos en la mayoría de los países subdesarrollados o del tercer mundo. Mientras más corto es el período del embarazo, más alto es el riesgo de presentar complicaciones; los bebés que nacen de forma prematura tienen un riesgo de muerte alto en sus primeros años de vida. Existe también un alto riesgo de desarrollar problemas de salud serios como: parálisis cerebral, enfermedades crónicas pulmonares, problemas gastrointestinales, retraso mental, pérdida de la visión, el oído, así como complicaciones a largo plazo en adultos: cognitivas, socio-conductuales, problemas de salud y crecimiento [4-6]

Existen factores de riesgo que predisponen al parto prematuro e incluso pueden llevar al aborto espontáneo. Dentro de los más importantes tenemos algunas enfermedades de la madre como infecciones de las vías urinarias, vaginales o sistémicas, enfermedades renales,

cardíacas, diabetes, anemias severas, alteraciones tiroideas, abortos o partos pretérmino previos, anomalías uterinas como la miomatosis y el cáncer uterino [2].

## **2.2. Etiología**

No se conoce una causa única, pero existen diversos factores que están relacionados con el PP; de hecho, se conoce como una entidad heterogénea y multifactorial, asociado a variables socio-biológicas, socio-económicas, y complicaciones del embarazo. Las infecciones de madres a sus bebés (infecciones intrauterinas y de nacimiento) son actualmente un importante reto a nivel global [2, 7]. Algunos estudios epidemiológicos y clínicos han identificado una serie de factores que incrementan el riesgo de ruptura prematura de membrana (RPM) en el parto prematuro. Estos incluyen: infecciones de tracto reproductivo materno (vaginitis bacteriana por tricomonas, gonorrea, clamidia, y Corioamnionitis oculta); conductuales (tabaquismo, abuso de sustancias, estado nutricional y relaciones sexuales); complicaciones obstétricas (embarazo múltiple, polihidramnios, incompetencia ístmica cervical, hemorragias durante el embarazo y trauma durante el embarazo, y cambios ambientales (presión barométrica). Los resultados de los estudios epidemiológicos, clínicos, histológicos, microbiológicos y de biología molecular sustentan que la infección focal y la inflamación juegan un papel primario y secundario en la patogénesis de la RPM en el parto prematuro [8, 9].

En particular, la invasión de bacterias en la cavidad amniótica es la causa fundamental de la mortalidad neonatal mundial; de hecho, las infecciones uterinas (IU) representan alrededor del 40% de los casos de PP en todo el mundo. Las infecciones

amnióticas están presentes en casi el 50% de todos los PP resultantes de la IU, y la edad gestacional temprana se relaciona muy frecuentemente con la IU [10-12].

La IU se define por la presencia de microorganismos patógenos en la cavidad amniótica o en el espacio corio-amniótico, que puede demostrarse mediante una muestra de líquido amniótico obtenido por amniocentesis. Se han propuesto cuatro etapas progresivas en la IU ascendente: 1) Sobrecrecimiento de microorganismos patógenos en la vagina y el cuello uterino, por ejemplo: vaginosis bacteriana o vaginitis (VB); 2) acceso de los patógenos a la cavidad uterina localizándose en la decidua y promoviendo una reacción inflamatoria local, -deciduitis-, y posterior extensión al corion; 3) la infección alcanza el amnios “amnionitis” y la cavidad amniótica; 4) las bacterias acceden de la cavidad amniótica al feto por diferentes vías de entrada, por aspiración de líquido a neumonía, por siembra a infección localizada como otitis, conjuntivitis, onfalitis y, la propagación desde estos sitios a la circulación fetal que determinan la bacteriemia y la septicemia fetal [13]. Se ha reportado que la septicemia y la bacteriemia fetal están directamente relacionados con daños al sistema nervioso central y sistema circulatorio del neonato. Además, las infecciones se han relacionado con el síndrome de respuesta inflamatorio fetal que condiciona la aparición de trastornos autoinmunes en las diferentes etapas de vida de los afectados; de hecho, las infecciones placentarias y perinatales incrementan el riesgo de padecer autismo, esquizofrenia, déficit neurosensorial, psicosis y alergias [14, 15].

La mayoría de las infecciones o anomalías uterinas producen cambios fisiológicos en el espacio decidual-coriónico, en la membrana fetal y en el miometrio, que desencadenan una inflamación local y la subsecuente liberación de citocinas como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6), que son capaces

de activar el metabolismo de fosfolípidos, liberar ácido araquidónico y activar finalmente el sistema de transducción de señales relacionado con el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) que incrementa la expresión de la ciclooxigenasa (COX-2), lo cual provoca la síntesis y la liberación de agentes uterotónicos, como las prostaglandinas (PG)-E<sub>2</sub> y PG-F<sub>2 $\alpha$</sub> , que estimulan las contracciones uterinas, provocando el parto prematuro [16, 17]. Ambas moléculas, prostaglandinas E<sub>2</sub> y F<sub>2 $\alpha$</sub> , estimulan la contracción activando la vía de la fosfolipasa C (PLC), inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) [18]. Se ha reportado incluso, que alteraciones del sistema inmunitario pueden desencadenar el proceso inflamatorio y la subsecuente iniciación del parto prematuro, cuyo origen sigue en investigación [19]. Estudios recientes han relacionado la inflamación y la infección intrauterina como desencadenantes principales del parto prematuro; de hecho, son factores que alteran el estado de reposo uterino e inducen contracciones uterinas. Además, la inflamación es un proceso natural en el término del embarazo; sin embargo, un factor contundente tan frecuente como la infección podría desencadenar prematuramente la contracciones uterinas y la ruptura prematura de membrana (RPM) [9].

### **2.3. Tocolíticos para el Parto Prematuro**

La amenaza de parto prematuro es un cuadro clínico que implica dentro del transcurso de un embarazo altos índices de morbilidad y mortalidad perinatal. Dentro de su manejo se encuentran varios tipos de medicamentos ya sean estos corticoides para estimular la maduración pulmonar, antibióticos para el tratamiento de las infecciones y fármacos tocolíticos para el control de las contracciones uterinas, y de esa forma prolongar el embarazo.

En la práctica ginecobstetrica, el parto prematuro se trata principalmente con fármacos tocolíticos. Los agentes tocolíticos que existen para tratar la amenaza de parto prematuro se clasifican en 5 principales grupos: Betamiméticos o agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, sulfato de magnesio, bloqueadores de calcio, inhibidores de la sintasa de prostaglandinas, antagonistas de Oxitocina. Asimismo, una de las principales funciones de los tocolíticos es detener o posponer la contracción uterina prematura. Pero, esto sigue siendo una controversia y ha sido cuestionado, porque no hay evidencia que muestre que los fármacos actuales puedan mejorar el resultado neonatal a largo plazo; además, algunos tocolíticos pueden causar efectos cardiovasculares, metabólicos y neuromusculares serios en la madre y el feto [20, 21].

Los betamiméticos o agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos tienen relación estructural con la adrenalina y la noradrenalina e incluyen ritodrina, terbutalina, salbutamol, hexoprenalina y orciprenalina. Su mecanismo de acción se relaciona con la unión a los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos en el músculo liso uterino, activan la enzima adenilato ciclasa y hacen que aumente el nivel de AMPc, disminuyendo el calcio libre y fosforila la cinasa de cadena ligera de la miosina, inhibiendo la contracción muscular. La terbutalina, así como los demás betamiméticos mencionados, se han estudiado ampliamente y su uso clínico está sujeto a observaciones por sus efectos adversos materno-fetales como: taquicardia, edema pulmonar, hipotensión, hiperglucemia, hidropesía fetal, hipocalcemia e hiperbilirrubinemia fetal [22]. La principal complicación más grave de este tipo de fármacos es el edema pulmonar, en el 5% de los casos; además, el mayor riesgo se presenta en pacientes con gestaciones múltiples, anemias, cardiopatías e infecciones. En estos casos, su incidencia puede llegar a ser del 38% [22].

El sulfato de magnesio se ha convertido en el tocolítico de primera línea en el tratamiento a corto plazo para frenar el parto prematuro idiopático. Los motivos para su aceptación incluyen, la facilidad de uso y la ausencia de efectos secundarios maternos importantes; sin embargo, el uso del sulfato de magnesio ha sido asociado con un aumento del riesgo de muerte del neonato [23]. Su mecanismo de acción aún no se conoce con exactitud, pero se ha visto que concentraciones elevadas de magnesio afectan la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular y disminuyen la sensibilidad a esta en la placa neuromuscular; además, se ha sugerido un antagonismo con el calcio, disminuyendo las concentraciones intracelulares del calcio necesarias para la interacción actina-miosina [24]. Su eficacia prolonga el parto durante 24 horas en 58% de las mujeres con membranas íntegras, y se evidenció que es más eficaz en pacientes con menor dilatación [24]. Sus efectos adversos abarcan desde la hiperemia facial, sensación de calor, cefalea, visión borrosa, náuseas, letargia, hipotermia, retención urinaria, hasta el edema pulmonar (0 - 2%), hipocalcemia que puede llevar a convulsiones [24].

El bloqueador de los canales de calcio (BCC) más utilizado en la clínica, es la nifedipina. Se absorbe rápido y completamente por vía oral, alcanzando niveles plasmáticos en 5 minutos. Se ha reportado que la nifedipina puede ser más efectiva que los  $\beta$ -agonistas en retrasar el nacimiento pretérmino más allá de las 45 horas. Su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición del ingreso del ion calcio a través de la membrana de la célula muscular y disminuyen la resistencia vascular uterina. El calcio intracelular disminuido también disminuye la actividad contráctil del miometrio; además, no se recomienda su uso concomitante con sulfato de magnesio [25]. Tiene una eficacia de aproximadamente 45 horas en el 50 al 60% de los casos [26]. Sus efectos adversos materno-fetales incluyen:

vasodilatación e hiperemia facial, cefalea, náuseas, hepatotoxicidad, bloqueo neuromuscular cuando se utiliza concomitantemente con sulfato de magnesio, hipotensión transitoria asociada con el aumento de la frecuencia cardiaca [27].

La indometacina es uno de los inhibidores de la sintasa de prostaglandinas más utilizados en la clínica, ya que se usa para crear las condiciones favorables para la activación y estimulación del parto, tanto a término como prematuro. Los fármacos inhibidores de PGs pueden ser útiles en la prevención del parto prematuro ya que inhiben la sintasa de las prostaglandinas y disminuyen la producción de éstas; mientras que su mecanismo de acción asemeja a los demás antiinflamatorios no esteroideos (AINES), inhibiendo la enzima ciclooxigenasa (COX-2), que es responsable de la formación de prostaglandinas (PGs) a partir del ácido araquidónico [28]. La eficacia de los AINES inhibidores de PGs como la indometacina reducen la incidencia del parto prematuro dentro de las primeras 48 horas; sin embargo, los efectos adversos materno-fetales incluyen: alteraciones gastrointestinales maternas, oligohidroamnios, constricción prematura ductal, náuseas leves, alteración en la función de neutrófilos y plaquetas, alteración en la hemodinámica de arterias mesentéricas, cerebrales y renales, produciendo sepsis, hemorragia intracraneal, alteración renal y enterocolitis, se relaciona, además, con hiperbilirrubinemia neonatal [29].

El atosiban es un inhibidor selectivo de los receptores de oxitocina en la decidua y en el miometrio. Su eficacia es similar a la de los  $\beta$ -miméticos, pero su uso tiene dos ventajas fundamentales. La primera de ellas es que la frecuencia de aparición de efectos secundarios, incluso leves, es baja, unas diez veces menos frecuente que con el empleo de  $\beta$ -miméticos y la segunda, es la sencillez de utilización, dado que se administra siguiendo un régimen de dosificación fijo. Su mecanismo de acción se basa en la competición con la oxitocina para

unirse a sus receptores en miometrio, decidua y membranas fetales, inhibiendo a su vez la liberación de prostaglandinas en estos sitios. Los efectos adversos materno-fetales incluyen: daños gastrointestinales, náuseas, vómito, cefalea y artralgias [30]. Una de las desventajas del atosiban es su alto costo y su ausencia en la clínica.

De todos los agentes tocolíticos expuestos, algunos autores realizan clasificaciones de acuerdo a su efectividad, así tenemos que se habla de un ranking de tocolíticos. Ranking de tocolíticos (EBM): nifedipina, atosiban (no se usa en los Estados Unidos de América), indometacina (uso recomendado solo antes de la semana 32 de gestación),  $\beta$ -miméticos y sulfato de magnesio [31].

La terapia antibiótica combinada ha sido recomendada en el manejo conservador de la RPM en el PP y su meta es prevenir o tratar la infección ascendente intrauterina, prolongando así el embarazo y disminuyendo la infección materna y neonatal. La antibiótico-terapia profiláctica ha mejorado el pronóstico neonatal, reduciendo el riesgo de síndrome distress respiratorio, sepsis temprana, hemorragia intraventricular y enterocolitis necrosante sin incrementar el riesgo de infección maternal y/o neonatal [32, 33]. Se utilizan de 2 a 4 dosis de betametasona o dexametasona intramuscular cada 24 horas, respectivamente. Según, los protocolos del IMSS para el tratamiento del parto prematuro, se recomienda utilizar solo un esquema de madurez pulmonar fetal y en casos necesarios, máximo dos. El uso de la tocolisis en el embarazo con RPM, ha sido controvertido; sin embargo, algunas evidencias han demostrado su utilidad en periodos cortos de tiempo (48 – 72 hrs), durante la administración de corticoesteroides en pacientes en manejo conservador [34].

## **2.4. Infección, Inflamación e Inmunomodulación en el Parto Prematuro**

Actualmente, algunos procesos y cambios fisiológicos, que experimenta el útero durante el embarazo, sigue siendo un gran desafío para el área de la biología reproductiva. El comprender como funcionan los mecanismos inmunológicos, endócrinos y fisiológicos relacionados con el embarazo, como la hipertrofia e hiperplasia uterina, la adaptación para la implantación del embrión, que asegura el éxito de un embarazo, podría ayudar a entender mejor que es lo que sucede durante el parto y el parto prematuro. Sin embargo, estos procesos biológicos son necesarios para inducir los diferentes cambios fisiológicos que acontecen en los tres trimestres del embarazo, primeramente para regular la respuestas pro- y antiinflamatorias relacionadas con la inmunomodulación, que es mediada por las células T colaboradoras, conocidas como Th. Se conocen desordenes fisiopatológicos en estas respuestas, que podrían causar una desregulación en el número y comportamiento de las diferentes células inmunocompetentes localizadas en el útero, como los mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas, monocitos, etc. [35]. Uno de los tipos celulares que participa en la inmunomodulación durante el embarazo son los mastocitos, que están localizados comúnmente en el tejido endometrial uterino; además, benefician positivamente el curso del embarazo, y contribuyen en el proceso de la implantación; por otra parte, participan también en la formación de la placenta y en el crecimiento fetal mediante la liberación de la proteína de unión glicano a galectina-1, que está crucialmente implicada en la formación de la interface materno-fetal [36]. Además, coordinan la remodelación tisular, la angiogénesis, y los cambios ductales [37]. Todos estos cambios se presentan periódicamente durante los tres trimestres de embarazo, y son regulados y coordinados por las células T (Th1 y Th2), los mastocitos, monocitos y

macrófagos, entre otras células. Durante el primer trimestre y en las fases tempranas del segundo trimestre del embarazo, se requiere de una respuesta inflamatoria fuerte, que sea capaz de asegurar la remodelación del tejido uterino y de eliminar los desechos celulares; mientras que en la fase tardía del embarazo, los mastocitos también participan en la liberación de mediadores proinflamatorios que están asociados con el parto normal y el parto prematuro, tales como las histaminas, prostaglandinas, leucotrienos, diferentes citocinas pro- y antiinflamatorias, y proteasas. [38-40]. Se sabe que durante el embarazo el número de mastocitos incrementa en el miometrio, y que contribuyen en la regulación de la contractilidad uterina [14, 41], y en la remodelación hiperplásica e hipertrófica del miometrio, promoviendo así, el desarrollo y crecimiento del feto [42, 43]; de hecho, se ha sugerido por algunos autores, que los resultados del embarazo dependen de la influencia de los mastocitos, y aún más relevante es, cuando su estado de activación es regulado por alteraciones fisiopatológicas, como las infecciones uterinas [44].

La respuesta inflamatoria del 1er trimestre del embarazo, está regulada por las células Th1 mediante la liberación de citocinas proinflamatorias, como  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-2}$ , que son secretadas por los monocitos y macrófagos, células dendríticas y por los mastocitos [44]. Por otro lado, el 2do trimestre de embarazo se caracteriza por un incremento hormonal de estrógenos y de progesterona en el útero, que promueven un cambio en la respuesta de las células Th1, hacia una respuesta Th2, que es regulada por la citocina antiinflamatoria,  $\text{IL-4}$ , secretada por granulocitos locales como los mastocitos, basófilos y neutrófilos. Este proceso se conoce como inmunomodulación, y es necesario para mantener el embarazo en un curso normal, y mantener también el útero en estado de reposo hasta alcanzar el inicio del 3er trimestre [45]. Finalmente, en el último trimestre del embarazo, el útero experimenta también

un cambio en la respuesta Th2 hacia una respuesta Th1, en donde nuevamente existe la presencia de citocinas proinflamatorias, como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, que participan en el inicio del parto [44].

Este proceso de inmunomodulación tiene como objetivo regular los cambios endocrinos y fisiológicos de los tres trimestres del embarazo, y mantener el útero en reposo para que el feto pueda desarrollarse dentro de éste; sin embargo, múltiples factores pueden alterar estos mecanismos y afectar el embarazo, como es la presencia de infecciones uterinas (IU) por las bacterias: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginales*, entre otras. Las IUs están presentes en el 25 – 40% de los casos de Parto Prematuro [46], y su presencia está relacionada con la liberación de citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, que estimulan la producción de potentes agentes uterotónicos, como las prostaglandinas-E2 y -F2 $\alpha$ , cuya función es la de activar el sistema de transducción de señales relacionado con el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) que incrementa la expresión de la ciclooxigenasa dos (COX-2), y estimula la contracción activando la vía de la fosfolipasa C (PLC), IP3 y DAG [47-49]; además, estas vías de señalización culminan con la ruptura prematura de la membrana, corionica-amniótica, e inducen las primeras contracciones prematuras en el útero [3, 19, 50].

El papel de la inflamación en la inducción del PP parece tener ventajas para la aplicación de tocolíticos con efectos antiinflamatorios, así como se ha reportado para algunos inhibidores de la enzima PDE4 [51, 52]. El LPS, una endotoxina de bacterias Gram-negativas, induce el parto prematuro en animales y es considerado un factor desencadenante del PP en humanos [46, 53]. En algunos estudios, el Rolipram ha sido empleado como un prototipo de inhibidor selectivo de la PDE4, inhibiendo la liberación del TNF- $\alpha$  inducido

por LPS [54, 55]. Se sabe, que la isoforma PDE4B es una molécula esencial para la respuesta inflamatoria del TNF- $\alpha$  activada por LPS; por esa razón, la isoforma PDE4B se ha convertido en un blanco molecular para el desarrollo de fármacos con efecto antiinflamatorio y útero-relajante, tanto en enfermedades autoinmunes como en el parto prematuro [56-58].

El efecto antiinflamatorio y relajante de algunos análogos de la talidomida, con características inhibitorias sobre la enzima PDE4, es de gran valor farmacológico, debido a que podrían controlar la inflamación y la contracción en el PP, y de esa forma prolongar el embarazo. Las estrategias terapéuticas para la prevención del PP, podrían enfocarse más en el desarrollo de fármacos inhibidores de la PDE4 que induzcan efectos útero-relajantes e inmunomoduladores y antiinflamatorios que retarden el parto prematuro evitando consecuencias adversas para la madre y el infante.

## **2.5. AMPc en la relajación del músculo liso uterino del Parto Prematuro**

El útero es un órgano miogénico, cuya contracción puede ser inducida de forma electromecánica y farmacomecánica. La primera, se produce por el uso de una solución despolarizante de alto potasio, produciendo una contracción tónica sostenida dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Y la segunda, puede inducirse por la prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ , que activa sus receptores específicos produciendo contracciones fásicas, también dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. En este tipo de estímulos farmacomecánicos inducidos por receptores uterotónicos acoplados a proteínas G, inducen la generación de segundos mensajeros ( $\text{IP}_3$  + DAG) implicados en la regulación de las contracciones uterinas [59-61].

El estado de reposo uterino durante el embarazo y su repentino incremento en la actividad uterina que induce el parto prematuro, puede ser consecuencia de varios factores,

como las infecciones uterinas, que desencadenan una respuesta inmunitaria liberando citocinas pro-inflamatorias, aminas biogénicas, prostaglandinas ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), entre otras, así como también, inducir cambios en la actividad y expresión de receptores miometriales modificando la generación de segundos mensajeros intracelulares, cuyo papel principal es regular los mecanismos responsables de mantener en reposo el útero embarazado [62-64].

Algunos de los receptores sobre la superficie de la células son llamados receptores acoplados a proteínas G (GPCRs o RAPGs). Varios miembros de esta clase de receptores pueden responder a un amplio rango de señales exógenas fuera de la célula. Estos receptores transmiten las señales hacia el interior de la célula, provocando de esa forma una serie de reacciones que envuelven a otras proteínas, nucleótidos, y iones, que eventualmente entregan un mensaje que podría conducir a la activación de una respuesta celular y fisiológica [65]. Cuando algunos GPCRs están activados (por unión a sus ligandos específicos), se puede inducir la producción de AMPc a través de la enzima adenilato ciclasa (AC) a partir del ATP [66]. Luego, el AMPc se difunde a través del citoplasma hasta que alcanzar su proteína blanco, generalmente es la proteína cinasa dependiente de AMPc, conocida como PKA, que transmite y amplifica una señal en el interior de la célula. La amplitud y duración de la señal es regulada por una gran familia de enzimas llamadas, fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs), cuya función está relacionada con la degradación del AMPc en su forma inactiva AMP mediante el rompimiento del enlace fosfodiéster de la molécula [67].

El AMPc, al ser un segundo mensajero endógeno, juega un papel clave en la regulación de varias respuestas biológicas en el humano, incluyendo inflamación, apoptosis, y metabolismo lipídico. El AMP cíclico participa en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria mediante la supresión de la liberación de mediadores proinflamatorios, tales

como el TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-17, IFN- $\gamma$  [68], y además, promueve la liberación de mediadores antiinflamatorios, como la interleucina-10 (IL-10) e IL-4 [69, 70], en células inmunitarias. También, numerosos estudios *in vitro* han mostrado que el AMPc participa en la regulación de la función de las células T cooperadoras o helper, CD4+ [71].

Por otra parte, el AMPc también participa en la función y regulación de la relajación uterina, especialmente durante el embarazo, el parto y el parto prematuro [72]. También, puede influenciar algunos eventos fisiológicos, como la activación de proteínas cinasas, la modulación del transporte de calcio y la regulación de la activación de genes. Su función en la relajación uterina está relacionado con la inhibición de la movilización de calcio y de la maquinaria de contractilidad del musculo liso uterino [73]. Cuando el AMPc activa a la proteína cinasa dependiente de AMPc, PKA, fosforila varias proteína blanco, como la cinasa de la cadena ligera de la miosina, (MCLK) [74] y la fosfolipasa C (PLC) [75]. La PKA puede fosforilar el sitio serina 52, conocido como Ser52 de la PLC, que inhibe la producción de segundos mensajeros como el inositol trifosfato, IP3, y el diacilglicerol, DAG, en musculo liso [76]. También, puede fosforilar los canales de calcio tipo L, bloqueando la entrada de calcio intracelular [77]; de hecho, la PKA puede fosforilar positivamente las ATPasas Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>+</sup> de la membrana plasmática y las bombas de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplasmico para liberar el espacio citoplasmático de las concentraciones altas de Ca<sup>2+</sup> [78].

Los niveles intracelulares de AMPc son el resultado de la interacción entre agonistas y receptores acoplados a las proteínas G (GPCRs), pueden activar a la enzima AC, por la vía de la subunidad proteica G $\alpha_s$ , o inhibirla, por la vía de la subunidad proteica G $\alpha_i$ , cuya familia de enzimas es responsable de generar AMPc a partir de la adenosina trifosfato (ATP)

[79]. Además, algunas xantinas (teofilina) pueden incrementar el AMPc intracelular, que induce la relajación del músculo liso [80].

## **2.6. Inhibidores de Fosfodiesterasas 4, PDE4**

La familia de las fosfodiesterasas está constituida por 11 subfamilias y diferentes isoformas, cuya función es la de hidrolizar segundos mensajeros como el AMPc y el GMPc. Mientras que algunas PDEs hidrolizan específicamente el AMPc (PDE-4, PDE-7 y PDE-8), otras hidrolizan el GMPc específicamente (PDE-5, PDE-6 y PDE-9) y otras hidrolizan ambas moléculas AMPc y GMPc (PDE-1, PDE-2, PDE-3, PDE-10 y PDE-11). Hay dos PDEs que hidrolizan el AMPc predominantemente en células de mamíferos, la PDE-3 y la PDE-4. Pero a diferencia de la PDE-3, la PDE-4 es específica para AMPc [81].

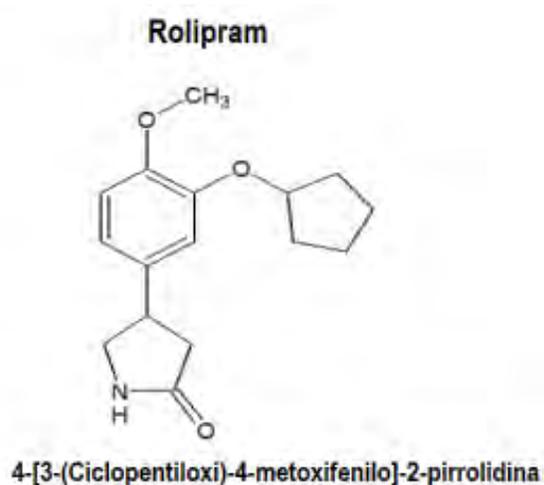
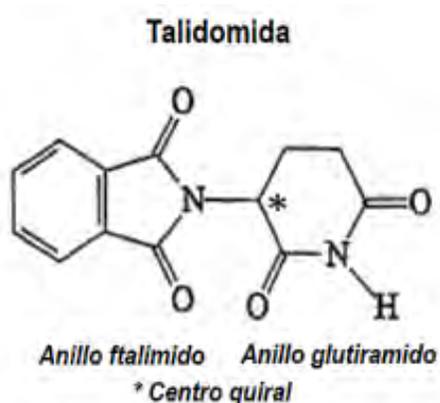
La PDE4 es una enzima predominantemente expresada en linfocitos (Th1, Th2 y Th17), granulocitos (mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos), en monocitos y macrófagos, así como también, en músculo liso uterino y en músculo liso de vías aéreas [68, 82]. Tiene un papel muy importante en promover la respuesta inflamatoria; además, ejerce su efecto proinflamatorio mediante la degradación del AMPc en células inflamatorias, células de músculo liso, células endoteliales y queratinocitos. La PDE4 puede incrementar la producción de TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-1, IFN- $\gamma$ , que son conocidos como mediadores proinflamatorios [83-85]. Al mismo tiempo, la PDE4 disminuye la producción de mediadores antiinflamatorios, como a la interleucina-10 e -4 (IL-10 e IL-4); de hecho, la producción de la interleucina 12 (IL-12), en macrófagos, es importante para la diferenciación de células T-helper 1 o Th1, que también es regulado por la PDE4 [86]. En células T, el AMPc está involucrado en una vía de señalización que suprime la activación de las células

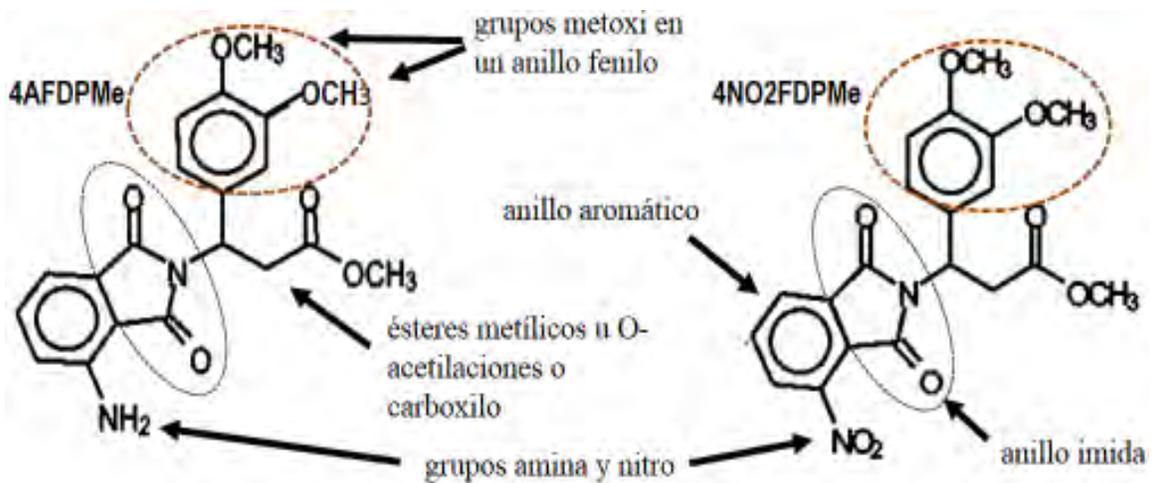
T [87, 88]; sin embargo, mediante el rompimiento del AMPc en células T, la PDE4 promueve la producción de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-5 y la proliferación de células T [89-91]. Por lo tanto, el papel de la PDE4 en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria podría ayudar a explicar su participación en el balance de la contracción y relajación del musculo liso uterino [92].

De la subfamilia de la PDE-4, se expresan diferentes variantes o isoformas, que son codificadas por cuatro genes PDE-4A – PDE-4D. Con el tiempo, la PDE-4 ha sido propuesta como blanco molecular para el desarrollo de fármacos, que puedan inhibir su actividad y que presenten subsecuentemente propiedades antiinflamatorios y miorelajantes [93]. Existen compuestos con estas cualidades, como el apremilast, roflumilast, entre otros, que siguen siendo estudiados en tratamientos clínicos, en su mayoría, en enfermedades autoinmunes asociadas con la inflamación crónica, como es el caso del lupus eritematoso, psoriasis, artritis reumatoide, cirrosis, etc. [94, 95]. Varios estudios han demostrado, que algunos inhibidores selectivos de la PDE-4 pueden modular la activación de las células inflamatorias. Sin embargo, estos agentes terapéuticos han presentado efectos secundarios leves como náuseas, émesis, diarreas, y algunos severos como las arritmias cardiacas y hemorragias intracraneales; actualmente, se realizan también estudios clínicos con diferentes inhibidores de PDE-4 para enfermedades autoinmunes como en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma [93, 96, 97].

Por lo tanto, el uso de inhibidores de PDE-4 es una alternativa prometedora para el tratamiento del parto prematuro asociado con la infección, puesto que el incremento del AMPc podría inducir un efecto antiinflamatorio y útero-relajante. Por todo lo anterior, el objetivo de este proyecto es evaluar las propiedades útero-relajantes y antiinflamatorias de

dos Compuestos sintetizados en el laboratorio de Química Medicinal, como inhibidores de PDE-4 sobre el útero aislado de rata gestante. El primero es el 3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenilo)-propanoato de metilo (4NO2FDPM) y el segundo el 3-(4-aminoftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenilo)-propanoato de metilo (4AFDPM) [98]. Ambos compuestos poseen dos enantiómeros, R y S, que son usados experimentalmente en mezcla racémica. Además, se utilizó como control positivo, un inhibidor selectivo de la PDE4 (rolipram) cuya estructura química tiene semejanzas estructurales con los dos compuestos antes mencionados (4NO2FDPM y 4AFDPM).





**Figura 1.** Estructura química de talidomida, rolipram y dos análogos de talidomida.

## 2.7. Talidomida y sus análogos

La talidomida ha surgido por su amplio espectro de efectos farmacológicos e inmunológicos como un agente anti-TNF $\alpha$  [99]. Su aplicación potencialmente terapéutica abarca un gran número de enfermedades como cánceres, trastornos cuétanos, enfermedades autoinmunes inflamatorias, entre otras [100, 101]; sin embargo, el uso clínico de la talidomida se ha limitado por sus efectos adversos a largo plazo, como bradicardia, hipotensión, prurito, edema en cara, reacciones de hipersensibilidad, etc. [102]; de hecho, se han creado nuevos análogos de talidomida, que son más seguros y eficaces. Actualmente se

han reportado dos clases de análogos de talidomida [103]: el grupo de inhibidores de fosfodiesterasas 4 que inhiben al TNF- $\alpha$ , y que son conocidos como fármacos selectivos inhibidores de citocinas, (por sus siglas en inglés: selected cytokine inhibitory drugs, SelCIDs), como el Apremilast, y que además no conservan el anillo glutarimido de la talidomida [104]. El segundo grupo no inhiben a la fosfodiesterasa 4, y estructuralmente son muy similares a la talidomida, pero estimulan de forma marcada la proliferación de células T, así como también, la producción de IL-2 e INF- $\gamma$ ; de hecho, son conocidos como fármacos inmunomoduladores (por sus siglas en inglés: immunomodulatory drugs, IMIDs), como la lenolidomida y la pomalidomida [104].

El apremilast es otro análogo de la talidomida y es un inhibidor potente y específico de la PDE-4, se desarrolló para ser usado en trastornos inflamatorios crónicos, y tiene la capacidad de inhibir a todas las 4 subfamilias e isoformas de la PDE-4 (PDE-4A-D); de hecho, al no poseer el anillo glutarimido, como el resto de los análogos inhibidores de PDE-4, son agentes inhibidores selectivos de la PDE-4 no teratogénicos [104-106].

En marzo del 2014 la FDA aprueba el uso del apremilast para los tratamientos de psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, casos de epilepsia y espondilitis anquilosante [105-110]. Varios análogos de talidomida se encuentran en estudios clínicos para diferentes enfermedades como leucemias, tumores sólidos y enfermedades hematológicas [104, 111].

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo General**

Estudiar el efecto útero-relajante e inmunomodulador de los análogos de talidomida, 4NO2FDPM<sub>e</sub> y 4AFDPM<sub>e</sub>, en modelos *in vitro* en útero aislado de rata gestante.

### **3.2. Objetivos Particulares**

1. Evaluar el efecto útero-relajante de ambos análogos sobre las contracciones inducidas fármaco-mecánicamente y electromecánicamente en tiras de útero aislado de rata gestante, para construir las curvas concentración – respuesta del efecto útero-relajante

de los compuestos sobre las contracciones uterinas, para determinar los parámetros farmacológicos: concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) y efecto máximo (Emáx).

2. Determinar las concentraciones de AMPc, en homogenados de útero de rata en presencia y ausencia de los compuestos, 4NO<sub>2</sub>FDPM<sub>e</sub> y 4AFDPM<sub>e</sub>, rolipram (inhibidor específico de PDE4) y forskolin (activador de adenilato ciclasa).
3. Determinar las concentraciones del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 en tiras uterinas de rata gestante, inducidas por LPS, en presencia y ausencia de los análogos, 4NO<sub>2</sub>FDPM<sub>e</sub> y 4AFDPM<sub>e</sub>, rolipram (inhibidor específico de PDE4) y forskolin (activador de adenilato ciclasa) para comparar sus efectos.

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1. Animales**

En este proyecto se usaron ciento seis ratas gestantes de la cepa Wistar con un peso corporal de 200-220 g y una edad de 70 a 80 días. Para determinar el día cero del embarazo de las ratas gestantes (RG) fue necesario observar la presencia del tapón espermático en la vagina de la rata. La presencia del tapón espermático fue considerada como el primer día de gestación o embarazo de la rata. Cuatro animales por caja fueron mantenidos bajo las siguientes condiciones: temperatura (20-25 °C), humedad (40-60%), 12 horas de luz / 12

horas de obscuridad y la toma de agua y comida *ad libitum*. Todos los animales recibieron cuidado humano de acuerdo a las normas directrices institucionales de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-999) [112].

## **4.2. Fármacos y Soluciones**

Los análogos de talidomida, 4NO2PDFMe y 4APDFMe, fueron sintetizados por el Dr. Eduardo Fernández-Martínez en el laboratorio de Química Medicinal [113]. Rolipram (inhibidor selectivo de la PDE4), forskolin (activador directo de AC), nifedipina (bloqueador de canales de calcio), *Escherichia coli*, LPS (serotipo 055:B5), prostaglandina PGF2 $\alpha$ , medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagle's medium), el amortiguador salino Dulbecco phosphate buffered saline (PBS 10x) y el solvente para disolver los compuestos, Dimetil sulfoxido (DMSO) fueron comprados en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## **4.3. Estudio funcional de contractilidad *in vitro***

Las ratas gestantes fueron sacrificadas por inhalación de CO<sub>2</sub> el día 19 de gestación. Todos los cuernos fueron colocados inmediatamente en una caja de Petri a temperatura ambiente, llena de una solución salina fisiológica (SSF) con la siguiente composición mM: NaCl 113, KCl 4.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 25, Glucosa 5.5; pH: 7.4) el tejido uterino se limpió en forma cuidadosa removiendo los restos fetales y placentarios. Posteriormente, los cuernos fueron cortados en tiras de 1 cm x 3 - 4 mm y preparados para el ensayo de la función contractilidad *in vitro*, de acuerdo con la técnica de Oger S, et al., 2004 [114]. Los tejidos se colocaron en una cámara para tejidos aislados que contenía un volumen

de 3 mL de la solución SSF. Por medio de un hilo de seda, una de las puntas de los tejidos se sujetó a la base de la cámara y la otra punta se unió con el hilo de seda a un transductor de tensión FT03 Grass. La temperatura de la cámara se mantuvo a 37 °C hasta finalizar el experimento. Los tejidos se mantuvieron inmersos en 3 mL de SSF con burbujeo constante de una mezcla de gas carbógeno de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, y a una tensión de 1 g, la cual se mantuvo durante todo el experimento. Después del montaje de los tejidos en las cámaras, la solución SSF se cambió cada 15 minutos durante una hora, hasta que la basal se estabilizara a 1g. En estas condiciones se inician los protocolos experimentales, para el estímulo farmacomecánico (FM), en donde se utilizó una concentración de 1 micromolar de PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , y para el estímulo electromecánico (EM) se utilizó una solución despolarizante de K<sup>+</sup> (40 mM) con calcio; para el efecto de los compuestos sobre el estímulo de Ca<sup>2+</sup> (1 mM) se utilizó una solución despolarizante de K<sup>+</sup> 40 mM sin calcio. La actividad contráctil de las tiras uterinas fue registrada isométricamente por medio de un transductor de tensión FT03 conectado a un polígrafo Grass. Después de que la basal se estabilizó a 1 g, y cuando la respuesta contráctil inducida por los estímulos FM y EM fueron uniformes se adicionaron los compuestos, 4NO<sub>2</sub>FDPM<sub>e</sub>, 3-(4-nitroftalidomido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo y 4AFDPM<sub>e</sub>, 3-(4-aminofthalidomido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo), rolipram, nifedipina y forskolin a diferentes concentraciones. Para evaluar el efecto útero-relajante de los compuestos fue medida el área bajo la curva (ABC), en donde se tomaron registros de 20 min de control y 20 min de región tratada con los compuestos. Para cada compuesto se ensayaron seis concentraciones diferentes, para cada concentración se usaron seis tejidos en total y para cada curva se utilizaron 36 tejidos. Se determinó el valor promedio de cada concentración y el error estándar (n=6) para cada curva. Con los datos

obtenidos se construyeron las curvas concentración-respuesta de los compuestos ensayados en tejidos aislados de rata gestante, con los que se determinaron los parámetros farmacológicos, concentración inhibitoria cincuenta (CI<sub>50</sub>) y el efecto máximo (E<sub>max</sub>). Los datos fueron analizados por una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida por la comparación múltiple pareada total de Bonferroni y Student-Newman-Keuls; se consideró una diferencia significativa con un valor de  $p < 0.05$ . Para realizar estas pruebas se usó el programa SigmaPlot versión 11 (Jandel Corporation, U.S.A.) [115]. Además, el efecto inhibitorio de ambos análogos, rolipram, forskolin y nifedipina sobre las contracciones uterinas fásicas y tónicas fueron expresados de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición} = 100\% - (\text{AUCr}/\text{AUCi}) \times 100$$

AUC es el AUC restante después de la exposición del tejido uterino al fármaco, y AUCi es el AUC de la actividad integra antes de cualquier adición del compuesto. Antes y después de la exposición a los fármacos, fueron considerados 20 minutos como tiempo suficiente para obtener una actividad biológica representativa y estable. Todas las curvas concentración-respuesta fueron generadas por ambos análogos y rolipram usando la siguientes concentraciones: 10, 32, 56, 86, 100, 230 y 320  $\mu\text{M}$ ; para forskolin: 0.18, 0.56, 1, 1.8, 3.2 y 5.6  $\mu\text{M}$ ; y para nifedipina: 1, 3.2, 10, 18, 23 y 56 nM.

#### **4.4. Acumulación de AMPc en útero de rata gestante**

##### **4.4.1. Cultivo tisular de útero de rata gestante**

Los cultivos tisulares se realizaron con un número total de cuatro ratas gestantes (n=4). Todas las muestras fueron lavadas varias veces en PBS (1x) para remover el exceso de sangre y material feto-placentario. Los tejidos uterinos fueron cortados en pequeños

fragmentos, que pesaron aproximadamente 100 mg, y que fueron cultivados en una placa de 24 pozos, junto con 1 ml de medio de cultivo DMEM, que estaba suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Posteriormente, se incubaron bajo las siguientes condiciones: 37°C, ambiente húmedo, con 95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub> [116]. Después de que los fragmentos fueran incubados por una hora, el medio de cultivo fue cambiado para iniciar los protocolos experimentales. Primeramente, todas las muestras fueron incubadas por 1 hora con los inhibidores de PDE4, rolipram, 4AFDPM e y 4NO<sub>2</sub>FDPM e a concentraciones de 100, 300 y 1000 µM, y después del primer periodo de incubación, los tejidos fueron incubados por 30 minutos con forskolin a una concentración de 10 µM. Finalmente, la reacción fue detenida con HCl a una concentración de 0.1 mM, como está establecido en el protocolo del kit para ELISA. Los tejidos fueron recolectados y congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C.

#### ***4.4.2. Homogenización de útero de rata***

Para la cuantificación del AMPc, los tejidos aislados de ratas gestantes congelados fueron primeramente homogenizados en frío sobre hielo a una temperatura aproximada de 4 °C, utilizando el homogeneizador, Bullet-Blender 50-DX de la compañía Next-Advance. Para la homogenización de los tejidos se usó el siguiente amortiguador: 100 mM Tris/HCl (pH: 7.4), 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 1 mM β-mercapto etanol, 10% glicerol; la proporción entre el peso del tejido y el amortiguador fue el siguiente: 100 mg/1ml. El amortiguador estaba suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas, “Complete” de la marca Roche, Germany [114]. Finalmente, los homogenados fueron centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante fue separado de los restos celulares, recolectado y colocado en un microtubo nuevo.

#### **4.4.3. Cuantificación de AMPc**

Para la cuantificación del AMPc se utilizó el kit: cAMP Direct Immunoassay kit 100 Assays de la marca Biovision Incorporated. Este inmunoensayo de reconocimiento directo, puede ser usado para determinar y cuantificar el AMPc en muestras biológicas. Los 96 pozos de la placa están cubiertos con un anticuerpo policlonal IgG-recombinante específico para AMPc, el cual puede unirse con el AMPc de las muestras biológicas ensayadas. 100  $\mu$ L de los sobrenadantes recolectados de los homogenados fueron colocados en los pozos, dejándolos incubar por 2 horas junto con el conjugado AMPc-HRP (HRP- proteína aislada de rábano). Al finalizar las 2 horas, la placa se lavó 4 veces con el buffer de lavado del kit. Después, se inició una segunda incubación de 1 hora usando 200  $\mu$ L del sustrato del kit en cada uno de los pozos de la placa. Finalmente, se colocaron 50  $\mu$ L en cada pozo, para iniciar la lectura espectrofotométrica. La cantidad de AMPc-HRP unida a la placa fue determinada midiendo la densidad óptica (OD) de la actividad HRP a una OD de 405nm. Esta intensidad OD de 405nm es inversamente proporcional a la concentración del AMPc acumulado en las muestras ensayadas de útero de rata gestante. El kit puede detectar aproximadamente 0.1-10 pmol / 5  $\mu$ l (o  $\sim$  0,02-2 mM) de AMPc en muestras biológicas. Para la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro de la marca Jenway 6705 UV/VIS y el lector de placas MultiSKAN EX, marca Thermo Electro Corporation. Este experimento fue llevado a cabo siguiendo las indicaciones del protocolo del kit y las técnicas reportadas [114, 116].

#### **4.5. Estudio del efecto antiinflamatorio e inmunomodulador**

##### **4.5.1. Cultivo tisular**

Se usó un número total de 4 ratas gestantes, (n = 4). Los úteros fueron aislados y colocados en una caja de Petri para lavarlos varias veces, limpiarlos y remover material fet-

placentario usando PBS (1x). Los tejidos uterinos fueron cortados en pequeños fragmentos, que pesaron aproximadamente 45-55 mg, y que fueron cultivados en una placa de 24 pozos junto con 1 ml de medio de cultivo DMEM, suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Después de la primera hora de incubación, se cambió el medio de cultivo y se incubaron bajo las siguientes condiciones: 37°C, ambiente húmedo, con 95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>. Después, los tejidos fueron incubados con lipopolisacarido de *E. coli* (LPS; serotipo: 055:B5) y su vehículo (solución salina) como control positivo; además, se colocaron concentraciones crecientes de los análogos, 4NO<sub>2</sub>FDPM<sub>e</sub> y 4AFDPM<sub>e</sub> (10<sup>-6</sup> a 10<sup>-3</sup> µM), y rolipram (10<sup>-6</sup> a 10<sup>-3</sup> µM), y de forskolin (6 µM). Los sobrenadantes fueron recolectados a su determinado tiempo y fueron congelados a una temperatura de - 20 °C hasta ser cuantificados, como se ha reportado [114, 116].

#### **4.5.2. Cuantificación de TNF-α, IL-1β e IL-10**

Para la cuantificación de citocinas, los experimentos se realizaron con la técnica de ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas). Los fragmentos de úteros de las ratas gestantes fueron colocados en una placa de 24 pozos, que contenía 1 mL de medio de cultivo (DMEM) suplementado con 100 U/mL penicilina and 100 µg/mL estreptomicina, y fueron incubados a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> por 3 horas. Después, las muestras fueron transferidas a una nueva placa de 24 pozos, que contenían nuevo medio de cultivo. Los fragmentos uterinos fueron incubados con el 4AFDPM<sub>e</sub>, 4NO<sub>2</sub>FDPM<sub>e</sub>, rolipram a diferentes concentraciones: 100, 300 y 1000 µM, junto con, y sin lipopolisacarido de *E. coli* (LPS; serotipo: 055:B5) a una concentración de 10 µg/mL por un periodo de 24 horas. Además para poder observar el estímulo de forskolin sobre la enzima AC, algunas muestras fueron

incubadas también por 24 horas con forskolin a una concentración de 10  $\mu$ M. Todos los compuestos fueron disueltos en DMSO, que también fue utilizado como control, puesto que fue empleado como vehículo para la mayoría de los compuestos. Todos los experimentos fueron realizados en duplicados. Después del periodo de incubación, los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -20 °C, como ha sido reportado [117]. Las concentraciones de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 en los sobrenadantes del medio de cultivo fueron determinadas usando los kits de ELISA para rata: rat TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 ELISA kits (Novex Life Technologies, Waltham, MA, USA); se siguieron todas las instrucciones del fabricante y las lecturas de las muestras se realizaron con un lector de placas Multi-SKAN EX de la marca Thermo Electro Corporation [117].

#### ***4.5.3. Análisis Estadístico***

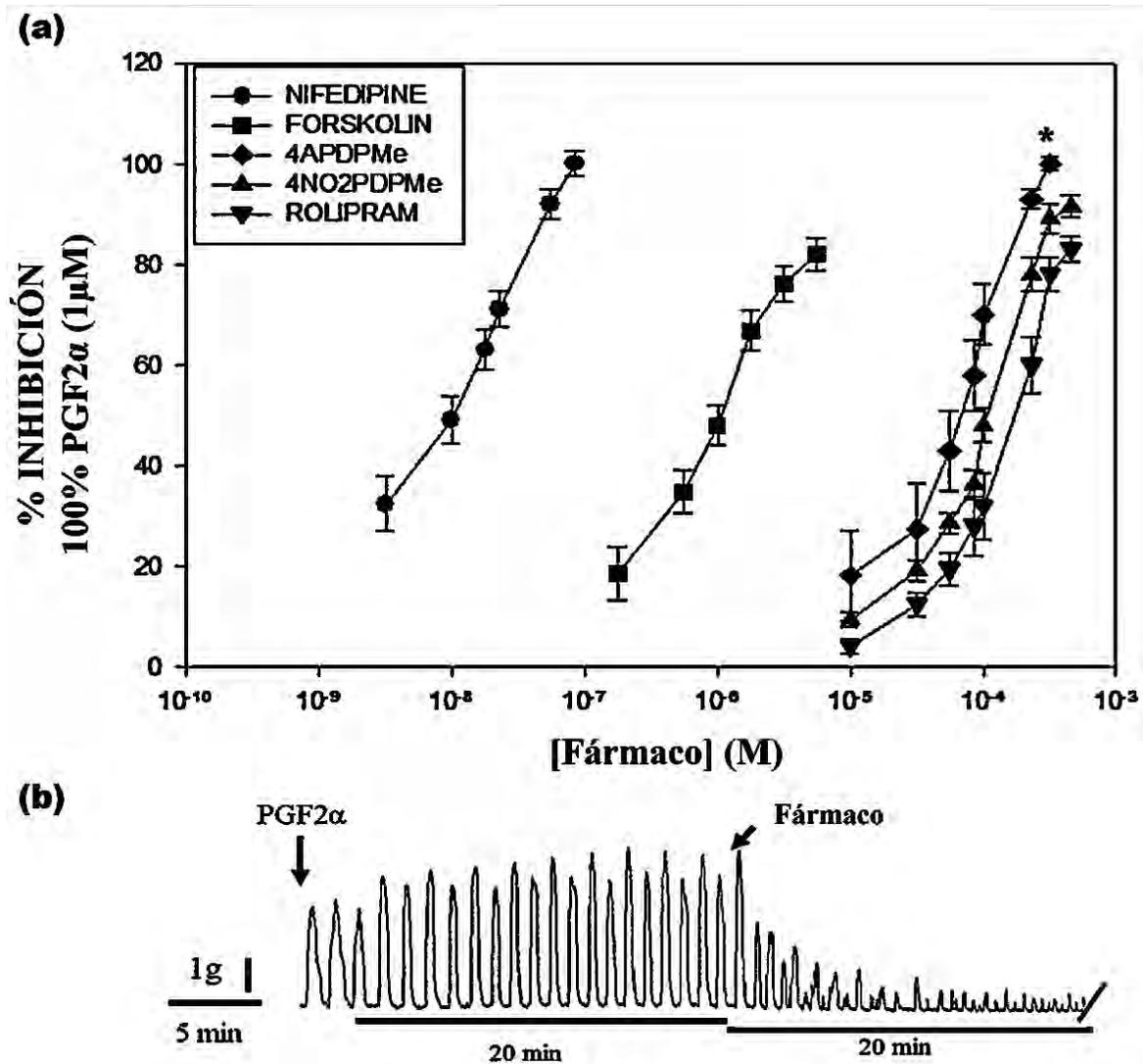
Los datos del efecto útero-relajante de los fármacos ensayados sobre las contracciones fásicas y tónicas fueron sometidos a un análisis estadístico para la construcción de las curvas concentración-respuesta, usando el software SigmaPlot version 11 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Al mismo tiempo, se obtuvieron los dos parámetros farmacológicos de cada uno de los fármacos empleados en los experimentos: la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>), que es la concentración de un fármaco que produce el 50% del efecto inhibitorio máximo (potencia), y el efecto máximo (E<sub>max</sub>), que puede ser producida por la concentración más alta del compuesto ensayado (eficacia). Los datos fueron expresados como el error estándar de la media  $\pm$  SEM, que fue determinado usando cada una de las concentraciones empleadas en los ensayos (n=6). Las diferencias estadísticas de la IC<sub>50</sub> y del E<sub>max</sub> entre los compuestos fueron determinadas por análisis de varianza de una vía ANOVA, seguido por una prueba de comparación múltiple, conocida como, test post hoc Student-Newman-Keuls usando el

software Sigma Stat version 3.1. (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). En todos los casos, el valor  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## 5. Resultados

### 5.1. Análogos inhiben la contracción fásica y tónica en útero de rata gestante

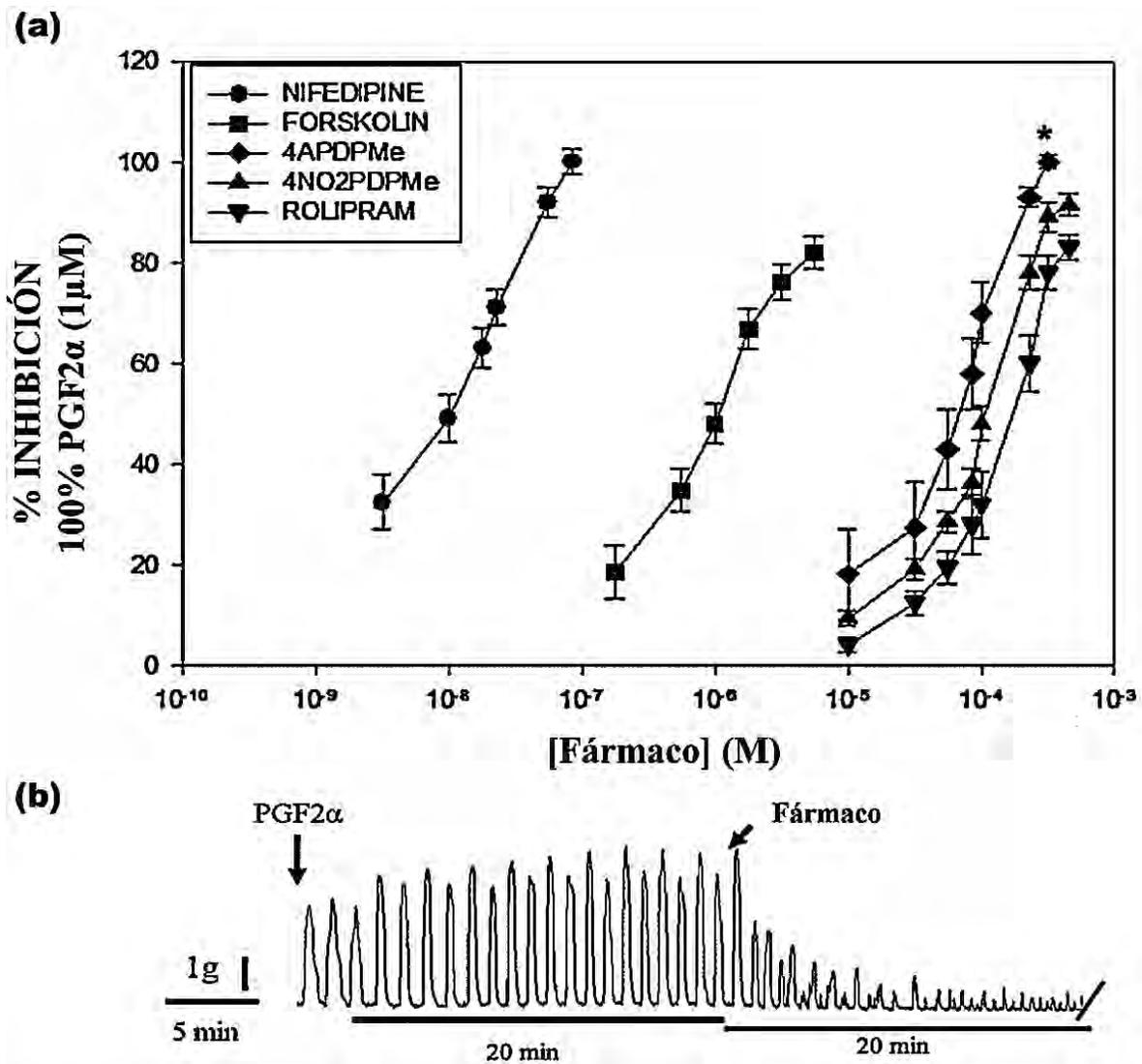
La figura 1a, muestra las curvas concentración-respuesta, en donde se aprecia el efecto útero inhibitorio de ambos análogos y rolipram sobre las contracciones fásicas inducidas con  $\text{PGF2}\alpha$ , comparadas con el efecto útero inhibitorio de nifedipina y forskolin. La curva de nifedipina está ubicada en la región central izquierda en el rango de concentración  $10^{-8}$   $\mu\text{M}$  y alcanzó una respuesta máxima del 97.6%, mientras que la curva de forskolin se ubica en el rango de concentración  $10^{-6}$   $\mu\text{M}$  y su inhibición máxima alcanzo aproximadamente el 80%. Por lo tanto, forskolin fue menos potente y efectivo que nifedipina. Las curvas concentración respuesta de los análogos de la talidomida y de rolipram se encuentran ubicadas en el rango de concentración de  $10^{-4}$   $\mu\text{M}$ , indicando que los inhibidores de PDE4 son menos potentes que los fármacos de comparación; el orden de los compuestos según su rango de potencia fue el siguiente: 4AFDPMe > 4NO2FDPMe > rolipram ( $p < 0.05$ ). La figura 1b, muestra el registro típico del efecto útero inhibitorio de las contracciones fásicas inducidas por  $\text{PGF2}\alpha$ , en presencia de los análogos.



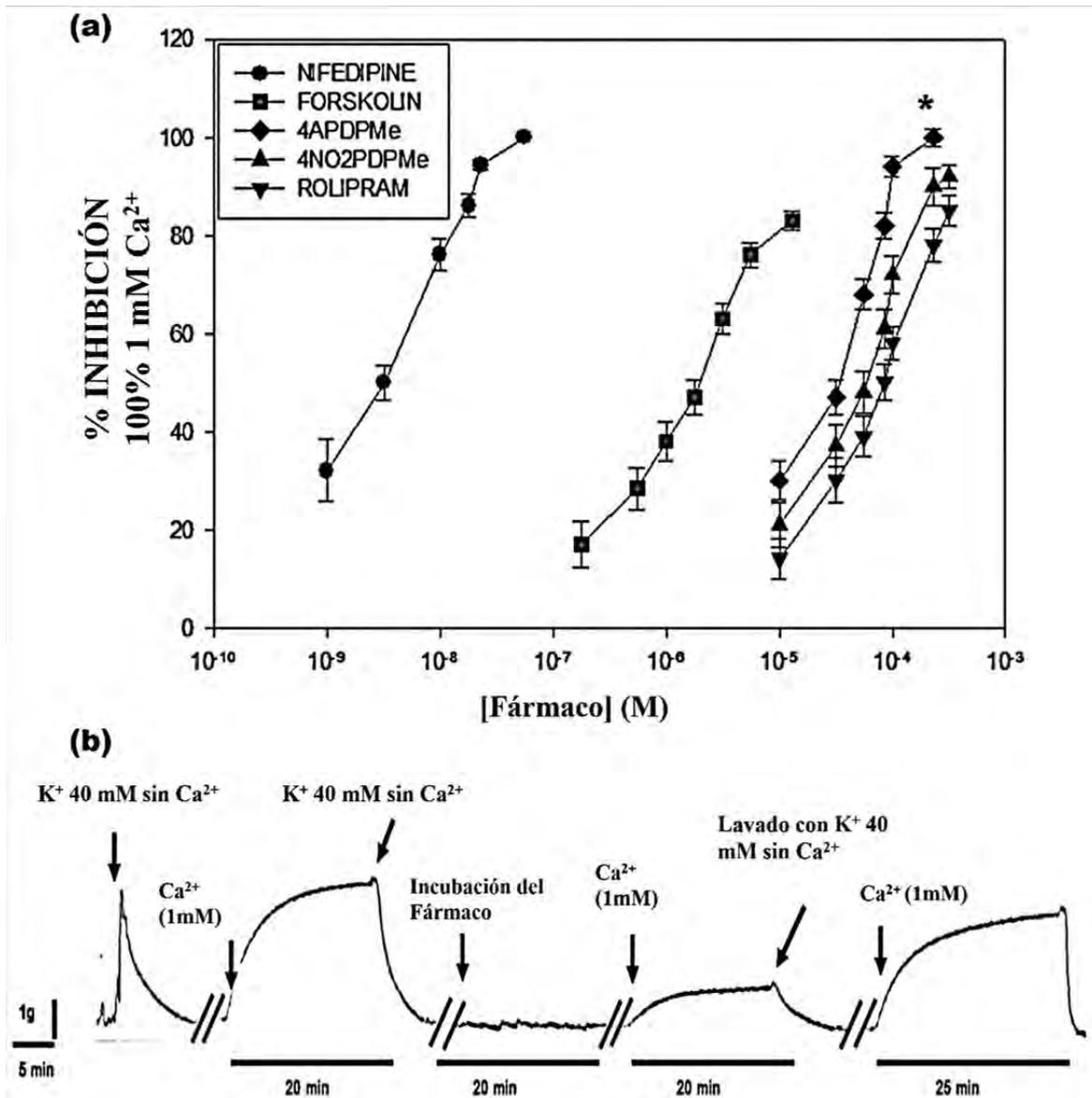
**Figura 1.** Efecto inhibitorio de los análogos de la talidomida, rolipram, forskolin y nifedipina sobre contracciones uterinas fásicas inducidas por PGF2α: (a) curvas concentración-respuesta de tiras uterinas de rata gestante. Cada punto de la curvas de la gráfica indica el valor promedio de 6 experimentos (n=6) para ambos análogos, rolipram, forskolin y nifedipina; las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$  EEM), \* $p < 0.05$ .

(b) Trazo típico de las contracciones uterinas fásicas, estimuladas con  $\text{PGF2}\alpha$  e inhibidas por los compuestos.

La figura 2a, muestra las curvas concentración respuesta del efecto útero inhibitorio de los análogos de la talidomida, rolipram, forskolin y nifedipina sobre las contracciones tónicas inducidas por la solución despolarizante de  $\text{K}^+$  alto con  $\text{Ca}^{2+}$  en tiras uterinas aisladas de rata gestante, el orden de la potencia fue el siguiente: nifedipina > forskolin > 4AFDPMe > 4NO2FDPMe > rolipram. La figura 2b muestra un trazo típico del efecto útero inhibitorio de los compuestos sobre la contracción tónica inducida por la solución despolarizante de  $\text{K}^+$  alto con calcio.



**Figura 2.** Efecto inhibitorio de los análogos de la talidomida, rolipram, forskolin y nifedipina sobre la contracción uterinas tónica inducida por la solución despolarizante de K<sup>+</sup> alto: (a) curvas concentración-respuesta de los compuestos sobre la contracción tónica de las tiras uterinas. Cada punto indica el valor promedio de 6 experimentos (n=6) para ambos análogos, rolipram, forskolin y nifedipina; las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$  EEM), \* $p < 0.05$ . (b) Registro típico útero inhibitorio de las contracciones tónicas inducidas por la solución despolarizante de K<sup>+</sup> alto con calcio.



**Figura 3.** Efecto inhibitorio de los análogos de talidomida, rolipram, forskolin y nifedipina sobre la contracción tónica inducida por el estímulo de  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM) en una solución despolarizante sin  $\text{Ca}^{2+}$ : (a) curvas concentración-respuesta de tiras uterinas del efecto útero inhibitorio de los compuestos sobre la contracción tónica inducida por el estímulo de  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM) en una solución despolarizante sin  $\text{Ca}^{2+}$ . Cada punto representa el valor promedio de 6 experimentos ( $n=6$ ) para ambos análogos, rolipram, forskolin y nifedipina; las barras

verticales indican el error estándar de la media ( $\pm$  EEM), \*  $p < 0.05$ . (b) Registro típico de la contracción tónica uterina estimulada con  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM) en tejidos preincubados con los compuestos.

La tabla 1 muestra el resumen de los parámetros farmacológicos  $\text{CI}_{50}$  y  $E_{\text{max}}$  para ambos análogos de talidomida, rolipram, nifedipina y forskolin, obtenidos del análisis de las curvas concentración-respuesta. El orden del efecto útero inhibitorio del parámetro farmacológico  $\text{CI}_{50}$  sobre el estímulo farmacomecánico ( $\text{PGF}2\alpha$ ) fue el siguiente nifedipina > forskolin > 4AFDPMe > 4NO2FDPMe > rolipram. Con relación al estímulo electromecánico inducido por la solución despolarizante con  $\text{Ca}^{2+}$  el orden de potencia fue: nifedipina > forskolin > 4AFDPMe > 4NO2FDPMe > rolipram. Finalmente, el efecto útero inhibitorio del estímulo de  $\text{Ca}^{2+}$  en una solución despolarizante sin  $\text{Ca}^{2+}$  muestra el siguiente orden de potencia: nifedipina > forskolin > 4AFDPMe > 4NO2FDPMe > rolipram.

Comparando la respuesta máxima entre los análogos de la talidomida y el rolipram se encontró la diferencia significativa entre el 4AFDPMe y rolipram ( $p < 0.05$ ).

Tabla 1. Valores  $CI_{50}$  y  $E_{max}$  de los análogos de talidomida, rolipram, forskolin y nifedipina

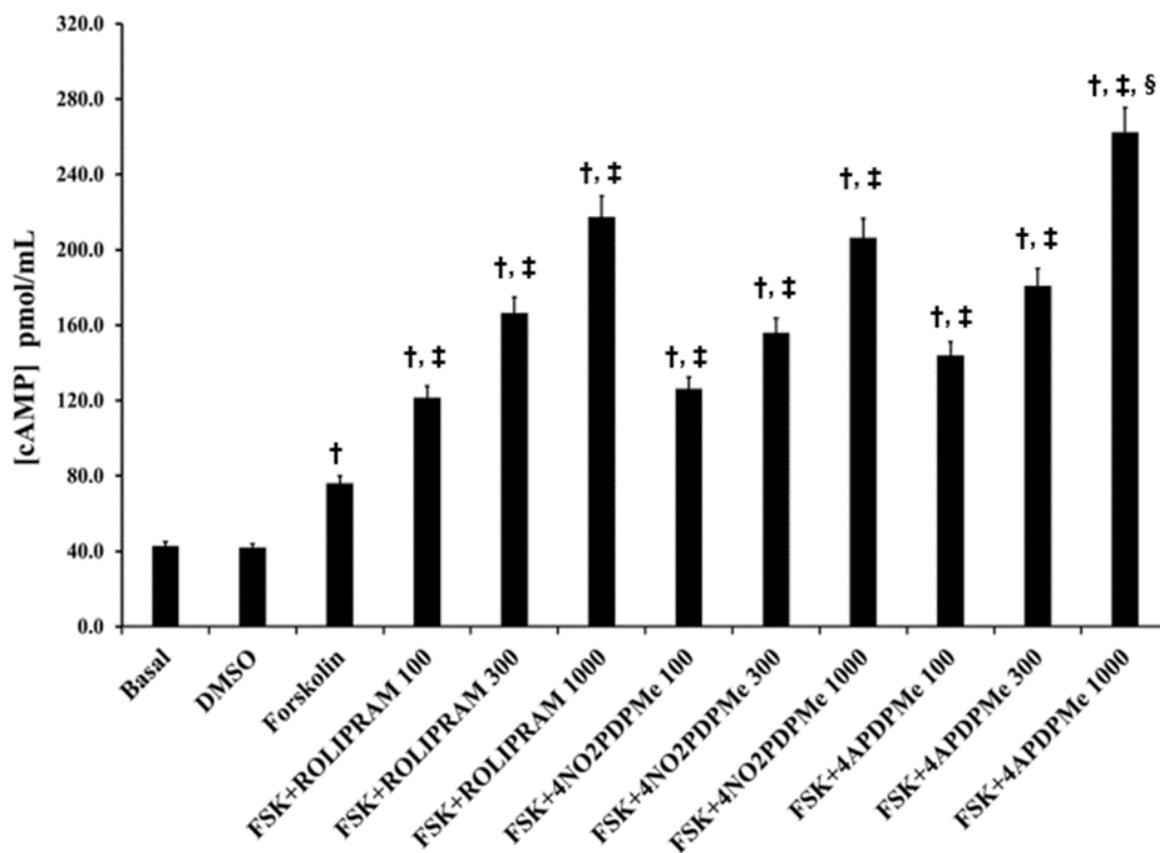
Contracción	Fásica inducida con $PGF2\alpha$		Tónica inducida con $KCl$		Tónica inducida con $Ca^{2+}$	
	Compounds	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	$E_{max}$ (%)	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	$E_{max}$ (%)	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )
4APDPMe	$67.5 \pm 3.17^{***}$	$99.4 \pm 1.3^*$	$29.4 \pm 5.17^{**}$	$99.8 \pm 1.0^*$	$30.9 \pm 2.7^{**}$	$100 \pm 2.1^*$
4NO2PDPMe	$101.4 \pm 7.3^{**}$	$89.4 \pm 2.8$	$40.9 \pm 2.7^*$	$92.4 \pm 2.8$	$48.8 \pm 4.36^*$	$90.9 \pm 3.4$
Rolipram	$146.7 \pm 4.87$	$82.7 \pm 2.5$	$54.3 \pm 4.4$	$84.3 \pm 2.7$	$68.4 \pm 5.4$	$86.3 \pm 4.9$
Forskolin	$0.11 \pm 0.28^{***}$	$79.8 \pm 2.9$	$0.98 \pm 0.2^{***}$	$83.3 \pm 1.3$	$0.14 \pm 0.18^{***}$	$80.9 \pm 3.1$
Nifedipina	$0.0108 \pm 0.001^{***}$	$97.6 \pm 3.1^*$	$0.00372 \pm 0.00083^{***}$	$97.8 \pm 3.7^*$	$0.0032 \pm 0.00084^{***}$	$97.9 \pm 3.7$

$CI_{50}$  = concentración inhibitoria-50.  $E_{max}$  = efecto máximo inhibitorio. Los resultados están expresados como el valor promedio  $\pm$  el error estándar de la media. Las diferencias estadísticas entre los diferentes compuestos fueron siempre comparadas con Rolipram.

\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

## 5.2. Análogos de talidomida incrementan el AMPc en útero de rata gestante

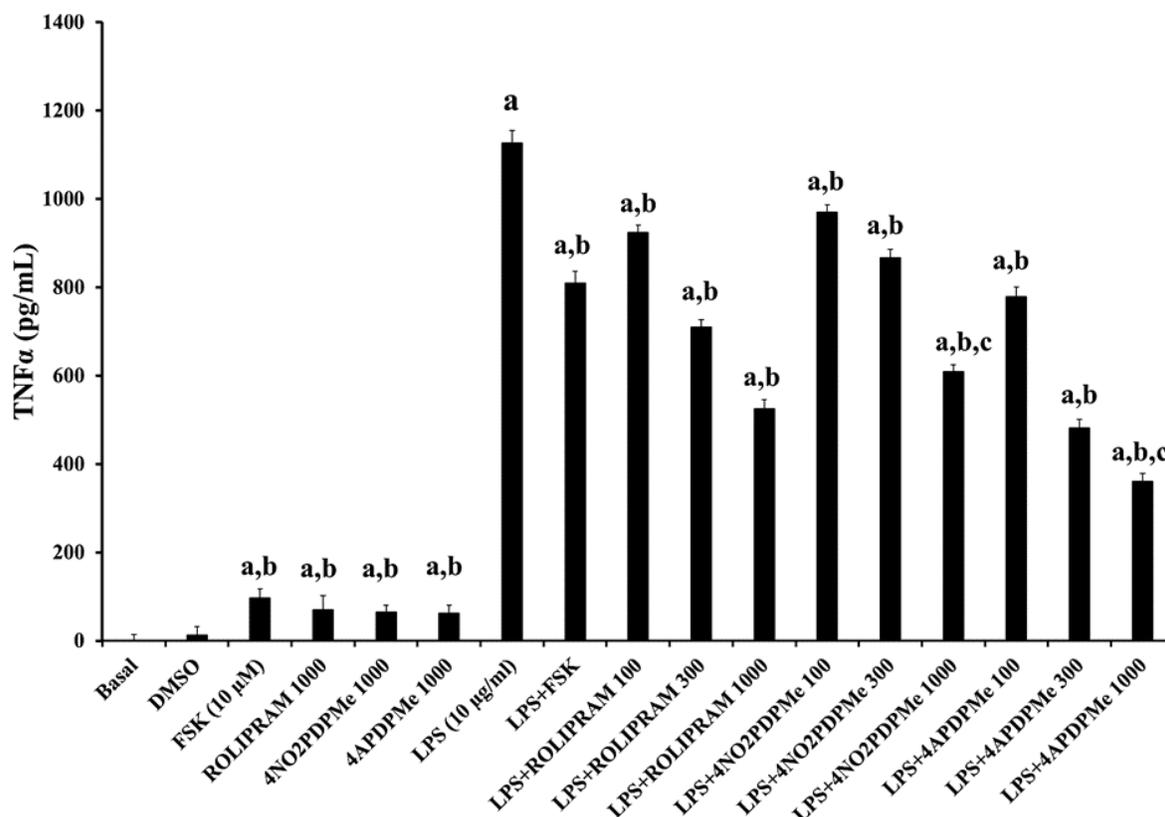
La figura 4, muestra las concentraciones de AMPc inducidas por los análogos de la talidomida, rolipram y forskolin, que fueron obtenidas de tejido uterino aislado de rata gestante. El activador de la enzima AC, forskolin, aumento casi dos veces más los niveles de AMPc en el útero de rata gestante comparado con el valor basal ( $p < 0.05$ ), que no se modifica por el vehículo, DMSO, disolvente de los compuestos. La inhibición de la PDE-4 inducida por los análogos de la talidomida o por rolipram incrementó los niveles de AMPc en forma dependiente de la concentración en las muestras uterinas, en combinación con forskolin. Tanto el rolipram, como el 4NO2FDPMc, incrementaron los niveles de AMPc de forma similar usando las siguientes concentraciones (100, 300 y 1000  $\mu M$ ), mientras que el 4AFDPMc incremento los niveles de AMPc en mayor grado e incluso de una manera significativa comparándolo con forskolin + rolipram 1000  $\mu M$ .



**Figura 4.** Concentraciones de AMPc inducidas por los análogos de talidomida, rolipram y forskolin en muestras uterinas de rata gestante. La acumulación de AMPc inducido por forskolin solo (10  $\mu$ M) y combinado con rolipram, 4AFDPMe y 4NO2FDPMe se obtuvieron a concentraciones crecientes (100, 300 1000  $\mu$ M). Cada columna representa el valor promedio de cuatro experimentos ( $n = 4$ ) para ambos análogos, rolipram y forskolin; las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$  EEM). † = Diferente de la basal; ‡ = Diferente de forskolin; § = Diferente de FSK+Rolipram 1000  $\mu$ M. Las diferencias estadísticas entre los compuestos fueron tomadas como significativas,  $p < 0.05$ .

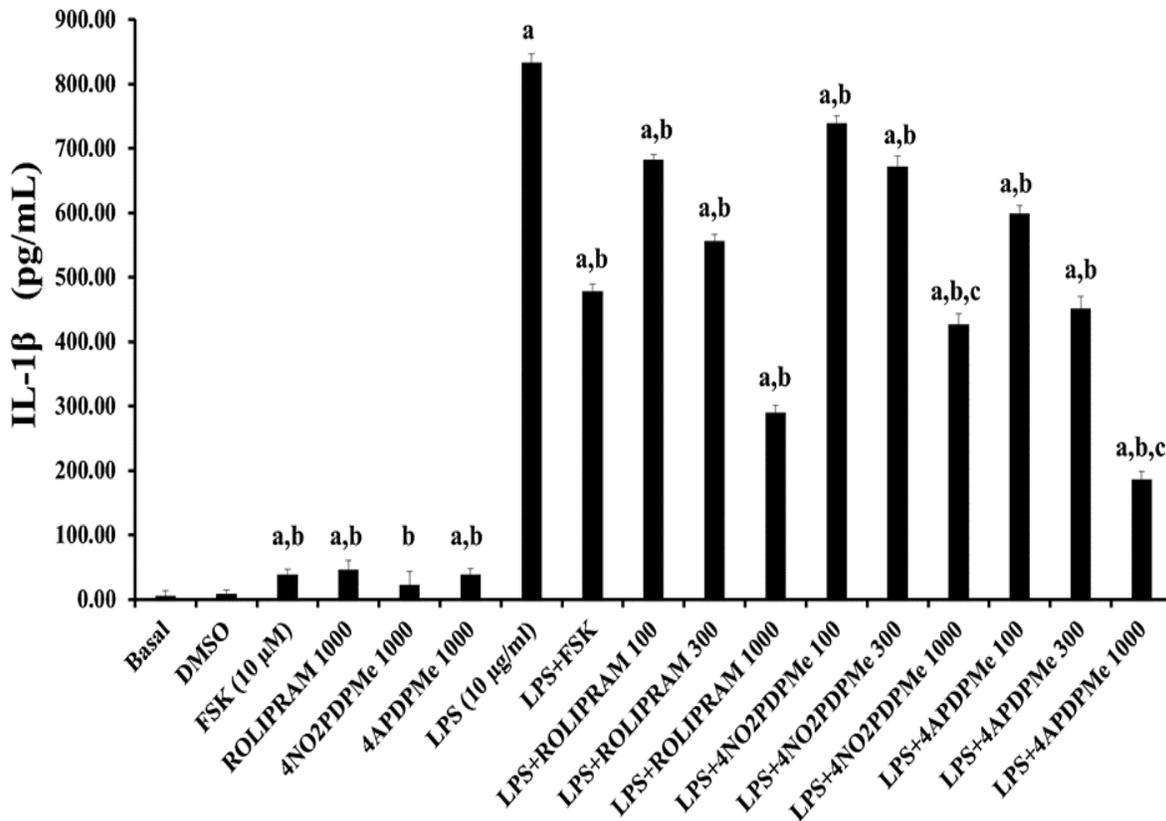
### **5.3. Análogos de talidomida inhiben citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ inducidas por LPS, e incrementan la citocina antiinflamatoria IL-10**

A fin de evaluar la inmunomodulación, las propiedades antiinflamatorias de ambos análogos de talidomida como inhibidores de la PDE4, y los efectos preventivos sobre la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  (Fig. 5) e IL-1 $\beta$  (Fig. 6), se utilizaron explantes uterinos de rata gestante. La figura 5, muestra el efecto inhibitorio de los análogos de la talidomida, rolipram y forskolin sobre la producción del TNF- $\alpha$  inducida por LPS. La concentración basal no mostró modificación significativa en relación con el DMSO. También, se utilizó una concentración de 1000  $\mu$ M de ambos análogos y de rolipram, que no mostro diferencia entre las concentraciones de TNF- $\alpha$  del grupo de inhibidores de PDE-4. Forskolin fue usado a una concentración de 10  $\mu$ M para todos los experimentos. Para ambos análogos y rolipram fueron usadas también concentraciones crecientes de 100, 300 y 1000  $\mu$ M combinadas con forskolin, que disminuyeron las concentraciones del TNF- $\alpha$  de forma significativa en comparación con la concentración de TNF- $\alpha$  inducida por LPS. El LPS (10  $\mu$ g/mL) junto con el forskolin (10  $\mu$ M) disminuyo la concentración de TNF- $\alpha$  significativamente en comparación con los niveles de TNF- $\alpha$  inducidos por LPS,  $p < 0.05$ . Con relación a la inhibición de la producción de TNF- $\alpha$  inducida por ambos análogos y rolipram a diferentes concentraciones (100, 300 y 1000  $\mu$ M) e incubados con LPS y forskolin, se puede observar el efecto inhibitorio sobre el TNF- $\alpha$  con el siguiente orden de eficacia: 4AFDPM $e$  > rolipram > 4NO2FDPM $e$ , ( $p < 0.05$ ).



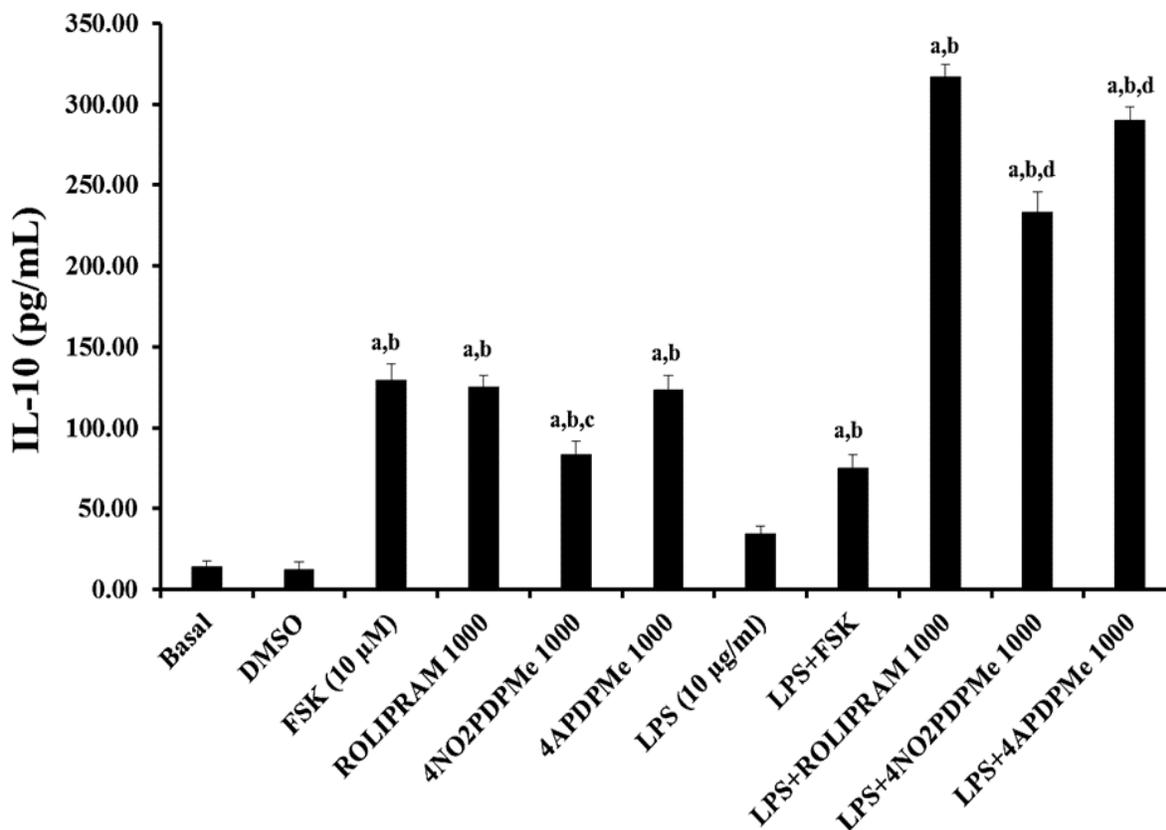
**Figura 5.** Efecto inhibitorio de ambos análogos de talidomida, rolipram y forskolin sobre la producción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS en muestras uterinas de rata gestante. Las muestras uterinas fueron cultivados en presencia de LPS (10  $\mu$ g/mL), con los inhibidores de la PDE-4 a concentraciones crecientes, 100, 300 y 1000  $\mu$ M, y con forskolin, FSK (10  $\mu$ M) por 24 horas. La basal y el DMSO, se realizaron sin la adición de LPS, o de algún otro compuesto. Cada columna representa el valor promedio de cuatro experimentos ( $n = 4$ ) para todos los compuestos ensayados; las barras verticales indican el error estándar de la media ( $\pm$  EEM); a = Diferente de la basal; b = Diferente de LPS; c = Diferente de LPS+Rolipram 1000  $\mu$ M,  $p < 0.05$ .

La figura 6, muestra el efecto inhibitorio sobre la producción de la IL-1 $\beta$  inducida por LPS en muestras uterinas de rata gestante. Tanto ambos análogos, como el rolipram a la concentración de 1000  $\mu$ M, tuvieron una ligera modificación significativa en relación con el control basal y el DMSO. No hubo diferencias entre la basal y el DMSO. Se observó una diferencia significativa entre las concentraciones de TNF- $\alpha$  de LPS y las de LPS+FSK,  $p < 0.05$ . Para ambos análogos y rolipram se usaron concentraciones crecientes de 100, 300 y 1000  $\mu$ M en combinación con forskolin y LPS, cuyas concentraciones disminuyeron las concentraciones de IL-1 $\beta$  en forma dependiente de la concentración, y de forma significativa con la concentración más alta de 1000  $\mu$ M. El orden de eficacia sobre la inhibición de la producción de la IL-1 $\beta$  fue la siguiente: 4AFDPMe > rolipram > 4NO2FDPMe, ( $p < 0.05$ ). Por lo tanto, los inhibidores de la PDE4 como el forskolin prevenían parcialmente y disminuían la producción de ambas citocinas proinflamatorias de una forma significativa dependiente de la concentración.



**Figura 6.** Efecto inhibitorio de los análogos, rolipram y forskolin sobre la producción de IL-1 $\beta$  inducida por LPS en explantes uterinos de ratas gestantes. Todos los explantes fueron cultivados en presencia de LPS (10  $\mu$ g/mL), con los inhibidores de la PDE-4 a 100, 300 y 1000  $\mu$ M y con forskolin, FSK (10  $\mu$ M) por 24 horas. Los experimentos control, basal y DMSO, se realizaron sin la presencia de LPS, o algún otro compuesto. Cada columna representa el valor promedio de cuatro experimentos ( $n = 4$ ) para todos los compuestos ensayados; las barras verticales indican el error estándar de la media ( $\pm$  EEM); a = Diferente de la Basal; b = Diferente de LPS; c = Diferente de LPS+Rolipram 1000  $\mu$ M,  $p < 0.05$ .

La figura 7, muestra el incremento en la producción de la citocina antiinflamatoria, IL-10, inducida por ambos análogos, forskolin y rolipram en presencia de LPS. Este experimento fue realizado para confirmar el efecto inmunomodulador y antiinflamatorio de ambos análogos de talidomida en muestras uterinas de rata gestante. En este caso, solamente se utilizó la concentración más alta de los inhibidores de la PDE4 (1000  $\mu$ M), y de forskolin se empleó una concentración de 10  $\mu$ M. Rolipram y ambos análogos aumentaron significativamente las concentraciones de la IL-10, comparados con la basal y el DMSO, que se asemeja a lo observado con la citocinas proinflamatorias, aunque en mayor proporción. El LPS no elevó la concentración de la IL-10 de forma significativa; incluso en combinación con forskolin. No obstante, los inhibidores de la PDE-4 causaron un incremento marcado de IL-10, a pesar del efecto limitado inducido por LPS. Por lo tanto, el rolipram indujo la concentraciones más altas de IL-10 con el siguiente orden de eficacia: rolipram > 4AFDPMe > 4NO2FDPMe ( $p < 0.05$ ), mientras que forskolin por si solo produjo un modesto incremento de esa citocina antiinflamatoria.



**Figura 7.** Efecto de los análogos de talidomida, rolipram y forskolin sobre la producción de la IL-10 inducida por LPS en explantes uterinos de rata gestante. Todos los explantes fueron cultivados en presencia de LPS (10 µg/mL), con los inhibidores de la PDE-4 a concentraciones de 100, 300 y 1000 µM, y con FSK solo (10 µM) por 24 horas. La basal y el DMSO, se realizaron sin la presencia de LPS, o algún otro compuesto. Cada columna representa el promedio de cuatro experimentos (n = 4) para todos los compuestos ensayados; las barras verticales indican el error estándar de la media ( $\pm$  EEM); a = Diferente de la Basal; b = Diferente de LPS; c = Diferente de Rolipram 1000 µM; d = Diferente de LPS+Rolipram,  $p < 0.05$ .

## 6. Discusión

Este estudio muestra el efecto útero-relajante de dos análogos de la talidomida sobre las contracciones fásicas y tónicas del útero de rata gestante, inducidas por,  $\text{PGF2}\alpha$  ( $1\mu\text{M}$ ),  $\text{K}^+$  (40 mM) y  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM), las que se relacionaron con el incremento de AMPc y con la probable inhibición de la PDE-4. Algunos inhibidores de la PDE-4 que tienen diferentes afinidades para inhibir distintas isoformas de la PDE-4, como el apremilast, un inhibidor selectivo de la PDE-4 y del  $\text{TNF}\alpha$ , puede inhibir a todas las isoformas de la PDE-4, y tiene similitud estructural química con la familia de análogos de talidomida ensayados en este estudio [118]. Estos resultados sugieren que los análogos de talidomida podrían inhibir a la PDE-4 en útero de rata gestante, como ha sido reportado con otros inhibidores de la PDE-4 ensayados en útero de rata y de humano [114, 116]. Las propiedades útero-relajantes de ambos análogos de talidomida fueron ensayadas sobre las contracciones fásicas y tónicas en útero de rata gestante. Así, para evaluar si la inhibición de las contracciones fue una consecuencia de la inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por el receptor o por el voltaje, o por estimulación de la enzima AC, se utilizaron como controles de comparación a la nifedipina y al forskolin, puesto que ambos compuestos inhiben las contracciones uterinas bloqueando los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  e incrementando el AMPc, respectivamente [119, 120]. Los resultados de rolipram, (inhibidor selectivo de la PDE-4), están de acuerdo con un reporte anterior en miometrio humano [121], y el forskolin, que inducen el incremento de AMPc por inhibición de la PDE-4 y por estimulación de la AC, respectivamente [119]. Los análogos de la talidomida inhibieron en forma dependiente de la concentración las contracciones uterinas por  $\text{PGF2}\alpha$  ( $1\mu\text{M}$ ),  $\text{K}^+$  (40 mM) y  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM), indicando que ambos análogos tienen una acción similar al rolipram tanto en potencia como en eficacia, esto sugiere que ambos

análogos pueden reconocer las mismas isoformas de la PDE-4s [58, 121]; es posible que los compuestos y rolipram tengan el mismo blanco molecular en el útero de rata gestante [113].

Se sabe que las contracciones miométriales son reguladas por la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y por la fosfatasa de la cadena ligera de la Miosina (MLCP). El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, activa a la MLCK, mientras que la activación de la MLCP es dependiente de la presencia del AMPc [122]. Se ha propuesto, que el mecanismo de acción de los inhibidores de PDE-4, puede inducir la relajación del músculo liso uterino a través de la vía de la fosforilación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual puede activar o bloquear diversos blancos proteicos, como los canales de calcio operados por el voltaje (VOC) o los canales de calcio operados por el receptor (ROC) [113]. Ya que los inhibidores de la PDE-4 incrementan las concentraciones intracelulares de AMPc y activan a la PKA, las contracciones tónicas y fásicas del útero de rata gestante son inhibidas fácilmente, pues está relacionado con la inhibición de otras proteínas blanco a través de la fosforilación mediada por la PKA, como la Rho-cinasa (ROCK), que puede fosforilar la subunidad de la fosfatasa de la miosina (MLCP-MYPT1), bifosforilar a la cadena ligera reguladora de la miosina, y también fosforilar a la MLCP, produciendo la contracción uterina, como se ha reportado en el musculo liso vascular y en el miometrio humano [59, 123-125]. Algunas estudios indican que los inhibidores de la PDE-4 pueden bloquear la entrada de calcio, como lo hace rolipram y los análogos de talidomida en este estudio, debido a su estructura similar con la nifedipina, verapamil y nicardipina, que produce la relajación uterina [56, 113, 120]; de hecho, los resultados de este estudio sugieren que ambos análogos bloquean la entrada de calcio. En resumen, los resultados de este trabajo concuerdan en su mayoría con otros reportes donde el forskolin y el rolipram [125, 126], así como estos

análogos de talidomida producen relajación uterina por el incremento de AMPc y probablemente por el mecanismo de acción de rolipram y de los análogos de talidomida como potenciales bloqueadores de canales de calcio [113].

Los lipopolisacáridos (LPS) son potentes inductores de la respuesta inmunitaria durante el parto prematuro tanto en humanos como en animales [19, 127]. Los análogos de talidomida usados en este estudio inhibieron la liberación de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducida por LPS, cuyo efecto inhibitorio fue comparado con el efecto inhibitorio de rolipram y otros inhibidores de la PDE-4 sobre la secreción de citocinas proinflamatorias en macrófagos, monocitos y células mononucleadas de sangre periférica [128-130]. Las vías de señalización propuestas e implicadas en la inhibición del TNF $\alpha$  son la vía de AMPc/PKA, y la vía de inhibición del factor nuclear kappa B, NF- $\kappa$ B [66, 131]. Se ha reportado que la inactivación de la transcripción del NF- $\kappa$ B [52, 132] no afecta la secreción de la IL-10 [133]; es más, actualmente se sabe que incrementa, debido a que la IL-10 se transcribe por siete diferentes factores de transcripción en macrófagos [134], y porque el promotor de la IL-10 posee cuatro blancos moleculares relacionados con el elemento de unión en respuesta al AMPc, (CREB 'cAMP response element-binding', en inglés) [133]. El tipo de análogos de talidomida estudiados en nuestro trabajo, jamás han sido reportados como agentes útero-relajantes; además, se ha evaluado su efecto inmunomodulador como agentes hepatoprotectores, puesto que son capaces de aumentar la IL-10 en modelos murinos [113, 135, 136].

El desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del parto prematuro está enfocado en la identificación de blancos moleculares, que participen en las vías de señalización que inducen a la contracción uterina. Un ejemplo de esto, es el uso clínico del

salbutamol o la terbutalina, que son usados frecuentemente en la ginecológica, y que están asociados con varios efectos adversos serios sobre el feto y la madre [20, 21]. La disminución de la síntesis de citocinas proinflamatorias y el incremento de AMPc mediante la combinación de fármacos tocolíticos e inhibidores de PDE-4 podrían amortiguar el proceso inflamatorio, que es un factor desencadenante en el parto prematuro [58, 116]. Recientes estudios clínicos con apremilast, uno de los principales análogos de la talidomida diseñado como inhibidor de la PDE-4 para trastornos inflamatorios y/o enfermedades autoinmunes, ha sido aprobado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como la psoriasis y la artritis psoriática [109]; por lo tanto, el incremento en los niveles intracelulares del AMPc y la disminución de citocinas proinflamatorias, inducido por los análogos de talidomida ensayados en este trabajo podrían ser usados para el tratamiento del parto prematuro, en especial cuando el blanco molecular es la PDE-4, en particular la isoforma PDE-4B cuya expresión es predominante en respuestas inflamatorias asociadas con infecciones uterinas, así como también para el tratamiento de enfermedades autoinmunes [137-139]. Se ha considerado realizar otros estudios para poder determinar más detalladamente las interacciones de ambos análogos con diferentes isoformas de la PDE-4; sin embargo, los efectos útero-relajantes y antiinflamatorios de los análogos de talidomida fueron asociados con el incremento de AMPc mediante la inhibición de la PDE-4 en el útero de rata gestante.

Con respecto a los posibles efectos adversos de estos análogos de talidomida no teratogénicos, los reportes indican que los análogos parecen ser no tóxicos y no mutagénicos cuando son empleados en cultivo celular *in vitro*, o en modelos animales agudos y crónicos, *in vivo* [113, 128, 135, 136]. Probablemente, estos análogos de talidomida pueden tener efectos secundarios similares a los del apremilast, que tiene un perfil de seguridad aceptable;

de hecho, los efectos secundarios observados en pacientes han sido, gastritis leve o moderada, diarrea y náuseas que tienden a desaparecer al suspender el tratamiento [140]. Sin embargo, el rolipram muestra los mismos efectos adversos, pero más severos. En conclusión, las propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y útero-relajantes de ambos análogos de talidomida, 4APDPMe y 4NO<sub>2</sub>PDPMe, como inhibidores de PDE-4 y probables bloqueadores de canales de Ca<sup>2+</sup>, los convierte en probables agentes tocolíticos potencialmente seguros y eficaces en el área de la ginecología que necesita introducir nuevos tratamientos farmacológicos para el parto prematuro.

## **7. Conclusión**

En conclusión, el efecto útero-relajante y antiinflamatorio de ambos análogos de talidomida, 4AFDPMé y 4NO<sub>2</sub>FDPMé, es considerado consecuencia de la inhibición de la PDE-4, debido al incremento de los niveles intracelulares del AMPc presentes en útero de rata gestante. Por lo tanto, las propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y útero-relajantes de ambos análogos de talidomida les da el carácter de agentes tocolíticos potencialmente efectivos para el tratamiento farmacológico en casos de parto prematuro por infección.

## 8. Bibliografía

1. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). *Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983*. Biochem J, 1984. **219**(2): p. 345-73.
2. Reich, E.S., *Pre-term births on the rise*. Nature, 2012. **485**(7396): p. 20.
3. Lopez Bernal, A., *Overview. Preterm labour: mechanisms and management*. BMC Pregnancy Childbirth, 2007. **7 Suppl 1**: p. S2.
4. Beck, S., et al., *The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity*. Bull World Health Organ, 2010. **88**(1): p. 31-8.
5. Blencowe, H., et al., *Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births*. Reprod Health, 2013. **10 Suppl 1**: p. S2.
6. Blencowe, H., et al., *National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications*. The Lancet. **379**(9832): p. 2162-2172.
7. Braveman, P.A., et al., *The role of socioeconomic factors in Black-White disparities in preterm birth*. Am J Public Health, 2015. **105**(4): p. 694-702.
8. Hackenhaar, A.A., E.P. Albernaz, and T.M. da Fonseca, *Preterm premature rupture of the fetal membranes: association with sociodemographic factors and maternal genitourinary infections*. J Pediatr (Rio J), 2014. **90**(2): p. 197-202.
9. Kemp, M.W., *Preterm birth, intrauterine infection, and fetal inflammation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 574.
10. Burd, I., B. Balakrishnan, and S. Kannan, *Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth*. Am J Reprod Immunol, 2012. **67**(4): p. 287-94.
11. DiGiulio, D.B., *Diversity of microbes in amniotic fluid*. Semin Fetal Neonatal Med, 2012. **17**(1): p. 2-11.
12. Zhou, X., et al., *Recent advances in understanding the microbiology of the female reproductive tract and the causes of premature birth*. Infect Dis Obstet Gynecol, 2010. **2010**: p. 737425.
13. HASBUN, H., *Infección y parto prematuro: Enlace epidemiológico y bioquímico*. Revista chilena de infectología, 2000. **17**(1): p. 7-17.
14. Mendz, G.L., N.O. Kaakoush, and J.A. Quinlivan, *Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women*. Front Cell Infect Microbiol, 2013. **3**: p. 58.
15. Mor, G. and I. Cardenas, *The immune system in pregnancy: a unique complexity*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 425-33.
16. Nadeau-Vallee, M., et al., *Novel Noncompetitive IL-1 Receptor-Biased Ligand Prevents Infection- and Inflammation-Induced Preterm Birth*. J Immunol, 2015. **195**(7): p. 3402-15.
17. Xu, C., et al., *Effects of PGF2alpha on the expression of uterine activation proteins in pregnant human myometrial cells from upper and lower segment*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(7): p. 2975-83.
18. Farina, L. and C. Winkelman, *A review of the role of proinflammatory cytokines in labor and noninfectious preterm labor*. Biol Res Nurs, 2005. **6**(3): p. 230-8.
19. Gomez-Lopez, N., et al., *Immune cells in term and preterm labor*. Cell Mol Immunol, 2014. **11**(6): p. 571-81.

20. de Heus, R., et al., *Adverse drug reactions to tocolytic treatment for preterm labour: prospective cohort study*. *BMJ*, 2009. **338**: p. b744.
21. Hubinont, C. and F. Debieve, *Prevention of preterm labour: 2011 update on tocolysis*. *J Pregnancy*, 2011. **2011**: p. 941057.
22. Haas, D.M., et al., *Short-term tocolytics for preterm delivery - current perspectives*. *Int J Womens Health*, 2014. **6**: p. 343-9.
23. Mercer, B.M., A.A. Merlino, and M. Society for Maternal-Fetal, *Magnesium sulfate for preterm labor and preterm birth*. *Obstet Gynecol*, 2009. **114**(3): p. 650-68.
24. Campbell, S.C., et al., *Intrapartum magnesium sulfate and the potential for cardiopulmonary drug-drug interactions*. *Ther Drug Monit*, 2014. **36**(4): p. 544-8.
25. King, J.F., et al., *Calcium channel blockers for inhibiting preterm labour*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003(1): p. CD002255.
26. Nassar, A.H., J. Aoun, and I.M. Usta, *Calcium channel blockers for the management of preterm birth: a review*. *Am J Perinatol*, 2011. **28**(1): p. 57-66.
27. Conde-Agudelo, A., R. Romero, and J.P. Kusanovic, *Nifedipine in the management of preterm labor: a systematic review and metaanalysis*. *Am J Obstet Gynecol*, 2011. **204**(2): p. 134 e1-20.
28. Loudon, J.A., K.M. Groom, and P.R. Bennett, *Prostaglandin inhibitors in preterm labour*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2003. **17**(5): p. 731-44.
29. Abou-Ghannam, G., I.M. Usta, and A.H. Nassar, *Indomethacin in pregnancy: applications and safety*. *Am J Perinatol*, 2012. **29**(3): p. 175-86.
30. Flenady, V., et al., *Oxytocin receptor antagonists for inhibiting preterm labour*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014(6): p. CD004452.
31. Kew, K.M., S. Dias, and C.J. Cates, *Long-acting inhaled therapy (beta-agonists, anticholinergics and steroids) for COPD: a network meta-analysis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014(3): p. CD010844.
32. Bowes, W.A., *The role of antibiotics in the prevention of preterm birth*. *F1000 Med Rep*, 2009. **1**.
33. Seelbach-Goebel, B., *Antibiotic Therapy for Premature Rupture of Membranes and Preterm Labor and Effect on Fetal Outcome*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2013. **73**(12): p. 1218-1227.
34. Cabrera-Rivera, L., *Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Ruptura Prematura de Membranas (RPM)*. Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS, 2009. **321GRR**.
35. Song, D. and Y. Shi, *Immune system modifications and feto-maternal immune tolerance*. *Chin Med J (Engl)*, 2014. **127**(17): p. 3171-80.
36. Robertson, S.A., *Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract*. *Cell Tissue Res*, 2005. **322**(1): p. 43-52.
37. Woidacki, K., et al., *Mast cells rescue implantation defects caused by c-kit deficiency*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e462.
38. Abrahams, V.M., et al., *Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy*. *Am J Reprod Immunol*, 2004. **51**(4): p. 275-82.
39. Koga, K. and G. Mor, *Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders*. *Am J Reprod Immunol*, 2010. **63**(6): p. 587-600.
40. Mor, G., et al., *Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site*. *Ann N Y Acad Sci*, 2011. **1221**: p. 80-7.
41. Bytautiene, E., et al., *IgE-independent mast cell activation augments contractility of nonpregnant and pregnant guinea pig myometrium*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008. **147**(2): p. 140-6.

42. Rudolph, M.I., I.G. Rojas, and A.B. Penissi, *Uterine mast cells: a new hypothesis to understand how we are born*. *Biocell*, 2004. **28**(1): p. 1-11.
43. Wu, X., et al., *Myometrial mechanoadaptation during pregnancy: implications for smooth muscle plasticity and remodelling*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(4): p. 1360-73.
44. Woidacki, K., A.C. Zenclussen, and F. Siebenhaar, *Mast cell-mediated and associated disorders in pregnancy: a risky game with an uncertain outcome?* *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 231.
45. Piccinni, M.P., et al., *Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy*. *J Neuroimmunol*, 2000. **109**(1): p. 30-3.
46. Agrawal, V. and E. Hirsch, *Intrauterine infection and preterm labor*. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2012. **17**(1): p. 12-9.
47. Bastek, J.A., L.M. Gomez, and M.A. Elovitz, *The role of inflammation and infection in preterm birth*. *Clin Perinatol*, 2011. **38**(3): p. 385-406.
48. Hutchinson, J.L., et al., *Lipopolysaccharide promotes contraction of uterine myocytes via activation of Rho/ROCK signaling pathways*. *FASEB J*, 2014. **28**(1): p. 94-105.
49. Lindstrom, T.M. and P.R. Bennett, *The role of nuclear factor kappa B in human labour*. *Reproduction*, 2005. **130**(5): p. 569-81.
50. Goldenberg, R.L., J.C. Hauth, and W.W. Andrews, *Intrauterine infection and preterm delivery*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(20): p. 1500-7.
51. Burnouf, C. and M.P. Pruniaux, *Recent advances in PDE4 inhibitors as immunoregulators and anti-inflammatory drugs*. *Curr Pharm Des*, 2002. **8**(14): p. 1255-96.
52. Herve, R., et al., *The PDE4 inhibitor rolipram prevents NF-kappaB binding activity and proinflammatory cytokine release in human chorionic cells*. *J Immunol*, 2008. **181**(3): p. 2196-202.
53. Salminen, A., et al., *Maternal endotoxin-induced preterm birth in mice: fetal responses in toll-like receptors, collectins, and cytokines*. *Pediatr Res*, 2008. **63**(3): p. 280-6.
54. Chi, Z.L., et al., *Effects of rolipram, a selective inhibitor of type 4 phosphodiesterase, on lipopolysaccharide-induced uveitis in rats*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. **45**(8): p. 2497-502.
55. Korhonen, R., et al., *Attenuation of TNF production and experimentally induced inflammation by PDE4 inhibitor rolipram is mediated by MAPK phosphatase-1*. *Br J Pharmacol*, 2013. **169**(7): p. 1525-36.
56. Azam, M.A. and N.S. Tripuraneni, *Selective Phosphodiesterase 4B Inhibitors: A Review*. *Sci Pharm*, 2014. **82**(3): p. 453-81.
57. Schmitz, T., et al., *PDE4 inhibition prevents preterm delivery induced by an intrauterine inflammation*. *J Immunol*, 2007. **178**(2): p. 1115-21.
58. Verli, J., et al., *Uterus-relaxing effect of beta2-agonists in combination with phosphodiesterase inhibitors: studies on pregnant rat in vivo and on pregnant human myometrium in vitro*. *J Obstet Gynaecol Res*, 2013. **39**(1): p. 31-9.
59. Shmygol, A., et al., *Control of uterine Ca<sup>2+</sup> by membrane voltage: toward understanding the excitation-contraction coupling in human myometrium*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1101**: p. 97-109.
60. Webb, R.C., *Smooth muscle contraction and relaxation*. *Adv Physiol Educ*, 2003. **27**(1-4): p. 201-6.
61. Pehlivanoglu, B., S. Bayrak, and M. Dogan, *A close look at the contraction and relaxation of the myometrium; the role of calcium*. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 2013. **14**(4): p. 230-4.

62. Peltier, M.R., *Immunology of term and preterm labor*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 122.
63. Pollard, J.K. and M.D. Mitchell, *Intrauterine infection and the effects of inflammatory mediators on prostaglandin production by myometrial cells from pregnant women*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(2): p. 682-6.
64. Price, S.A. and A.L. Bernal, *Uterine quiescence: the role of cyclic AMP*. Exp Physiol, 2001. **86**(2): p. 265-72.
65. Fredholm, B.B., *[The Nobel Prize to detailed studies of G protein-coupled receptors. This years Nobel Prize in chemistry provides important knowledge--but it might take a while before it can be practically applied]*. Lakartidningen, 2012. **109**(49-50): p. 2274-5.
66. Gerlo, S., et al., *Cyclic AMP: a selective modulator of NF-kappaB action*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(23): p. 3823-41.
67. Tasken, K. and E.M. Aandahl, *Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 137-67.
68. Baumer, W., et al., *Highly selective phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of allergic skin diseases and psoriasis*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2007. **6**(1): p. 17-26.
69. Oger, S., et al., *Evidence for a role of phosphodiesterase 4 in lipopolysaccharide-stimulated prostaglandin E2 production and matrix metalloproteinase-9 activity in human amniochorionic membranes*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 8082-9.
70. Tokoyoda, K., et al., *Up-regulation of IL-4 production by the activated cAMP/cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A) pathway in CD3/CD28-stimulated naive T cells*. Int Immunol, 2004. **16**(5): p. 643-53.
71. Mosenden, R. and K. Tasken, *Cyclic AMP-mediated immune regulation--overview of mechanisms of action in T cells*. Cell Signal, 2011. **23**(6): p. 1009-16.
72. Yuan, W. and A. Lopez Bernal, *Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation*. BMC Pregnancy Childbirth, 2007. **7 Suppl 1**: p. S10.
73. Sanborn, B.M., *Hormones and calcium: mechanisms controlling uterine smooth muscle contractile activity. The Litchfield Lecture*. Exp Physiol, 2001. **86**(2): p. 223-37.
74. Word, R.A., *Myosin phosphorylation and the control of myometrial contraction/relaxation*. Semin Perinatol, 1995. **19**(1): p. 3-14.
75. Sanborn, B.M., et al., *Molecular signaling through G-protein-coupled receptors and the control of intracellular calcium in myometrium*. J Soc Gynecol Investig, 2005. **12**(7): p. 479-87.
76. Nalli, A.D., et al., *Regulation of Gbetagamma-dependent PLC-beta3 activity in smooth muscle: inhibitory phosphorylation of PLC-beta3 by PKA and PKG and stimulatory phosphorylation of Galphai-GTPase-activating protein RGS2 by PKG*. Cell Biochem Biophys, 2014. **70**(2): p. 867-80.
77. Kamp, T.J. and J.W. Hell, *Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C*. Circ Res, 2000. **87**(12): p. 1095-102.
78. Brini, M. and E. Carafoli, *The plasma membrane Ca(2)+ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(2).
79. Billington, C.K. and R.B. Penn, *Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle*. Respir Res, 2003. **4**: p. 2.
80. Barnes, P.J., *Theophylline*. Pharmaceuticals (Basel), 2010. **3**(3): p. 725-747.
81. Torphy, T.J., *Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(2): p. 351-70.

82. Mehats, C., et al., *Pregnancy induces a modulation of the cAMP phosphodiesterase 4-conformers ratio in human myometrium: consequences for the utero-relaxant effect of PDE4-selective inhibitors*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(2): p. 817-23.
83. Jimenez, J.L., et al., *Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor-kappaB and nuclear factor of activated T cells activation*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(2): p. 753-9.
84. Liu, J., M. Chen, and X. Wang, *Calcitonin gene-related peptide inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-12 release from mouse peritoneal macrophages, mediated by the cAMP pathway*. Immunology, 2000. **101**(1): p. 61-7.
85. Sheibanie, A.F., et al., *Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells*. FASEB J, 2004. **18**(11): p. 1318-20.
86. Vignola, A.M., *PDE4 inhibitors in COPD--a more selective approach to treatment*. Respir Med, 2004. **98**(6): p. 495-503.
87. Carlson, C.R., et al., *Delineation of type I protein kinase A-selective signaling events using an RI anchoring disruptor*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 21535-45.
88. Francis, S.H., M.D. Houslay, and M. Conti, *Phosphodiesterase inhibitors: factors that influence potency, selectivity, and action*. Handb Exp Pharmacol, 2011(204): p. 47-84.
89. Essayan, D.M., et al., *Differential efficacy of lymphocyte- and monocyte-selective pretreatment with a type 4 phosphodiesterase inhibitor on antigen-driven proliferation and cytokine gene expression*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **99**(1 Pt 1): p. 28-37.
90. Essayan, D.M., et al., *Differential regulation of human antigen-specific Th1 and Th2 lymphocyte responses by isozyme selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **282**(1): p. 505-12.
91. Layseca-Espinoza E, S.M.F., González-Amaro R., *Phosphodiesterase inhibitors as immunomodulatory drugs*. inmunología, 2003. **22**: p. 39-52.
92. Mehats, C., et al., *PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction*. FASEB J, 2003. **17**(13): p. 1831-41.
93. Parikh, N. and A.K. Chakraborti, *Phosphodiesterase 4 (PDE4) Inhibitors in the Treatment of COPD: Promising Drug Candidates and Future Directions*. Curr Med Chem, 2016. **23**(2): p. 129-41.
94. Schett, G., et al., *Apremilast: a novel PDE4 inhibitor in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2010. **2**(5): p. 271-8.
95. Wittmann, M. and P.S. Helliwell, *Phosphodiesterase 4 inhibition in the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis and other chronic inflammatory diseases*. Dermatol Ther (Heidelb), 2013. **3**(1): p. 1-15.
96. Beeh, K.M., et al., *Effects of piclamilast, a selective phosphodiesterase-4 inhibitor, on oxidative burst of sputum cells from mild asthmatics and stable COPD patients*. Lung, 2004. **182**(6): p. 369-77.
97. Boswell-Smith, V. and D. Spina, *PDE4 inhibitors as potential therapeutic agents in the treatment of COPD-focus on roflumilast*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2007. **2**(2): p. 121-9.
98. E, F.-M., *Chapter 1: Thalidomide and its analogs: A potential immunomodulatory alternative for treating liver diseases and cirrhosis*. En: *Liver cirrhosis, causes, diagnosis and treatment*. . Nova Science Publishers, Inc. New York, 2011.
99. Marriott, J.B., et al., *Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF-alpha and TNFR2 during co-stimulation of both CD4(+) and CD8(+) T cells*. Clin Exp Immunol, 2002. **130**(1): p. 75-84.

100. Teo, S.K., *Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy*. AAPS J, 2005. **7**(1): p. E14-9.
101. Zhu, Y.X., K.M. Kortuem, and A.K. Stewart, *Molecular mechanism of action of immunomodulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2013. **54**(4): p. 683-7.
102. Pendino, P., *Talidomida y análogos de la talidomida*. Arch Alerg Inmunol Clin., 2005. **36**(2): p. 41-51.
103. Hideshima, T., et al., *Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy*. Blood, 2000. **96**(9): p. 2943-50.
104. Zhou, S., et al., *Thalidomide-a notorious sedative to a wonder anticancer drug*. Curr Med Chem, 2013. **20**(33): p. 4102-8.
105. Ito, T., H. Ando, and H. Handa, *Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(9): p. 1569-79.
106. Ito, T., et al., *Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity*. Science, 2010. **327**(5971): p. 1345-50.
107. Cauli, A., et al., *Clinical potential of apremilast in the treatment of psoriatic arthritis*. Immunotargets Ther, 2014. **3**: p. 91-6.
108. Chang, X.B. and A.K. Stewart, *What is the functional role of the thalidomide binding protein cereblon?* Int J Biochem Mol Biol, 2011. **2**(3): p. 287-94.
109. Deeks, E.D., *Apremilast: A Review in Psoriasis and Psoriatic Arthritis*. Drugs, 2015. **75**(12): p. 1393-403.
110. Lopez-Girona, A., et al., *Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide*. Leukemia, 2012. **26**(11): p. 2326-35.
111. Quach, H., et al., *Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma*. Leukemia, 2010. **24**(1): p. 22-32.
112. de Aluja, A.S., *[Laboratory animals and official Mexican norms (NOM-062-ZOO-1999)]*. Gac Med Mex, 2002. **138**(3): p. 295-8.
113. Fernandez-Martinez, E., et al., *Inhibition of Uterine Contractility by Thalidomide Analogs via Phosphodiesterase-4 Inhibition and Calcium Entry Blockade*. Molecules, 2016. **21**(10).
114. Oger, S., et al., *Anti-inflammatory and utero-relaxant effects in human myometrium of new generation phosphodiesterase 4 inhibitors*. Biol Reprod, 2004. **70**(2): p. 458-64.
115. Pugh, E.W., et al., *Comparison of variance components, ANOVA and regression of offspring on midparent (ROMP) methods for SNP markers*. Genet Epidemiol, 2001. **21** Suppl 1: p. S794-9.
116. Klukovits, A., et al., *Improving the relaxing effect of terbutaline with phosphodiesterase inhibitors: studies on pregnant rat uteri in vitro*. Life Sci, 2010. **87**(23-26): p. 733-7.
117. Sehringer, B., et al., *Formation of proinflammatory cytokines in human term myometrium is stimulated by lipopolysaccharide but not by corticotropin-releasing hormone*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4859-65.
118. Schafer, P.H., et al., *Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity*. Cell Signal, 2014. **26**(9): p. 2016-29.
119. Inoue, Y., K. Shimamura, and N. Sperelakis, *Forskolin inhibition of K<sup>+</sup> current in pregnant rat uterine smooth muscle cells*. Eur J Pharmacol, 1993. **240**(2-3): p. 169-76.
120. Katz, A.M., *Pharmacology and mechanisms of action of calcium-channel blockers*. J Clin Hypertens, 1986. **2**(3 Suppl): p. 28S-37S.

121. Mehats, C., et al., *Selective up-regulation of phosphodiesterase-4 cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-specific phosphodiesterase variants by elevated cAMP content in human myometrial cells in culture*. *Endocrinology*, 1999. **140**(7): p. 3228-37.
122. Lubomirov, L.T., et al., *Urocortin-induced decrease in Ca<sup>2+</sup> sensitivity of contraction in mouse tail arteries is attributable to cAMP-dependent dephosphorylation of MYPT1 and activation of myosin light chain phosphatase*. *Circ Res*, 2006. **98**(9): p. 1159-67.
123. Aguilar, H.N., et al., *Rho-kinase mediates diphosphorylation of myosin regulatory light chain in cultured uterine, but not vascular smooth muscle cells*. *J Cell Mol Med*, 2012. **16**(12): p. 2978-89.
124. Hudson, C.A., K.J. Heesom, and A. Lopez Bernal, *Phasic contractions of isolated human myometrium are associated with Rho-kinase (ROCK)-dependent phosphorylation of myosin phosphatase-targeting subunit (MYPT1)*. *Mol Hum Reprod*, 2012. **18**(5): p. 265-79.
125. Sim, M.K., *Effect of IUD on uterine cyclic AMP and the activities of adenylyl cyclase and phosphodiesterase during the oestrous cycle and early pregnancy in rats*. *J Reprod Fertil*, 1974. **39**(2): p. 399-402.
126. Revuelta, M.P., B. Cantabrana, and A. Hidalgo, *Pharmacological evidence for the contribution of polyamines as mediators of the transcriptional component involved in smooth muscle relaxation elicited by forskolin*. *Life Sci*, 1997. **61**(25): p. 2443-54.
127. Bizargity, P., et al., *Resistance to lipopolysaccharide-induced preterm delivery mediated by regulatory T cell function in mice*. *Biol Reprod*, 2009. **80**(5): p. 874-81.
128. Corral, L.G., et al., *Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha*. *J Immunol*, 1999. **163**(1): p. 380-6.
129. Gantner, F., et al., *In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor-alpha release by PDE inhibitors*. *Br J Pharmacol*, 1997. **121**(2): p. 221-31.
130. Yoshida, N., et al., *Differential effect of phosphodiesterase inhibitors on IL-13 release from peripheral blood mononuclear cells*. *Clin Exp Immunol*, 2001. **126**(3): p. 384-9.
131. Wall, E.A., et al., *Suppression of LPS-induced TNF-alpha production in macrophages by cAMP is mediated by PKA-AKAP95-p105*. *Sci Signal*, 2009. **2**(75): p. ra28.
132. Jin, S.L., S.L. Ding, and S.C. Lin, *Phosphodiesterase 4 and its inhibitors in inflammatory diseases*. *Chang Gung Med J*, 2012. **35**(3): p. 197-210.
133. Iyer, S.S. and G. Cheng, *Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease*. *Crit Rev Immunol*, 2012. **32**(1): p. 23-63.
134. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(3): p. 170-81.
135. Fernández-Martínez, E., *Effects of thalidomide and 3-phthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanamide on bile duct obstruction-induced cirrhosis in the rat*. *Drug development research*, 2001. **54**: p. 209-218.
136. Fernandez-Martinez, E., et al., *The thalidomide analog 3-phthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanoic acid improves the biliary cirrhosis in the rat*. *Exp Toxicol Pathol*, 2009. **61**(5): p. 471-9.
137. Guariento, S., et al., *New insights into PDE4B inhibitor selectivity: CoMFA analyses and molecular docking studies*. *Mol Divers*, 2016. **20**(1): p. 77-92.
138. Mehats, C., et al., *PDE4 as a target in preterm labour*. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2007. **7 Suppl 1**: p. S12.

139. Oger, S., et al., *Interleukin-1beta induces phosphodiesterase 4B2 expression in human myometrial cells through a prostaglandin E2- and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(12): p. 5524-31.
140. Del Rosso, J.Q. and L. Kircik, *Oral Apremilast for the Treatment of Plaque Psoriasis*. J Clin Aesthet Dermatol, 2016. **9**(9): p. 43-48.