

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Desarrollo de un método cuali-cuantitativo utilizando
el equipo UPLC MS-MS, para la determinación de
misoprostol ácido en orina**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología

AUTOR

Luis Alberto López Avila

ASESOR

César Máximo Fuertes Ruitón

Lima – Perú

2016

Dedicatoria

A nuestro Padre Eterno

A mi Rosa eterna : Sofia Ariana

A mis padres, mi esposa, mis familiares vivos y muertos...siempre presentes

A mis profesores por sus ejemplos.

A mis colegas por sus ejemplos y enseñanzas

Agradecimientos

A mi asesor Mg. César Máximo Fuertes Ruitón por su constante apoyo y consejos en el logro de la presente tesis.

A todas aquellas personas que en algún momento colaboraron en el logro de éste estudio

A los distinguidos miembros del Jurado, por sus valiosos aportes y tiempo empleados en la corrección, para mejorar y culminar satisfactoriamente la presente tesis.

A todos mis profesores que me enseñaron, cada uno desde su punto de vista, a ser mejor.

A mi familia por su constante apoyo.

A nuestro Creador, por tantas cosas que agradecer y tan poco que pedir.

ÍNDICE

Listado de figuras.....	VI
Listado de tablas.....	VII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
I. Introducción.....	1
II. Generalidades.....	3
Antecedentes del misoprostol.....	3
Aplicación clínica y estructura química del misoprostol ester.....	4
Propiedades fisicoquímicas.....	5
Aplicaciones no oficiales.....	5
Modo y Mecanismo de Acción.....	6
Vías de ingreso y propiedades farmacocinéticas de varias rutas de administración	9
Absorción.....	9
Biotransformación.....	16
Eliminación.....	17
Acumulación.....	17
Farmacocinética en la leche materna humana.....	17
Efectos sobre el útero y cuello uterino.....	18
Toxicocinética, Sintomatología, Efectos Secundarios y Teratogenicidad.....	22
Espectrometría de Masas.....	27
III. Materiales y Métodos.....	30
3.1. Materiales.....	31

3.2. Métodos.....	31
IV. Resultados.....	38
V. Discusión.....	47
VI. Conclusiones.....	51
VII. Recomendaciones.....	53
VIII. Referencias Bibliográficas.....	50

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.....	4
Figura 2	30
Figura 3.....	30
Figura 4	31
Figura 5.....	39
Figura 6	40
Figura 7.....	45

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	36
Tabla 2	38
Tabla 3	39
Tabla 4.....	41
Tabla 5.....	43
Tabla 6.....	46

RESUMEN

Se ha desarrollado un método, altamente selectivo y específico, usando el equipo Cromatógrafo Líquido de Ultraperformance con detector Masa – Masa (UPLC – MS – MS) para la determinación de misoprostol éster a través de su metabolito misoprostol ácido en veinte muestras de orina provenientes de las Divisiones Médico Legales del Perú de mujeres gestantes que presumiblemente habían ingerido tabletas de misoprostol. Se ensayaron procedimientos de extracción líquido – líquido, cuyos resultados, en el presente estudio; no fueron reproducibles. Debido a ello se ensayaron procedimientos de extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos especiales HLB cuyos resultados fueron reproducibles. Este método logra cuantificar concentraciones hasta partes por billón (ppb), con una concentración promedio de 40,23 y demás valores que están dentro de los límites 11,5 y 81,6 ppb. El método es de gran utilidad para demostrar el uso de misoprostol como abortivo en investigaciones judiciales.

Palabras clave: Misoprostol ácido, muestras de orina, cromatografía líquida, metabolito, extracción en fase sólida (SPE)

ABSTRACT

A method highly selective and specific has been developed using the UPLC MS-MS Waters, for the quali-quantitation of esther misoprostol throught its metabolite acid misoprostol in twenty urine samples from the Divisiones Medico Legales of Perú from pregnant women that maybe have ingested misoprostol tablets. It has been essayed liquid – liquid extractions but the results could not be reproducibles. Then it has been essayed a solid phase extraction (SPE) pre-treatment with HLB cartridges and the results could be reproducibles. This method attains the quantitation of parts per billion (ppb) with an average concentration of 40,23 and the others between 11,5 and 81,6ppb. This method is very usefulness in case of abortion in judgment investigations.

Key words: Acid misoprostol, urine samples, liquid chromatography, metabolite, solid phase extraction (SPE).

I. INTRODUCCION

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un método cuali-cuantitativo utilizando el equipo cromatógrafo líquido de ultraperformance con espectrómetro masa-masa (UPLC MS-MS), para la determinación de misoprostol ácido, en muestras de orina de personas que hayan consumido el misoprostol éster con fines abortivos. Este estudio se realizó en el Laboratorio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal del Ministerio Público. A nivel nacional no existe método e internacionalmente existen métodos en equipos similares como el estudio llevado a cabo por Zou et al. (2007)

El presente método cuali-cuantitativo, altamente selectivo y específico, se ha desarrollado utilizando el equipo UPLC MS-MS, el cual puede determinar misoprostol ácido en muestras biológicas, por ejemplo muestras de orina, de madres gestantes que hayan ingerido el misoprostol éster en dosis abortivas.

HIPÓTESIS

El método cuali-cuantitativo, desarrollado en el equipo UPLC MS-MS es altamente selectivo y específico para la determinación de misoprostol ácido en orina.

OBJETIVOS

General

Desarrollar un método cuali-cuantitativo, altamente selectivo y específico, para la determinación de misoprostol ácido en orina utilizando el equipo UPLC MS-MS, marca *Waters*, modelo *Acquity*.

Específicos

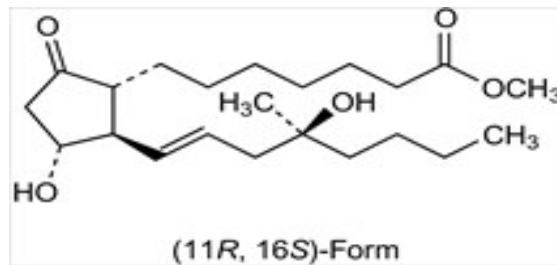
1. Desarrollar una técnica de extracción en fase sólida para aislar el misoprostol ácido de la orina.
2. Desarrollar una técnica para la determinación de misoprostol ácido en orina mediante el equipo UPLC MS-MS

II. GENERALIDADES

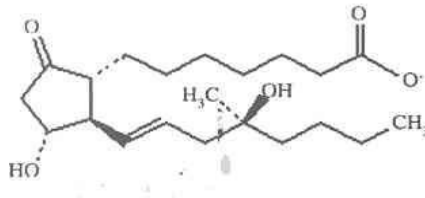
Antecedentes del Misoprostol

El misoprostol éster (15-deoxi-16-hidroximetil prostagladina E₁), fig.1, es una prostaglandina sintética E₁ análoga. Fue desarrollada para la prevención y tratamiento de úlceras pépticas debido a sus propiedades anti-secretorias y de protección de la mucosa (Watkinson,Hopkins y Akbar, 1988;). Se ha convertido en una droga importante en prácticas obstétricas y ginecológicas debido a sus acciones de inicio cervical y uterotónica, maduración cervical e inducción de la labor del parto, pero es ampliamente utilizado como abortivo (Mousa y Walkinshaw,2001). En comparación a otras prostaglandinas análogas, el misoprostol éster tiene las siguientes ventajas:

1. El misoprostol se usa fuera del contexto médico con fines abortivos.
2. Es económico,
3. Siendo un análogo E₁, no tiene efecto en los bronquios o vasos sanguíneos
4. Puede ser usado por vía oral, vaginal, sublingual o rectal (Andrew,Fiala y Safar,2005)
5. Sus aplicaciones clínicas incluyen aborto medicamentoso, evacuación médica en aborto involuntario, inducción cervical antes del procedimiento de aborto quirúrgico, inducción del parto, manejo de la hemorragia postparto (Watkinson et al., 1988) y maduración cervical (Tang,Gemzell y Hi, 2007)
6. Es estable, puede ser almacenado por largos períodos a temperatura ambiente
7. Tiene pocos efectos colaterales (por ejemplo diarrea y escalofríos, los que dependen de la dosis y de la persona)



(11R,16S) Misoprostol éster (ME)



(11R,16S) Misoprostol ácido (MA)

Figura.1 Misoprostol éster(ME) y Misoprostol ácido(MA) (Watkinson et al.,1988)

Aplicación clínica y estructura química del misoprostol

Robert, Nezamis y Phillips (1967) demostraron que las series de prostaglandinas naturales inhiben la secreción del ácido gástrico. Sin embargo, las prostaglandinas naturales tienen tres desventajas que dificultan su aplicación clínica. Estas desventajas son:

1. El metabolismo rápido que resulta en actividad nula o disminuida cuando es usado por vía oral y corta duración de acción cuando es administrada por la vía parenteral.
2. Tiene numerosos efectos colaterales.
3. Presenta inestabilidad clínica, por lo tanto tiene una vida útil corta.

El misoprostol éster difiere estructuralmente de las prostaglandinas E₁ por la presencia de un grupo metil éster en carbono uno, un grupo metilo en el carbono dieciseis y un grupo hidroxilo en carbono dieciseis en vez de carbono quince. El éster metílico en el carbono uno incrementa la potencia antisecretora y la duración

de la acción del misoprostol, mientras que el cambio del grupo hidroxilo desde carbono quince al carbono dieciseis y la adición de un grupo metilo al carbono dieciseis mejora la actividad oral, aumenta la duración de la acción y mejora la seguridad de la droga (Tang et al., 2007)

Propiedades fisicoquímicas (Sigma-Aldrich, 2006)

Nombre del producto: misoprostol ácido

Número de producto: M6932

Marca Sigma

Nº CAS : 112137 – 89 – 0

1	Apariencia	Forma líquida viscosa
2	Color	Amarillo
3	Olor	<i>Sui generis</i>
4	Solubilidad	Soluble en agua
5	pH en agua solución al 0,1%	3,5

Aplicaciones no oficiales.

Aunque en todo el mundo se usa en aplicaciones obstétricas y ginecológicas estos usos no son oficiales, debido a que esta patente nunca fue aprobada para aplicaciones obstétricas ni ginecológicas. Sin embargo, aún la *British National Formulary* (BNF), recomienda su uso no oficial para algunas aplicaciones (Fiala, Arinsson, Granath, Stephansson, Seyberth, Watzer y Genzell, 2005). Existen principios activos que rápidamente son integrados a las prácticas obstétricas y ginecológicas. El misoprostol es una excepción; a pesar de las extensas investigaciones que existen, sólo es incorporado lentamente a la práctica. Esto se debe a que no tiene licencia para su uso en salud reproductiva; sin embargo, la *Food*

and Drug Administration (FDA) recientemente ha otorgado licencia al mifepristone para ser usado con misoprostol para término del embarazo (FDA, 2000), aunque el misoprostol sólo aún no tiene licencia para uso en embarazo. Esta decisión ha iniciado el debate acerca de las drogas que no tienen licencia y deja a muchos médicos especialistas inseguros acerca de su posición legal y profesional al prescribir medicamentos no oficiales o sin licencia.

Sin embargo, el mayor obstáculo para permitir su libre uso en obstetricia y ginecología ha sido su fabricante y poseedor de la patente, *Searle* (ahora incorporado a *Pfizer*). La empresa americana no ha solicitado licencia para alguna aplicación reproductiva, a pesar de la abundante literatura acerca de su uso seguro y efectivo. El probable motivo de tal decisión es para evitar discusiones polémicas acerca del uso del medicamento como inductor abortivo, resultando en una prohibición del acceso a un tratamiento potencialmente salvador de millones de vidas de mujeres en todo el mundo (Andrew et al., 2005).

Modo y mecanismo de Acción

Los derivados de prostaglandinas son producidos normalmente a partir de ácidos grasos en el organismo y se encuentran en muchos tejidos. En general, los derivados de prostaglandina E₁, como el caso de misoprostol, causan contracción miometrial interactuando con receptores específicos localizados en las células miometriales. Esta interacción inicia una cascada de eventos, incluyendo cambios en la concentración de calcio, desencadenando la contracción muscular (Baird 2000).

El complejo proceso bioquímico de maduración cervical y de mediadores asociados con este mecanismo son hasta ahora desconocidos. No se ha establecido concretamente cómo las prostaglandinas producen la maduración cervical. La maduración del *cervix* uterino está relacionado a cambios en la actividad del

colágeno, glucosaminoglicanos y la actividad colagenolítica. Las muestras de biopsia del tejido conectivo a partir de la parte baja del *cervix* uterino en mujeres embarazadas en varias etapas gestacionales han demostrado que las concentraciones de colágeno, glicosaminoglicano sulfatado y ácido hialurónico disminuyen durante el embarazo.

Cuando se compara las concentraciones de colágeno entre mujeres no gestantes, éstas son aproximadamente iguales al 70% a 10 semanas de gestación, y a 30% al término. La actividad colagenolítica se incrementa con la edad gestacional avanzada. La actividad hidrolítica de la 2,4-dinitrofenil-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gin-D-Arg (colagenasa) y la concentración de la elastasa leucocitaria aumenta gradualmente por un factor de 10. Un estudio encontró que el tiempo de dilatación cervical durante la gestación espontánea fue mayor en mujeres con altas concentraciones de colágeno y menores en mujeres con bajas concentraciones de colágeno (Uldbjerg, Ekman, Mamstrom, Olsson y Ulmsten, 1983)

El Refaey, Calder, Wheatley y Templeton, (1994) demostraron una alteración similar al de Uldbjerg et al (1983) en el tejido conectivo cervical luego de administración vaginal de misoprostol o gemeprost (una prostaglandina alopstadil análoga). Estudios en microscopia electrónica e histoquímica del tejido cervical revelaron que la incorporación promedio de prolina por microgramo de proteína (en el metabolismo de colágeno) aumenta significativamente, donde la densidad del colágeno estimada usando la intensidad de luz, disminuye significativamente. Además, el diámetro de las fibras de colágeno fue menor luego de aplicación de prostaglandina E₁. La dilatación del *cervix* durante el alumbramiento en cerdos de guinea implica además degradación mediada por colagenasa del colágeno cervical (Rajabi, Solomon y Poole, 1991)

Las prostaglandinas son capaces de inducir la producción de ácido hialurónico por fibroblastos cervical, causando aumento de hidratación y alteración de la composición de glicosaminoglicanos y proteoglicanos (Murota, Abe y Otsuka, 1977). Las prostaglandinas actúan como agentes quimiotácticos, promoviendo la infiltración de leucocitos y macrófagos dentro del estroma cervical. Estas células inflamatorias pueden ser la fuente de enzimas degradativas específicas que causan los cambios en la matriz extracelular que están asociadas con la maduración de la *cérvix* (Arias, 2000)

Las prostaglandinas actúan sinérgicamente con el óxido nítrico (NO) y tienen un rol importante en la maduración cervical al causar cambios en la matriz extracelular que está asociada con la maduración de la *cérvix* (Chwalisz y Garfield, 1998). El óxido nítrico regula la actividad de metaloproteinasas responsables de la degradación del colágeno e induce la producción de prostaglandinas al estimular la actividad de la ciclooxigenasa (Salvemini, Misko, Masferrer, Seibert, Currie y Needleman, 1993)

La prostaglandina E₁ puede inducir la liberación de óxido nítrico cervical. El nivel de metabolitos del óxido nítrico se incrementa significativamente por 1 a 3 horas luego de la administración de 400 y 25 µg de misoprostol vaginal en etapa temprana y final del embarazo. Sin embargo, el mismo estudio demostró que 400 µg de misoprostol vaginal no tuvo efecto sobre los metabolitos de óxido nítrico del fluido cervical en mujeres no embarazadas. No hay información si una dosis más elevada o un tiempo mayor podrían haber resultado en la liberación de óxido nítrico cervical en mujeres no embarazadas. Sin embargo, se ha demostrado la maduración cervical luego de 10 horas(h) de administración de misoprostol en varios estudios (Choksuchat, Cheewadhanaraks, Getpook, Wootipoom y Dhanavoravibul, 2006)

Las prostaglandinas tienen una potente actividad uterotónica debido a su efecto de

incrementar el calcio intracelular y la activación de la proteína quinasa específica serina/treonina que fosforila la cadena ligera reguladora de la miosina II, conllevando a que la actina y la miosina sufran cambios conformacionales que las capacitan a deslizarse entre ellas, causando acortamiento de las células musculares e induciendo las contracciones uterinas (Choksuchat, 2010)

Vías de ingreso y propiedades farmacocinéticas de varias rutas de administración del misoprostol éster.

Absorción

Las tabletas de misoprostol éster fueron desarrolladas para ser usadas oralmente. Sin embargo, se han utilizado otras rutas de administración, que incluyen vaginal, sublingual, bucal y rectal, en aplicaciones obstétricas y ginecológicas. Desde hace varios años existen numerosos estudios acerca del perfil farmacocinético de varias rutas de administración del misoprostol éster (Tang et al., 2007).

Se han estudiado tres propiedades farmacocinéticas, como la concentración pico, el tiempo de aparición de la concentración pico y el área bajo la concentración sérica versus la curva de tiempo (Meckstroth, Whitaker, Bertisch, Goldberg, y Darney, 2006). El tiempo de la concentración pico (T_{max}) representa cuán rápido la droga puede ser absorbida; la concentración pico máxima (C_{max}) refleja que tan bien la droga está siendo absorbida mientras que el área bajo la concentración sérica versus la curva de tiempo (AUC, equivalente a biodisponibilidad) denota la exposición total a la droga (Tang et al., 2007)

Vía oral

Los primeros estudios se centraron en las propiedades farmacocinéticas. Luego de la administración oral, el misoprostol éster es rápido y casi completamente absorbido a partir del tracto gastrointestinal. Sin embargo, la molécula sufre rápido

metabolismo y des-esterificación para formar misoprostol ácido (Hofmeyr y Gulmezoglu, 2008) debido al potencial de hidrogeniones (pH) del estómago y a la presencia de esterases a nivel bucal (nota del autor). Luego de una dosis de 400 microgramos de misoprostol éster por vía oral, los niveles de misoprostol éster en plasma aumentan rápidamente y alcanzan picos alrededor de 30 minutos, disminuyendo rápidamente a los 120 minutos, manteniendo niveles bajos en adelante

(Meckstroth, et al., 2006). La concentración plasmática de misoprostol éster alcanza picos a los 20 minutos de ingesta (Bentov, Sheiner y Katz, 2004). Misoprostol inalterado (éster) no puede ser detectado en el plasma aún a los cinco minutos luego de dosis oral (Zou et al., 2007)

Vía vaginal

En los estudios clínicos realizados se encontró que la administración vaginal fue más efectiva que la administración oral en el aborto con medicamentos (Ho, Ngai, Liu, Wong y Lee, 1997). Zieman, Fong et al. (1997) realizaron los primeros estudios farmacocinéticos de comparación entre la administración oral y vaginal. En contraste con la vía oral, la concentración plasmática aumenta gradualmente después de la administración vaginal, alcanzando su nivel máximo después de 70 a 80 minutos antes de comenzar a disminuir poco a poco con niveles detectables de droga hasta después de 6 horas (Tang et al., 2007). Aunque la concentración máxima después de la administración oral es superior a la de la administración vaginal, el "área bajo la curva" es mayor cuando se administra por vía vaginal. La mayor biodisponibilidad del misoprostol éster por vía vaginal puede ayudar a explicar por qué es más eficaz en el aborto con medicamentos (Tang et al., 2007). Esto se explica mejor con el ejemplo del medicamento de liberación sostenida (los comprimidos o tabletas de

liberación controlada), además puede deberse a la fórmula farmacéutica que posee cada marca comercial, esto es, a los diferentes excipientes usados en la fabricación de las especialidades farmacéuticas del misoprostol, siendo preciso indicar que no se ha podido encontrar ningún estudio de bioequivalencia a nivel internacional. Se ha demostrado que el coeficiente de variación del área bajo la curva (AUC) luego de la administración vaginal es mayor que el obtenido después de la administración oral del misoprostol éster (Zieman et al, 1997). Esto significa que la absorción vaginal del misoprostol éster es inconsistente. En la práctica clínica, algunas veces se ven restos de las tabletas varias horas después de administración vaginal, lo que indica que la absorción es variable e incompleta. Esto puede deberse a la variación de volumen y pH de descarga vaginal entre mujeres. La variación en la cantidad de sangrado durante el aborto con medicamentos también puede afectar la absorción de misoprostol éster a través de la mucosa vaginal. Se han realizado varios intentos para mejorar la absorción de misoprostol éster por vía vaginal. La adición de agua a las tabletas de misoprostol es una práctica común. Sin embargo, esto no ha demostrado mejorar la biodisponibilidad vaginal del misoprostol (Tang et al., 2002). Los estudios acerca de la farmacocinética del misoprostol ácido han demostrado lo siguiente:

1. Un modelo farmacocinético dependiente de la vía de administración
2. Que el misoprostol éster administrado vía vaginal parece tener una biodisponibilidad tres veces mayor que el equivalente con la dosis oral (Khan, el Refaey, Sharma, Sooranna y Stafford, 2004)

Esto se explica por el primer gran metabolismo del misoprostol éster oral a través del tracto gastrointestinal y el hígado. El misoprostol éster es transformado a misoprostol ácido por el pH del estómago y las esterasas que encuentra a lo largo del tracto

gastrointestinal y en mayor proporción en el hígado de acuerdo a los datos de laboratorio obtenidos durante la realización de éste estudio. En consecuencia, la efectividad del misoprostol éster por vía oral depende de la dosis. Como se esperaba, el misoprostol éster por vía oral fue menos efectivo que por vía vaginal (Bartusevicius, Barcaite y Nadisauskiene, 2005)

Vía Sublingual

Recientemente, se ha estudiado la administración sublingual del misoprostol éster en relación al aborto con medicamentos y maduración cervical. La tableta de misoprostol éster es muy soluble y puede disolverse en 20 minutos cuando es colocada debajo de la lengua. Un estudio farmacocinético comparó la cinética de absorción de las vías de administración oral, vaginal y sublingual del misoprostol éster (Tang et al., 2002). Se encontró que el misoprostol éster vía sublingual presenta menor tiempo para alcanzar la concentración máxima y la mayor biodisponibilidad en comparación con las demás rutas (Tang et al., 2007)

La concentración máxima se alcanza alrededor de 30 minutos después de la administración sublingual y oral, mientras que después de la administración vaginal, el tiempo es 75 minutos (Tang et al., 2002). Por lo tanto, parece que las vías de administración oral y sublingual tienen inicio de acción más rápido. Después de administrar una dosis sublingual de 400 microgramos de misoprostol éster, se alcanza una concentración pico superior a la administración oral y vaginal. Esto se debe a la absorción rápida a través de la mucosa sublingual, así como el evitar sufrir metabolismo de primer paso a través del hígado.

La abundante irrigación sanguínea debajo de la lengua y el pH relativamente neutro de la cavidad bucal pueden ser factores contribuyentes. El rápido inicio y la elevada concentración pico promedio significa que de todas las rutas posibles, la

biodisponibilidad sistémica, medida por la AUC en las primeras 6 horas, es mayor para la administración sublingual. En contraste con el estudio previo realizado por Zieman et al, el AUC 360 minutos después de administración oral y vaginal son similares, pero sólo el 54% y 58%, respectivamente comparados con la administración sublingual (Tang et al., 2002). La diferencia de estos hallazgos acerca de la biodisponibilidad en estos dos estudios puede deberse a la amplia variación en la absorción del misoprostol éster a través de la mucosa vaginal entre las mujeres. Por otra parte, aunque la absorción vaginal ha demostrado ser más lenta y la concentración máxima, inferior a la de las demás rutas, la concentración sérica de misoprostol éster se mantiene a ese nivel bajo durante un período de tiempo más largo. De hecho, al final de la sexta hora, los niveles séricos del misoprostol ácido, luego de la administración por vía vaginal, son más altos que aquellos encontrados por vía sublingual y oral. Por lo tanto, el efecto del misoprostol éster puede persistir por más de 6 horas después de una dosis única, a pesar que el nivel umbral sérico de acción clínica sea desconocido. Recientemente, luego que se describió un transporte directo utero-vaginal para la absorción de progesterona se propuso que un mecanismo similar puede existir para la absorción del misoprostol y éste mecanismo podría explicar el mejor desempeño clínico de la administración vaginal (Cicinelli, de Ziegler, Bulletti, Matteo, Schonauer y Galantino, 2000).

La administración sublingual en dosis de 800µg fue asociada con mayores síntomas y menor aceptación comparado con la administración bucal. Mayores investigaciones son necesarias para confirmar estos hallazgos y determinar si las diferentes farmacocinéticas reflejan diferencias clínicas y la necesidad de administrar misoprostol éster sublingual a menores dosis (Schaff, DiCenzo y Fielding, 2005)

Vía Bucal

La vía bucal es otra vía de administración del misoprostol éster. El medicamento se coloca entre los dientes y la mejilla y se deja que sea absorbido por la mucosa bucal. Los estudios clínicos, aunque limitados en comparación con otras rutas, han demostrado que la vía bucal es también eficaz para el aborto con medicamentos, la maduración cervical y la inducción del parto (Castleman, Oanh, Hyman, Thuy y Blumenthal, 2006). La forma de la curva de absorción de la ruta bucal es muy similar a la absorción vaginal, pero los niveles séricos del medicamento alcanzados son más bajos durante todo el período de estudio de 6 horas (Meckstroth et al., 2006). Después de la administración bucal el tiempo máximo (Tmax) es de 75 minutos, lo que es similar a la obtenida luego de la administración vaginal, pero el AUC de la administración bucal es apenas la mitad que de la administración vaginal. Otro estudio que comparó la administración bucal a la sublingual también ha demostrado que el AUC de la administración sublingual de misoprostol es 4 veces mayor que el de la administración bucal siendo las dos dosis administradas, dosis bucal y sublingual, iguales. La ruta bucal es una vía de administración prometedora y deben realizarse mayores estudios para compararla con las otras vías de administración. En el estudio de Schaff et al. (2005) la dosis fue de 800µg y se encontró que las concentraciones vía sublingual fueron aproximadamente 4 veces mayor que para la vía bucal.

Vía rectal

La ruta rectal de administración se ha estudiado recientemente para el tratamiento de la hemorragia posparto. Esta vía de administración es poco utilizada para otras aplicaciones.

La forma de la curva de absorción después de la administración rectal es similar al de la administración vaginal, pero su AUC es sólo un tercio que el de la administración vaginal. El Tmax promedio después de la administración rectal es de 40 a 65 minutos (Meckstroth et al., 2006), aunque un estudio reciente reportó una cantidad menor de Tmax : 20 minutos (Tang et al., 2007).

Varios reportes han descrito el uso de tabletas de misoprostol éster para detener la hemorragia posparto vía rectal. La mayor vida media del misoprostol éster administrado rectalmente puede prolongar la contracción uterina previniendo de esta manera hemorragias retardadas, y quizás sea más importante que los niveles de concentración pico. En un estudio el misoprostol fue detectado a los 7,5 minutos en algunos pacientes cuando las vías de administración fueron las vías rectal y oral (Khan y el Refaey, 2003)

Biotransformación

Los primeros estudios se centraron en las propiedades farmacocinéticas. Luego de la administración oral, el misoprostol éster es rápida y casi completamente absorbido a partir del tracto gastrointestinal. Sin embargo, el medicamento sufre rápido metabolismo y una primera gran des-esterificación para formar misoprostol ácido. Luego de una dosis de 400 microgramos de misoprostol éster por vía oral, los niveles de misoprostol éster en plasma aumentan rápidamente y alcanzan picos alrededor de 30 minutos, disminuyendo rápidamente a los 120 minutos, manteniendo niveles bajos en adelante (Tang et al., 2007). La concentración plasmática de misoprostol éster alcanza máximos a los 20 minutos de ingesta (Bentov et al., 2004). En un estudio misoprostol inalterado (éster) no puede ser detectado en el plasma aún a los cinco minutos luego de dosis oral (Zou et al., 2007)

Se ha podido comprobar que el misoprostol éster ya se transforma gracias a las esterasas presentes en la boca a misoprostol ácido. Esta transformación es mayor a nivel gástrico debido al pH y finalizará a nivel hepático por la mayor cantidad de esterasas presentes, datos obtenidos durante la realización de éste trabajo de investigación.

Eliminación

Según referencias bibliográficas, a los cinco minutos de haber ingerido misoprostol éster es metabolizado a misoprostol ácido por estearasas presentes en el organismo (Zou et al., 2007). La eliminación del misoprostol ácido se realiza a través de la orina. Para fines de éste estudio se buscó infructuosamente trabajos de investigación en muestras de orina.

Acumulación

De la misma manera que estudios de misoprostol en orina, no se hallaron estudios de acumulación del misoprostol ácido en el organismo.

Farmacocinética en la leche materna humana

En la administración de misoprostol a mujeres, en período de lactancia para tratamiento y prevención de hemorragia posparto, es importante tener en cuenta sus posibles efectos sobre el feto. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la farmacocinética del misoprostol éster por vía oral en la leche materna. Se detectó misoprostol en la leche materna a los 30 minutos de su administración oral. La concentración máxima se alcanzó en una hora, lo que es ligeramente más lento que el nivel plasmático (30 minutos). El nivel en la leche materna disminuye rápidamente después y es indetectable entre 4 a 5 horas después de la ingestión. El nivel de misoprostol ácido en la leche materna es sólo un tercio del nivel alcanzado en el plasma (Vogel, Burkhardt, Rentsch, Schweetz, Watzler y Zimmermann, 2004). No hay

datos sobre la farmacocinética del misoprostol en la leche materna para rutas no orales. Sin embargo, sería de esperar que la concentración de la leche materna fuese menor después de la administración vaginal en comparación con la administración oral, pero puede durar más tiempo. El efecto de corto tiempo de exposición a bajos niveles de misoprostol en el feto es desconocido (Tang et al., 2007).

Efectos sobre el útero y cuello uterino

El efecto uterotónico y de ablandamiento del cuello uterino en el tracto genital de la mujer fueron considerados como efectos secundarios en lugar de efectos terapéuticos, cuando se introdujo el uso del misoprostol por primera vez. Sin embargo, es debido a estos efectos que el misoprostol es tan ampliamente utilizado en la práctica obstétrica y ginecológica hoy en día (Tang et al., 2007).

Sobre el útero

El efecto del misoprostol sobre la contractilidad uterina fue estudiado por Gemzell-Danielsson, Marions, Rodriguez, Spur, Wong y Bygdeman (1999) y Aronsson Bygdeman y Gemzell-Danielsson (2004). Después de una dosis única de misoprostol por vía oral hay un aumento del tono uterino (Aronsson et al., 2004) para producir las contracciones regulares, sin embargo, se requiere mantener la concentración plasmática del misoprostol y esto requiere repetir las dosis orales.

El efecto de la administración vaginal de una sola dosis de misoprostol sobre la contractilidad uterina es inicialmente similar al de la administración oral: un aumento del tono uterino. Sin embargo, después de 1 a 2 horas, aparecen contracciones uterinas regulares y duran por lo menos hasta 4 horas después de la administración de misoprostol (Demzell-Danielsson et al., 1999). El desarrollo de las contracciones

regulares tras la administración vaginal puede explicar la mejor eficacia clínica de la administración vaginal en comparación con la administración oral (Ho et al., 1997).

El tiempo promedio del tono máximo es significativamente más corto para misoprostol por vía oral y sublingual en comparación con el nivel alcanzado por el tono luego de la administración vaginal. Una o dos horas después de la administración de misoprostol, el tono comienza a disminuir en todas las vías. En el caso del misoprostol por vía oral, este es el final de la actividad. Para el tratamiento vaginal, sin embargo, el tono poco a poco es sustituido por contracciones uterinas regulares. Estas contracciones uterinas regulares se mantienen durante un período más largo después de la administración vaginal comparado con la encontrada después del tratamiento sublingual, disminuyendo su actividad sólo después de 4 horas (frente al de la administración sublingual de 3 horas).

Los estudios acerca de la contractilidad uterina han demostrado que se requiere alcanzar niveles sostenidos, en vez de niveles séricos elevados para el desarrollo de contracciones uterinas regulares. Los estudios no han logrado definir el nivel umbral sérico para la contractilidad uterina. Parece que un nivel sérico muy bajo de misoprostol es necesario para el desarrollo de contracciones uterinas regulares. Esto se complica aún más por el hecho que la sensibilidad del útero a las prostaglandinas aumenta con la gestación. Los efectos clínicos o acciones necesarias para diferentes indicaciones de uso también varían. La fuerza de contracción que se requiere para alcanzar los efectos clínicos generalmente aumenta con la gestación. Por ejemplo, contracciones más fuertes se requieren para la inducción del parto que para el aborto. Para el aborto con medicamentos, la adición de la mifepristona podría modificar la acción del misoprostol y disminuir el nivel umbral de la contractilidad uterina. Además de la contracción uterina, el efecto

de ablandamiento del misoprostol sobre el cuello uterino contribuye también a su acción clínica (Tang et al., 2007).

Sobre el *cervix*

Se han realizado muchos estudios clínicos que han demostrado el efecto de inicio cervical del misoprostol durante la gestación. El misoprostol ha sido utilizado ampliamente por su efecto de ablandamiento del cuello uterino antes de la inducción del trabajo y la evacuación quirúrgica del útero. Los estudios han demostrado que menos fuerza fue necesaria para la dilatación mecánica del cuello del útero si el misoprostol se aplicó antes del procedimiento (Ngai, Tang, Lao, Ho y Ma, 1995). Aunque este efecto de ablandamiento del cuello del útero puede ser un efecto secundario a las contracciones uterinas inducidas por el misoprostol, es más probable que se deba al efecto directo del misoprostol en el cuello uterino. El cuello uterino es esencialmente un órgano de tejido conjuntivo. Células musculares lisas representan menos del 8% de la parte distal del cuello uterino. No se conoce el mecanismo exacto que conduce a la maduración cervical fisiológica. Los eventos bioquímicos que están implicados en la maduración cervical son los siguientes:

1. Un aumento de la solubilidad del colágeno,
2. Un aumento de la actividad colagenolítica y
3. Una disminución en el contenido de colágeno total.

Los cambios en componentes de la matriz extracelular durante la maduración del cuello uterino fueron descritos como similares a una respuesta inflamatoria (Liggins, 1981). De hecho, durante la maduración del cuello uterino hay un flujo de células inflamatorias dentro del estroma cervical, lo que aumenta las metaloproteinasas de la matriz y por lo tanto conduce a la degradación del colágeno y ablandamiento del cuello uterino (Aronsson, Ulfgren, Stabi, Stavreus-Evers y Gemzell-Danielsson,

2005). Se ha propuesto que estas células producen citoquinas y prostaglandinas que tienen un efecto sobre el metabolismo de la matriz extracelular. También se ha demostrado que los análogos de prostaglandina podrían disminuir el contenido de hidroxiprolina del cuello uterino de la gestante (Rath, Theobald, Kuhnle, Kuhn, Hilgers y Weber, 1982).

Los cambios histoquímicos en el cuello uterino después de la administración de misoprostol a mujeres embarazadas fueron estudiados con microscopia electrónica y determinación de la captación de prolina. La incorporación promedio de prolina por microgramo (μg) de proteína y la densidad del colágeno, que se estima por la intensidad de luz, fue significativamente menor que el del control. Esto indicó que la acción del misoprostol parece ser principalmente en el estroma del tejido conectivo con evidencias de desintegración y disolución del colágeno (El Refaey et al., 1994)

La mayoría de los estudios sobre la contractilidad uterina y ablandamiento cervical después de administración de misoprostol se han realizado en mujeres embarazadas. Hay, sin embargo, evidencia que sugiere que estos cambios también se producen en el útero de mujeres que no están embarazadas. Algunas mujeres no embarazadas experimentan calambres uterinos después de la ingesta de misoprostol y éste (misoprostol) ha demostrado tener también un efecto de inicio cervical en el estado no gestacional (Crane y Healey, 2006)

Toxicocinética, Sintomatología, Efectos Secundarios y Teratogenicidad

El misoprostol éster es un medicamento seguro y bien tolerado. Los estudios toxicológicos pre-clínicos indican un margen de seguridad al menos de 500 - 1000 veces entre las dosis letales en animales y dosis terapéuticas en humanos (Kotsonis, Dodd, Regnier y Kohn, 1985).

Ningún efecto adverso significativo no-clínico, hematológico, bioquímico, endocrino, inmunológico, respiratorio, oftálmico, plaquetario o cardiovascular ha sido encontrado con el uso del misoprostol. La diarrea es la reacción adversa más importante y consistente que se ha reportado con la ingesta de misoprostol, pero por lo general es leve y limitada. Pueden ocurrir náuseas y vómitos que desaparecen entre 2 a 6 horas.

Algunas mujeres encuentran un sabor desagradable cuando la administración es sublingual o bucal. Una sensación de entumecimiento en la boca y la garganta también sucede cuando se administra por vía sublingual. La dosis tóxica de misoprostol es desconocida, pero es considerada como una droga muy segura. Sin embargo, Henriques, Lourenco, Ribeirinho, Ferreira y Graca (2007) describen el caso de una mujer que murió de falla multiorgánica tras una sobredosis de misoprostol (60 comprimidos durante 2 días) .

Se ha reportado el caso de una mujer que ingirió 42 tabletas de 200 microgramos de misoprostol, quien presentó sólo dolor abdominal, vomito, diarrea y confusión. Sólo se le aplicó lavado gástrico y carbón activado (Bentov et al., 2004).

Fiebre y escalofríos también se han informado y son comunes después de dosis altas en el tercer trimestre o el período posparto inmediato. La situación típica en la que se observó fue cuando el misoprostol fue usado para la prevención o tratamiento de la hemorragia posparto. En los estudios de misoprostol para la prevención de hemorragia posparto, se informó de escalofríos en el 32% a 57% de mujeres que recibieron misoprostol (Derman, Kodkany, Goudar, Geller, Naik, Bellad, 2006). Hiperpirexia (mayor a 40 ° C) ha sido reportada en varios casos luego de la administración de 600 µg, e hiperpirexia con delirio y/o ingreso a la unidad de cuidados intensivos han sido informados luego de ingesta de 800 µg (Chong, Chua,

El-Refaey, Choo, Chanrachakul y Tai, 2001). Otra de las implicancias acerca del uso de misoprostol es el riesgo de ruptura uterina, especialmente en mujeres con una cicatriz uterina anterior. Informes de ruptura uterina son raros en el primer trimestre del aborto con medicamentos (Kim, Han, Choi, Ahn, Yang y Kang, 2005), pero el riesgo parece aumentar con la gestación. Existe evidencia, a partir de la literatura, que la mayoría de rupturas uterinas que se producen tienen lugar durante la inducción de labor en el tercer trimestre, cuando está asociada con cicatriz uterina previa y otros factores de riesgo para la ruptura uterina (Plaut, Schwartz y Lubarsky, 1999). La infección no es común después de un aborto con medicamentos inducido por misoprostol. Se ha reportado que la incidencia es sólo 0,92% (Shannon, Brothers, Philip y Winikoff, 2004). Sin embargo, recientes informes sobre infección fatal con *Clostridium sordellii*, después de usar misoprostol por vía vaginal para el aborto, han suscitado la preocupación sobre el uso de este método. Sin embargo, después de una amplia investigación aún no hay consenso sobre el mecanismo de infección en estos casos (Fischer, Bhatnagar, Guarner, Reagan, Hacker y Van Meter, 2005). Se cree que a medida que la incidencia global de infección sigue siendo baja, el aborto con medicamentos no debe considerarse como un método que se asocia con una tasa de infección más alta en comparación con el método quirúrgico (Tang et al., 2007).

La exposición al misoprostol en el embarazo temprano se ha asociado con múltiples defectos congénitos. La FDA lo clasifica como medicamento Categoría X en función de su Riesgo Teratogénico (FDA, 2016)

a) Los efectos sobre la gestante son los siguientes:

Los efectos adversos son, en general, una prolongación de la acción farmacológica.

Las reacciones adversas más frecuentes son:

- Trastornos gastrointestinales: náuseas, vómitos y diarrea.

Algunos de las siguientes reacciones adversas han sido descritas de forma ocasional o rara:

- Trastornos cardiovasculares: hipertensión, hipotensión, arritmia, flebitis, edema y dolor en el pecho.
- Trastornos del sistema nervioso: mareo, confusión, somnolencia, síncope, cefalea, temblores, ansiedad, neurosis.
- Trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos: tos, disnea, bronquitis y neumonía.
- Trastornos musculoesqueléticos: artralgia, mialgia, calambres y parálisis musculares, dolor de espalda.
- Embarazo, puerperio y enfermedades perinatales: contractilidad uterina anormal (aumento de la frecuencia, tono o duración) con o sin bradicardia fetal, ruptura uterina, ruptura prematura de membranas, desprendimiento prematuro de placenta, infección amniótica, embolia pulmonar por líquido amniótico y hemorragia vaginal.
- Trastornos del aparato reproductor: dilatación cervical rápida.
- Trastornos generales: hipertermia transitoria y escalofríos.
- Trastornos del sistema inmunológico: reacciones de hipersensibilidad.
- Trastornos de la piel: rash.

b) Efectos sobre el feto:

- Alteración del ritmo cardíaco fetal, acidosis fetal (pH de la arteria umbilical por debajo de 7,15), sepsis fetal intrauterina, sufrimiento fetal, síndrome de aspiración de meconio.

c) Efectos teratogénicos:

- El uso indiscriminado y la falta de información sobre los límites en la edad gestacional cuando es utilizado para la interrupción de embarazos no deseados nos enfrenta a otra cara del problema del aborto clandestino. Se ha detectado la aparición de malformaciones en fetos expuestos prenatalmente al misoprostol (abortos frustrados) entre las que se encuentran:
 - Defectos de reducción de miembros
 - Síndrome de Moebius
 - Artrogrifosis
 - Pie bot
 - Hidrocefalia
 - Hipoglosia e hipodactilia
 - Anomalías en los huesos del cráneo
 - Anillos de constricción tipo brida (Alemany, 2011).

Estas malformaciones pueden deberse a un suministro anormal de sangre al embrión en desarrollo durante las contracciones inducidas por misoprostol. Se estima que el riesgo absoluto de malformaciones después de exposición al misoprostol es relativamente bajo, del orden de 1% en los fetos expuestos. Una amplia gama de defectos es posible en función del tiempo de exposición al misoprostol. Los defectos en el sistema nervioso central y las extremidades son los más frecuentes. El síndrome de Mobius, que se caracteriza por parálisis facial congénita con o sin defectos en las extremidades, se ha asociado a la exposición al misoprostol (Orioli y Castilla, 2000). Otras anomalías como defectos de las extremidades transversales, en forma de anillo de constricción de las extremidades, artrogrifosis, hidrocefalia, holoprosencefalia y exostrofia de la vejiga también han sido reportados. La malformación fetal es asociada más comúnmente con el régimen

exclusivo de misoprostol para el aborto en comparación con el régimen secuencial utilizando la mifepristona y el misoprostol. Puede deberse a la fuerte contracción uterina asociada con altas dosis repetidas de misoprostol. Por lo tanto, el aborto inducido por el misoprostol debe ser realizado bajo supervisión médica (Tang et al., 2007). Es importante contar con el consentimiento informado de la paciente antes del aborto y aconsejarla sobre el riesgo de anomalía fetal si el embarazo continúa aún después de la exposición al misoprostol (Tang et al., 2007).

Existe evidencia que la exposición prenatal al misoprostol está asociada a riesgo de presentar defectos en las terminaciones de las piernas y secuencia Mobius (Dal Pizzol, Pozzobon y Serrate, 2006)

Espectrometría de Masas

Ionización por Electrospray (ES)

Fue desarrollado por Yamashita y Fenn. Alcanza muy alta sensibilidad y es fácil de ser acoplado a sistemas de cromatografía líquida, microcromatografía líquida y electroforesis capilar.

La ES se produce al aplicar un fuerte campo eléctrico bajo presión atmosférica, a un líquido que viaja a través de un tubo capilar con flujo lento (aproximadamente 1 – 10 $\mu\text{L}/\text{min}$). El campo eléctrico es obtenido al aplicar una diferencia de potencial de 3 – 6 kV entre este capilar y el electrodo contrario, separado por 0,3 – 2 cm, que produce campos eléctricos del orden de los 10^6 V/m (fig. 2). Este campo induce una acumulación de carga en la superficie líquida localizada al final del capilar, el cual se romperá para formar gotas con carga elevada. Un gas inyectado coaxialmente a flujo lento permite la dispersión del spray limitada en espacio. Luego estas gotas pasan ya sea a través de una cortina de gas inerte caliente, frecuentemente nitrógeno, o a través de capilar caliente para remover las últimas moléculas del solvente.

El *spray* inicia un “primer voltaje” que, para una determinada fuente, depende de la superficie de tensión del solvente. En una fuente que tiene un primer voltaje de 4kV para el agua (tensión superficial 0.073 N m^{-2}), 2.2kV para metanol (0.023 N m^{-2}), 2.5kV para acetonitrilo (0.030 N m^{-2}) y 3 kV para dimetilsulfóxido (0.043 N m^{-2}). Si se examina con un microscopio la gota naciente que se forma en la punta del capilar mientras se incrementa el voltaje, como se observa en la figura 3., a bajos voltajes la gota parece esférica, luego se alarga bajo la presión de las cargas acumuladas en la punta en el campo eléctrico más elevado; cuando la tensión superficial se rompe la forma de la gota cambia a un “cono Taylor” y aparece el *spray*.

Gomez y Tang (1994) fueron capaces de fotografiar las gotas formadas y divididas en una fuente ES. Un dibujo de una gota descompuesta es mostrado en la figura 4. A partir de sus observaciones, concluyeron que la ruptura de las gotas puede ocurrir antes que se alcance el límite dado por la ecuación de Rayleigh debido a que las gotas son deformadas mecánicamente reduciendo así la repulsión necesaria para romper las gotas.

El solvente que se encuentra dentro de la gota se evapora, lo cual le causa contracción y su carga por unidad de volumen se incrementa. Bajo la influencia del campo eléctrico elevado, ocurre la deformación de la gota. La gota se alarga bajo la fuerza resultante de la acumulación de carga, similar a lo que ocurre en la punta de prueba, y finalmente produce un nuevo cono Taylor. De este cono Taylor, se liberan cerca de 20 gotas más pequeñas. Típicamente una primera generación de gotas a partir del capilar tendrán un diámetro de aproximadamente $1,5 \mu\text{m}$ y transportarán cerca de 50 000 cargas elementales o casi 10^{-14} Coulombs (C). Las gotas formadas tienen un diámetro de 0,1 micrometros y conllevan de 300 a 400 cargas elementales. El volumen total de las gotas formadas es cerca del 2% de la gota precursora pero

contiene 15% de la carga.. La carga por unidad de volumen es así multiplicada por un factor de siete. La gota hija se contraerá más debido a la evaporación del solvente y producirá otra generación de gotas.

Estas pequeñas gotas altamente cargadas seguirán perdiendo solvente, y cuando el campo eléctrico sobre su superficie devenga lo suficientemente amplio, acontece la deserción de iones de la superficie. Cargas en exceso se acumulan en la superficie de la gota. En el volumen, los analitos y electrolitos, de los cuales las cargas positivas y negativas son iguales en número, están presentes en un número mayor que en la gota precursora. La deserción de las moléculas cargadas ocurre desde la superficie. Esto significa que la sensibilidad es mayor para compuestos cuya concentración en la superficie es mayor, los más lipofílicos. Cuando se analiza mezcla de compuestos, aquellos presentes en la superficie de las gotas pueden enmascarar, casi completamente, la presencia de compuestos que son más solubles en el volumen. Cuando la gota contiene gran cantidad de moléculas, como proteínas por ejemplo, las moléculas no se desorben, pero son liberadas por evaporación del solvente. Esto parece suceder cuando el peso molecular de los compuestos excede los 5 000 a 10 000 Daltons (D).

Los iones obtenidos de grandes moléculas conllevan un mayor número de cargas si varias zonas ionizables están presentes. Típicamente, una proteína conlleva una carga por mil daltons aproximadamente, a menos si hay pocos grupos amino (de Hoffmann E y Stroobant V (2007). *Mass Spectrometry, Principles and Applications.* , *The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England:John Wiley & Sons*).

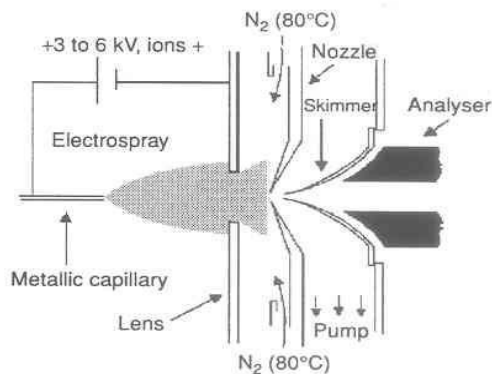


Figura 2. Diagrama de la fuente de *electrospray*, usando espumaderas para focalización del ion y una cortina de gas nitrógeno caliente para la desolvatación (arriba), o con un capilar caliente para desolvatación (abajo).



Figura 3. Efecto del potencial de *electrospray* en la gota en la punta del capilar, lo que se observa con binoculares mientras se incrementa el voltaje.

Izquierda: a bajo voltage , la gota es casi esférica.

Centro: cerca de 1 o dos kilovoltios, pero debajo del potencial inicial, la gota se alarga bajo la presión de las cargas acumuladas en la punta.

Derecha: en el potencial inicial, la presión es mayor que la tensión superficial, la forma de la gota cambia de una vez al cono *Taylor* y pequeñas gotas son liberadas.

Las gotas se dividen y explotan, produciendo el *spray*.

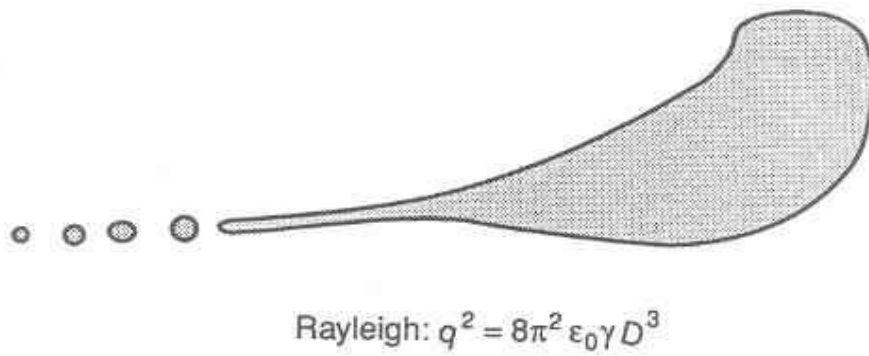


Figura 4. Una gota descomponiéndose en una fuente de *electrospray*, de acuerdo a; q , carga; ϵ_0 permitividad del ambiente; γ , tensión superficial y D , diámetro de una gota supuestamente esférica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Material Biológico

Muestras de orina de mujer gestante que presumiblemente haya ingerido el medicamento denominado misoprostol con fines abortivos.

Materiales de Laboratorio

Probetas de 50mL de vidrio borosilicato

Cartuchos de Extracción en Fase Sólida (SPE)

Tubos Falcon de 15 y 50mL de polipropileno

Espátulas de acero inoxidable de 5 mg de capacidad

Micropipetas automáticas de 1 microlitros (μL) a 20 μL de capacidad

Micropipetas automáticas de 20 μL a 200 μL de capacidad

Micropipetas automáticas de 10 μL a 5000 μL de capacidad

Columna UPLC BEH C18 (1,7 micrometros (μm), 2,1 mm x 50 mm)

Pipetas Pasteur de polietileno de 3mL

Equipos

Cromatógrafo líquido de ultraperformance con espectrómetro de Masa-Masa(Detector Fotomultiplicador) marca *Waters*, modelo *Acquity*

Equipo de extracción en fase sólida (SPE) , *J.T.Baker*

Balanza analítica, *Sartorius*, sensibilidad 0,00010 g, modelo BL 210S

Sonicador *Amsco* modelo *Reliance Sonic 250*

Bombas de vacío *Emerson* modelo SA55JXHTTP - 4698

Equipo *soxhlet* automático *Heidolph Laborota 4003 Control*

Sistemas informáticos: computadora compatible *pentium 4*

Centrifugadora *Sigma* modelo 201

Reactivos y fármacos

Misoprostol ácido y misoprostol éster *Sigma Aldrich*, Alemania.

Metanol grado cromatografía líquida (o grado HPLC) *Merck*

Agua grado HPLC *Merck*

3.2 Métodos

3.2.1. Diseño del Método

Muestras y pre-tratamiento

Se ensayaron métodos utilizando extracción líquido-líquido con solventes orgánicos como hexano, dietiléter y acetato de etilo, clorometano y sus mezclas, los cuales dieron resultados no reproducibles. Luego, se ensayaron técnicas utilizando Cartuchos de Extracción en Fase Sólida (SPE) para el pre-tratamiento de muestras biológicas. Se ensayaron cartuchos LC-18, LC-8 y cartuchos de balance hidrofílico-lipofílico, intercambio catiónico y aniónico (HLB) para cuyo ensayo se utilizaron protocolos Oasis y los recomendados por cada fabricante, cada uno de 3 mililitros (mL) y 30 miligramos (mg) con varias diluciones, condiciones, reactivos de lavado y elusión. Los cartuchos HLB Oasis ofrecieron resultados consistentes en términos de recuperación de misoprostol ácido además de obtenerse un blanco más limpio. Los cartuchos SPE HLB Oasis fueron pre-acondicionados con 1 mL de solución de metanol:agua (1:1) , luego se cargó la muestra. Como solución de lavado se utilizó solución agua-metanol(9:1) luego se eluyó el analito con 1 mL de metanol puro al cual se agregó un mililitro de agua, colocándose la mezcla en vial de 1,5 mL del cual se inyectó sólo 0,1 µL en el LC-MS/MS.

3.2.2.Toma de Muestra (Muestreo)

Se reciben las muestras de orina tomadas en las diferentes sedes del Instituto de Medicina Legal del Perú a nivel nacional. Estas muestras de orina fueron mantenidas en refrigeración. Las muestras aceptadas fueron aquellas de apariencia translúcida sin ningún precipitado, las cuales están listas para análisis (pre-tratamiento).

3.2.3.Desarrollo del Método

El método se desarrolló probando muestras de orina de personas que previamente habían ingerido misoprostol ester 600 µg por vía oral. La extracción en fase sólida se realiza con cartuchos HLB, con los cuales se obtuvieron los mejores resultados.

Cromatografía Líquida

Para obtener un pico simétrico y un tiempo de retención de aproximadamente 2.2 minutos, ver figura 5, se ensayaron varias mezclas de solventes tales como agua y metanol usando diferentes proporciones, con flujos promedios (de 0,3 a 0,6 mL/min). Dando mejores resultados la mezcla de metanol: agua (tabla N°1)

Espectrofotometría de Masas

Para optimizar las condiciones ionización por electrospray (ESI) negativo para el misoprostol ácido, se realizaron escaneos en el cuadrupolo en modo ión negativo. Durante un experimento de infusión directa, la masa espectral para el misoprostol ácido reveló un pico a m/z 367.1 atomic mass unit (amu)

Cuando se experimentó con el misoprostol ácido m/z 367.1 amu en modo MRM, la energía de colisión originó un ion hijo (*daughter ion*) de m/z 249.0 amu.

Selectividad

Se inyectaron extractos obtenidos a partir de muestras de orina blanco (orina control, esto es libre de analito) y orina inoculada con misoprostol ácido. Para ello estas

muestras sufrieron el proceso de SPE descrito anteriormente. Ningún pico de interferencia de compuestos endógenos fueron observados en el tiempo de retención de la muestra con analito comparado con la muestra blanco. El tiempo de retención del misoprostol ácido fue de 2,2 minutos. El tiempo de corrido cromatográfico fue de 5 minutos.

Curva de Calibración

La curva de calibración fue construida usando estándares de calibración de 10, 25,50,75 y 100 partes por billón. La curva de calibración fue preparada determinando la mejor respuesta promedio pico – área vs. la concentración, y adecuado a la ecuación de la recta $y = mx + c$.

Preparación de las muestras

Las muestras de orina recolectadas, correspondientes a casos de posible abortos, fueron procesadas de la siguiente manera:

1. Se obtiene un mililitro de muestra de orina, éste mililitro es sometido a extracción en fase sólida con cartucho HLB marca Oasis de 3 mL, preacondicionado con 1 mL de solución de agua : metanol (1:1), lavado con 1mL de solución agua : metanol (9:1) y el analito eluído con 1mL de metanol, se agrega al final 1mL de agua y se inyectó 0,1 μ L en el sistema LC-MS/MS.

Criterios de inclusión

Muestras de personas de sexo femenino, entre los 15 y 35 años, que hayan consumido el misoprostol con fines abortivos.

Criterios de exclusión

Muestras de personas de sexo femenino que no hayan consumido el misoprostol con fines abortivos.

Muestras de orina que estén turbias al momento del análisis.

Identificación y cuantificación de misoprostol en muestras de orina

Se usa un sistema UPLC *Waters Acquity* equipado con desgasificador isobomba con *autosampler* para inyectar alícuotas de 0,1 µL de muestra procesada, el sistema trabaja con una columna *Acquity UPLC BEH C18* (1.7 µm, 2,1 X 50 mm), mantenida a temperatura ambiente (24±2°C). La fase móvil en gradiente, según la siguiente tabla:

Tabla N°1. Fase móvil en gradiente utilizada en el UPLC MS-MS

Tiempo (minutos)	Flujo (mL/minutos)	%A(agua)	%B(metanol)
	0,40	95	5
3,00	0,40	5	95
3,50	0,40	5	95
3,6	0,40	95	5
5,50	0,40	95	5

con espectrómetro de masas con ionización por *electrospray* (ESI).

La cuantificación se realizó por detección MS-MS en modo ión negativo (ESI negativo) para el misoprostol ácido. El voltaje del cono fue de 25 voltios y gas de colisión fue de 20 voltios.

La detección de los iones fue realizada en el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM), los pares de transición del misoprostol ácido m/z 367.1 amu y como ion hijo (daughter ion) m/z 263.0 amu. Los datos analíticos fueron procesados por el programa estadístico SPSS versión 22

Soluciones estándar

Se prepara la solución stock primaria (1mg/mL) de misoprostol ácido en una mezcla de agua:metanol (1:1), grado cromatografía líquida, y se almacena a -4°C .

Diluciones apropiadas fueron realizadas con mezcla de metanol : agua, a la cual se añadió soluciones stock de trabajo de 10, 25, 50, 75 y 100 partes por billón en el día de análisis y estas soluciones fueron usadas para preparar la curva.

Las soluciones de trabajo fueron almacenadas aproximadamente a -4°C por una semana. Estas muestras fueron realizadas por duplicado y cada una fue leída tres veces.

IV. RESULTADOS

La parte experimental se inició con la determinación de la curva de calibración presentada en la tabla 4.

Tabla 2. Lecturas obtenidas con la curva de calibración construida.

	Lecturas(ppb)	Áreas
1	12,1	168,501
2	20,3	278,425
3	35,3	436,568
4	50,2	604,326
5	25,8	306,102
6	18,5	243,647
7	14,5	173,489
8	21,5	294,556
9	40,6	547,489
10	47,9	501,568
11	70,2	883,459
12	60,5	742,546
13	56,4	701,523
14	26,8	309,780
15	34,7	412,784
16	76,9	891,547
17	45,9	589,841
18	53,4	635,541
19	81,6	913,110
20	11,5	154,852

En la tabla N° 2 se observa que la concentración menor es 11,5 correspondiendo un área de 154,852 , la concentración mayor 81,6 corresponde 913,110 , con una concentración promedio de 40,23

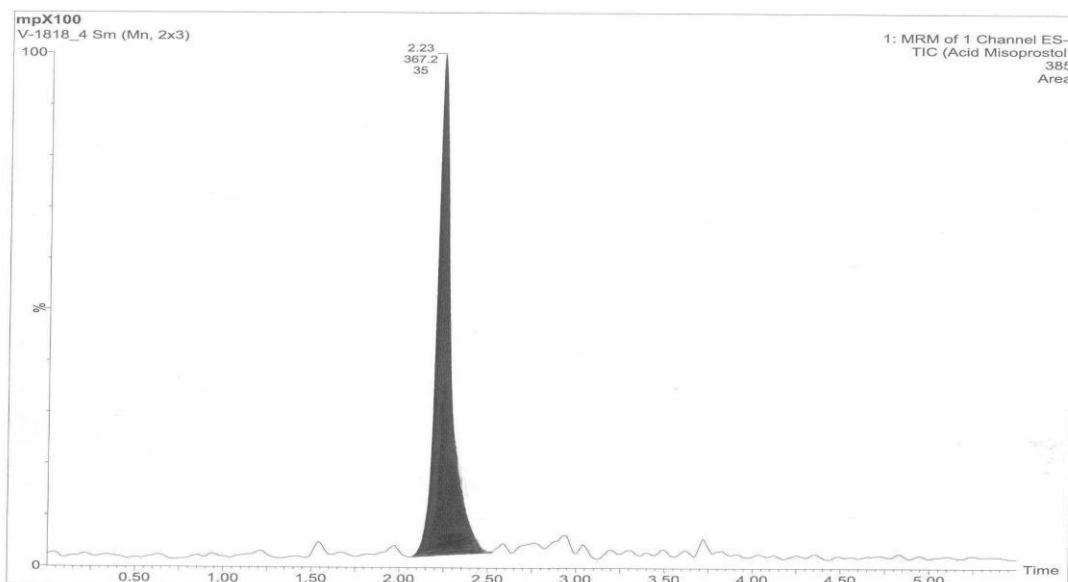


Figura 5. Cromatograma UPLC de Misoprostol ácido.

En la figura 5 se puede apreciar el cromatograma del misoprostol ácido con el pico desarrollado a los 2,2 minutos.

Tabla N°3 Correlación de Pearson entre concentración de Misoprostol ácido y el área bajo la curva

		área bajo la curva
concentración de Misoprostol ácido	Correlación	0.997(**)
	de Pearson	

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

En la tabla N° 3 se observa que existe una correlación alta positiva y significativa (0.99, P = 0.00 < 0.05) entre concentración de Misoprostol ácido y el área bajo la curva

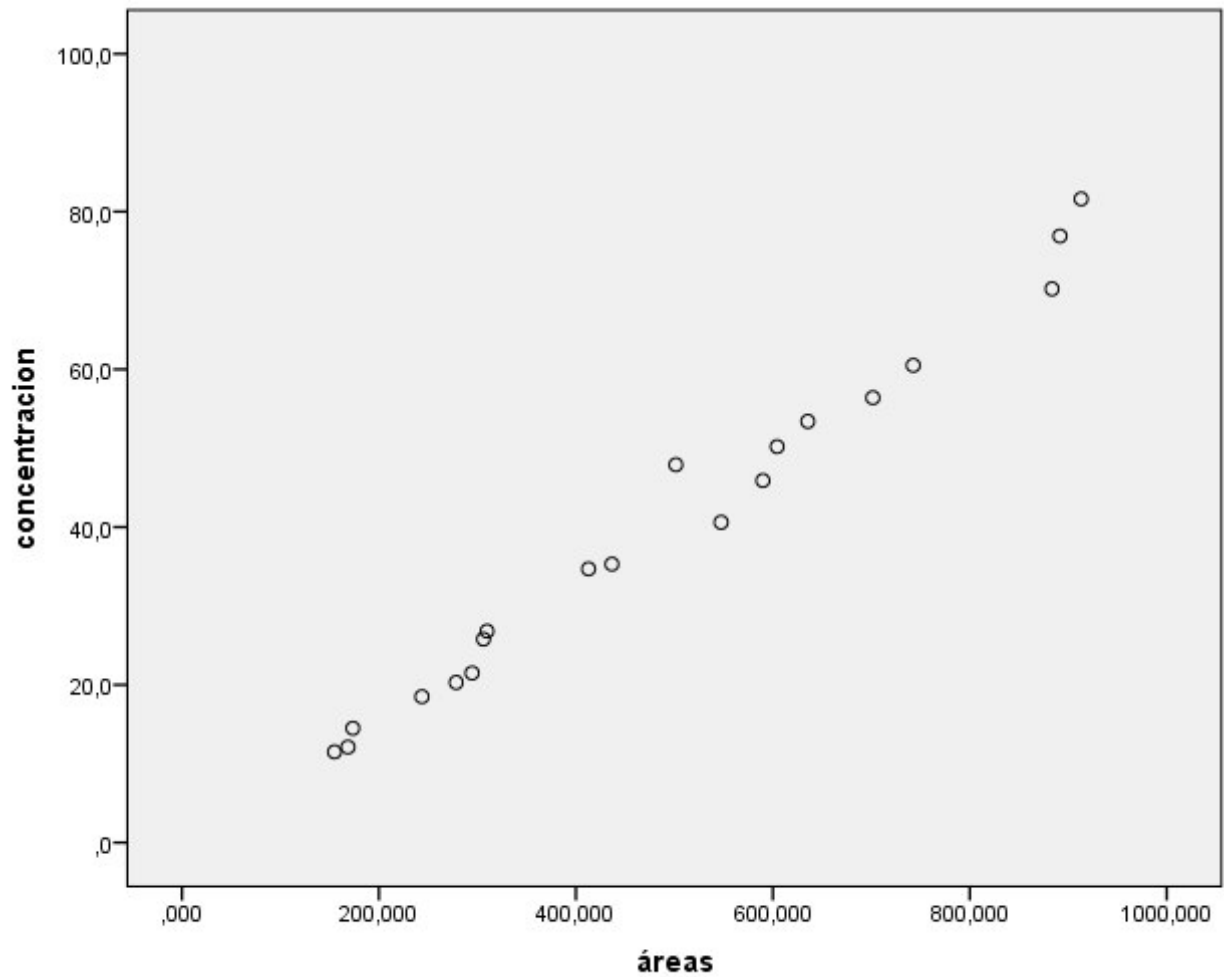


Figura 6. Concentración en ppb de misoprostol ácido (muestras) y área bajo la curva

En la figura 6 se puede observar que la concentración de misoprostol ácido en muestras y el área bajo la curva presentan una relación lineal.

Tabla Nº4 Concentraciones promedio y coeficiente de varianza hallados para la curva de calibración.

	concentrac ión	ppb	área	ppb promedio	s	%CV
1	10	9,7	147,157	9,9167	0,16021	1,6156
2	10	10,1	150,547			
3	10	9,9	148,489			
4	10	10,1	150,547			
5	10	9,9	148,785			
6	10	9,8	147,985			
7	25	25,2	303,102	25,15	0,10488	0,417
8	25	25,1	301,563			
9	25	25,1	301,578			
10	25	25	301,045			
11	25	25,2	303,155			
12	25	25,3	304,568			
13	50	50,1	601,231	50,0833	0,1169	0,2334
14	50	50,2	604,326			
15	50	50,1	601,354			
16	50	50	600,456			
17	50	50,2	604,156			
18	50	49,9	598,654			
19	75	75,1	889,547	75,05	0,18708	0,2493
20	75	75,2	889,102			

21	75	75	889,578			
22	75	74,9	888,954			
23	75	75,3	889,125			
24	75	74,8	888,105			
25	100	100,1	981,125	100,05	0,18708	0,187
26	100	100	981,056			
27	100	100,2	981,156			
28	100	99,8	981,001			
29	100	99,9	981,010			
30	100	100,3	981,689			

En la tabla Nº 4 se observa que los coeficientes de variación para las concentraciones promedio son menores que 7% se considera que los valores son precisos.y existe mayor homogeneidad entre los valores de las concentraciones.

Tabla N°5 Comparación de medias del área bajo la curva y la concentración de Misoprostol ácido

			Medi a	Desviaci ón estándar	ANOVA	Prueba de Tukey				
						10	25	50	75	100
Área bajo la curva	Diez	6	148,9 1833	1,37699 8	0,00*		0,0 0*	0,0 0*	0,0 0*	0,00 *
	Veinticinco	6	302,5 0183	1,33514 9				0,0 0*	0,0 0*	0,00 *
	Cincuenta	6	601,6 9617	2,19513 3					0,0 0*	0,00 *
	Setentecinco	6	889,0 6850	0,53559 5						0,00 *
	Cien	6	981,1 7283	0,26026 6						
Concentr ación de Misoprost ol ácido	Diez	6	9,916 7	0,37699 8	0,00*		0,0 0*	0,0 0*	0,0 0*	0,00 *
	Veinticinco	6	25,15	0,10488				0,0 0*	0,0 0*	0,00 *
	Cincuenta	6	50,08 33	0,11690					0,0 0*	0,00 *
	Setentecinco	6	75,05 00	0,18708						0,00 *
	Cien	6	100,0 500	0,18708						

*P<0.05 significativo

En la tabla N° 5 se observa que al comparar las medias del área bajo la curva y la concentración de misoprostol ácido mediante el ANOVA y la prueba de Tukey no se presenta una diferencia significativa con un $P < 0,05$ y una desviación estándar menor que 3.

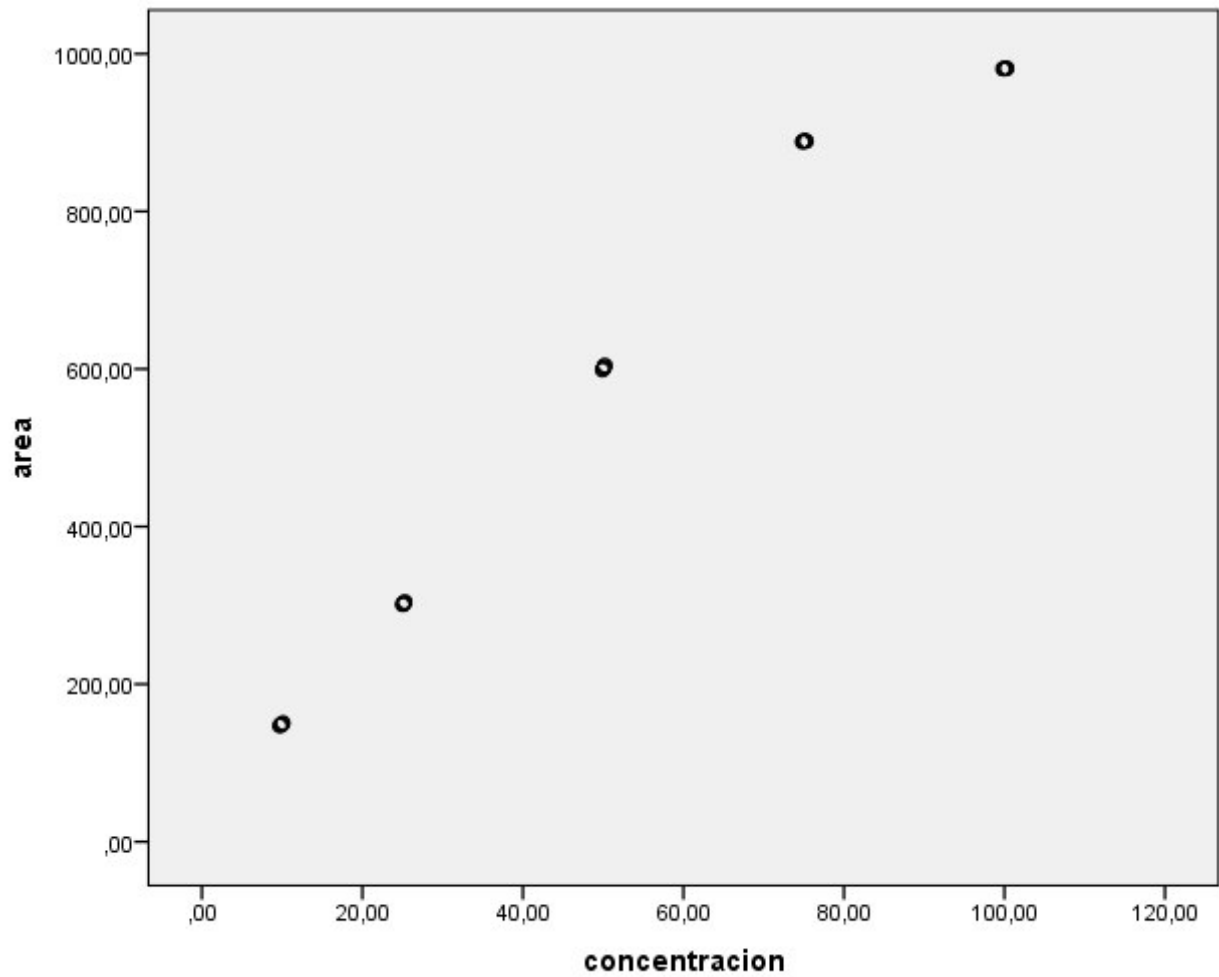


Figura 7. Grafico de líneas de concentración de Misoprostol ácido según el área bajo la curva

En la figura 7 se puede observar que la desviación estándar de los valores promedio de la concentración no difieren y su relación es lineal.

Tabla N°6.Tabla comparativa de sistemas de extracción utilizados en dos estudios.

Item	Metodo extractivo	Fase móvil	Referencia
1	Dietil eter:diclorometano (3:2,v/v)	Método isocrático, Metanol:agua(55:45) , más solución de amoniaco 1%	(Zou et al., 2007)
2	Cartucho Oasis MAX, eluído con solución de acetonitrilo tamponado con ácido fórmico al 0.2%	Método isocrático, solución de acetonitrilo tamponado con ácido fórmico al 0.2% (20:80,v/v)	(Vijava et al.,2011)

En el estudio de la tabla N°6, ítem 1, se realizaron varias pruebas con solventes, al final se obtuvieron los mejores resultados con la solución de dietil eter:diclorometano (3:2,v/v), (Zou et al., 2007). En la misma tabla según ítem 2, se presenta como alternativa a la extracción líquido-líquido tradicional, un método extractivo por SPE utilizando el cartucho Oasis Max (Vijava et al.,2011).En el ítem 1 de la tabla N°6 los extractos fueron secados a 30°C en atmósfera de nitrógeno y reconstituídos con la fase móvil. En nuestro estudio utilizamos cartuchos HLB Oasis, 300mg x3mL, con el cual se extrajo el analito, eluyéndose con metanol al cual se agrega agua dando una mezcla metanol:agua (1:1) lista para ser inyectada en el sistema LC.

V. DISCUSIÓN

A pesar que el uso del Misoprostol éster en aplicaciones definidas y estudiadas por sus fabricantes es seguro, el uso clandestino para producir aborto en caso de embarazos no deseados es una realidad, por lo que su determinación en el ámbito legal es importante.

El equipo, en el cual se ha desarrollado un método cuali-cuantitativo para su determinación, es de última generación, ya que es un cromatógrafo líquido con una performance muy superior al HPLC convencional (Zou et al., 2007), por lo que trabajos similares con este tipo de equipos son escasos a nivel internacional e inexistentes a nivel nacional

Es importante indicar que la dosis con fines de terapia antiácido es de 1 tableta via oral (200µg), cuya ingesta da como resultados niveles mucho menores a los presentados en éste estudio.

En cambio para con fines abortivos se utiliza tres tabletas (600µg) vial oral y dos tabletas vía vaginal (400 µg), haciendo un total de 1000 µg, cuyos resultados son presentados en éste estudio.

1. La curva obtenida tiene concentraciones de 10,25,50,75 y 100 ppb

($\times 10^{-3}$ µg/ml) en medio metanol:agua.

2. En la tabla N° 2 se observa que la concentración menor es 11,5 correspondiendo un área de 154,852 , la concentración mayor 81,6 corresponde 913,110 , con una concentración promedio de 40,23

3. En la figura 5 se puede apreciar el cromatograma del misoprostol ácido con el pico desarrollado a los 2,2 minutos.

4. En la tabla N° 3 se observa que existe una correlación alta positiva y significativa

(0.99, $P = 0.00 < 0.05$) entre concentración de Misoprostol ácido y el área bajo la curva

5. En la tabla N° 4 se observa que los coeficientes de variación para las concentraciones promedio son menores que 7% se considera que los valores son precisos y existe mayor homogeneidad entre los valores de las concentraciones.

6. Según la referencia bibliográfica, Zou et al., 2007; los valores obtenidos están en el rango de pg/mL. Las principales diferencias entre el método de Zou et al (2007) y el método desarrollado en el presente trabajo son las siguientes:

6.1. La dosis fue de 0,6mg, en cambio en nuestro método fue 1 mg (03 tabletas vía oral y 02 tabletas vía vaginal)

6.2. Las muestras fueron sangre con heparina, esto es plasma, en cambio en el presente trabajo se trabajó con muestras de orina

6.3. Las muestras fueron obtenidas de un universo controlado, 20 individuos sanos, en cambio en el presente estudio es un universo no-controlado.

6.4. En el estudio de Zou et al.(2007) se inyectaron alícuotas de 20 μ L al cromatógrafo, en cambio en el presente estudio fueron alícuotas de 0,1 μ L.

6.5. El equipo utilizado por Zou et al. (2007) fue un equipo LC-MS-MS híbrido con bomba cuaternaria marca Agilent y detector marca Applied Biosystem, en cambio en el presente trabajo fue un equipo UPLC MS-MS marca Waters modelo Acquity.

6.6. Las muestras de sangre, en el estudio de Zou et al.(2007), fueron tomadas a los tiempos de : 7,5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 y 360 minutos luego de la dosis, en cambio en el presente estudio no puede determinarse los tiempos en los cuales son las tomas de muestras debido a imposibilidades de origen, por ejemplo personal no capacitado para llenar estos datos en las solicitudes en las sedes regionales

desde donde son enviadas las muestras, imposibilidad de saber la hora de toma de las tabletas abortivas (hora y fecha del suceso) por parte de la gestante.

6.7 Los valores de concentraciones en el estudio de Zou et al. (2007) fueron valores promedios en pg/mL en cada uno de los tiempos indicados en 6.6. En cambio en el presente estudio fue una toma con una lectura a tiempo desconocido, estos valores se encuentran entre 11,5 hasta 81,6 ppb.

7. En la figura 6 se puede observar que la concentración de misoprostol ácido en muestras y el área bajo la curva presentan una relación lineal.

8. En la tabla N° 5 se observa que al comparar las medias del área bajo la curva y la concentración de misoprostol ácido mediante el ANOVA y la prueba de Tukey no se presenta una diferencia significativa con un $P < 0,05$ y desviación estándar menor que 3.

9. En la Tabla N° 5 se observa que a medida que aumenta la cantidad de misoprostol ácido, la media del área bajo la curva aumenta, estadísticamente significativo

10. En la tabla N° 5 se observa que a medida que aumenta la cantidad de misoprostol ácido, la media de la concentración de Misoprostol aumenta, estadísticamente significativo

11. En la figura 7 se puede observar que la desviación estándar de los valores promedio de la concentración no difieren y su relación es lineal.

12. En voluntarios normales, el misoprostol es rápidamente absorbido luego de administración oral con un Tmax de misoprostol ácido de 12 ± 3 min y una vida media de 20-40 min.. Existe una gran variabilidad de niveles plasmáticos de misoprostol ácido entre y dentro de estudios pero valores promedios luego de una sola dosis muestra una relación lineal con dosis mayores de 200 a 400 µg. Las concentraciones de misoprostol ácido en plasma disminuyen en 50% cuando la

dosis es tomada con alimentos y la disponibilidad de misoprostol ácido se reduce. Los estudios de interacción entre el misoprostol y varias drogas no-esteroides anti-inflamatorias no mostraron efecto en la cinética del ibuprofeno o ketorolaco (Vijava, Jagadeesh, Kumar, Patil y Bhushan, 2011)

13. El Misoprostol inalterado (éster) no puede ser detectado en el plasma aún a los cinco minutos luego de dosis oral (Zou et al., 2007)

VI.CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método cuali-cuantitativo para la determinación de misoprostol ácido utilizando muestras de orina humana, las cuales fueron sometidas a extracción SPE con cartuchos HLB Oasis 300mg x 3mL, cuyo eluato metanólico fue inyectado en el equipo Cromatógrafo Líquido de Ultrapformance con detector Masa-Masa (UPLC MS-MS), marca Waters, modelo Acquity, en el cual las corridas cromatográficas son desarrolladas en menor tiempo, utilizando menor cantidad de solventes y es mucho más específica que la cromatografía líquida de alta performance conocida como HPLC.

2. Se desarrolló un método de extracción SPE con cartuchos HLB Oasis 300mg x 3mL de misoprostol ácido utilizando muestras de orina humana de mujeres embarazadas que ingirieron misoprostol en dosis abortiva, cuyo eluato metanólico fue inyectado en el equipo Cromatógrafo Líquido de Ultrapformance con detector Masa-Masa (UPLC MS-MS), marca Waters, modelo Acquity, obteniéndose una concentración promedio de 40,23 ppb, con valores entre 11,5 y 81,6 ppb.

VII.RECOMENDACIONES

- 1.Se recomienda realizar estudios de metabolitos en líquidos biológicos debido a la necesidad de ajustar las dosis, en caso pacientes adultos mayores y niños, y en casos de medicamento con ventana terapéutica estrecha.
- 2.Debe realizarse mayores estudios para poder mejorar la relación dosis-respuesta para el misoprostol como inductor del parto.
3. Es preciso indicar que la dosis de misoprostol éster utilizado como abortivo es de tres tabletas por vía oral y dos ó tres tabletas por vía vaginal.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alemaný, N.(2011). Informe de Evaluación.Consultado el 07 junio 2015.

http://www4.neuquen.gov.ar/salud/images/archivo/tecnologías_biomedicas/Documento_e_informes/Informe_Uso_del_Misoprostol_en_Obstetricia.pdf

Andrew, D., Fiala, C., Safar, P.(2005). Misoprostol and the debate over off-label drug use. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 112 : 269 - 272.

Arias, F.(2000). Pharmacology of oxytocin and prostaglandins. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 4 : 455 – 468.

Aronsson, A., Bygdeman, M., Gemzell-Danielsson, K.(2004). Effects of misoprostol on uterine contractility following different routes of administration. *Hum Reprod* , 19 : 81– 84.

Aronsson, A., Ulfgren, A., Stabi, B., Stavreus-Evers, A., Gemzell-Danielsson, K.(2005). The effect of orally and vaginally administered misoprostol on inflammatory mediators and cervical ripening during early pregnancy. *Contraception*, 72 : 33 – 39.

Baird, D.(2000). Mode of action of medical methods of abortion. *Journal of the American Medical Women's Association*, 55(3 Suppl) : 121 – 126.

El-Refaey, H., Calder, L., Wheatley, D., Templeton, A.(1994). Cervical priming with prostaglandin E1 analogues, misoprostol and gemeprost. *Lancet*, 343 : 1207–1209.

Bartusevicius, A., Barcaite, E., Nadisauskiene, R. (2005). Oral, vaginal and sublingual misoprostol for induction of labor. *International Journal of Gynaecology & Obstetrics*, 91 : 2 - 9

Bentov, Y., Sheiner, E., Katz, M. (2004). Misoprostol overdose during the first trimester of pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 115 : 108 - 109.

Castleman, L., Oanh, K., Hyman, A., Thuyle, T., Blumenthal, B.(2006). Introduction of the dilation and evacuation procedure for second trimester abortion in Vietnam using manual vacuum aspiration and buccal misoprostol. *Contraception*,74 : 272 – 276.

Choksuchat, Ch. (2010).Clinical use of misoprostol in nonpregnant women: review article. *The journal of Minimally Invasive Gynecology* ,17 : 449-455

Choksuchat, Ch., Cheewadhanaraks, S., Getpook, C., Wootipoom, V.,

Chwalisz K, Garfield R. (1998).Nitric oxide as the final metabolic mediator of cervical ripening. *Human Reproduction*,13 : 245 – 248.

Chong YS, Chua S, el-Refaey H, ChooWL, Chanrachakul B, Tai BC.(2001). Postpartum intrauterine pressure studies of the uterotonic effect of oral misoprostol and intramuscular syntometrine. *Br J Obstet Gynaecol*,108 : 41–47.

Cicinelli, E., de Ziegler, D., Bulletti, C., Matteo, M., Schonauer, L., Galantino, P. (2000).Direct transport of progesterone from vagina to uterus. *Obstetrics & Gynecology*, 95 : 403 – 406.

Crane, J., Healey, S.(2006) Use of misoprostol before hysteroscopy: a systemic review. *Obstetrics Gynecology*,28 : 373 – 379.

Dal Pizzol, T., Pozzobon, F., Serrate, S.(2006). Prenatal exposure to misoprostol and congenital anomalies : Systemic review and meta-analysis. *Reproductive Toxicology*;22 : 666 – 671.

De Hoffmann E y Stroobant V (2007). *Mass Spectrometry, Principles and Applications*. , The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England:John Wiley & Sons.

Derman, R., Kodkany, B., Goudar, S., Geller, S., Naik, V., Bellad, MB. (2006).Oral misoprostol in preventing postpartum haemorrhage in resource-poor communities: a randomized controlled trial. *Lancet*,368 : 1248 – 1253.

Dhanavoravibul, K.(2006). Misoprostol for cervical ripening in non-pregnant women: a randomized double-blind controlled trial of oral versus vaginal regimens. *Human Reproduction*,21 : 2167 – 2170.

FDA (2016). Consultado 07 junio 201. <http://www.fda.gov/Drugs>

FDA (2015). Consultado 07 junio 2015. <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2000/20687lbl.htm>

Feitsma, A., Kanhai, H.(2005). Misoprostol in the management of postpartum haemorrhage. *International Congress Series*, 1279 : 358 - 363

Fiala, C., Arinsson, A., Granath, F.,Stephansson, O., Seyberth, H.,Watzer, B., Gemzell-Danielsson, K.(2005) Pharmacokinetics of a novel oral slow-release form of misoprostol. *Human Reproduction*, 20(12) : 3414 – 3418.

Fischer, M., Bhatnagar, J., Guarner, J., Reagan, S., Hacker, J., Van Meter, S. (2005).Fatal shock syndrome associated with *Clostridium sordellii* after medical abortion. *The New England Journal of Medicine*,353 : 2352 – 2360.

Gemzell-Danielsson, K., Marions, L., Rodriguez, A., Spur, B., Wong, P., Bygdeman, M. (1999).Comparison between oral and vaginal administration of misoprostol on uterine contractility. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* ,93 : 275– 280.

Hofmeyr, G., Gulmezoglu, A.(2008). Misoprostol for the prevention and treatment of postpartum haemorrhage. En: *Best Practice & Research Clinical Obstetric & Gynaecology*, 22(6) : 1025 - 1041

Ho, P., Ngai, S., Liu, K., Wong, G., Lee, S. (1997).Vaginal misoprostol compared with oral misoprostol in termination of second trimester pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*,90 : 735 – 738

Khan, R., el Refaey, H., Sharma, S., Sooranna, D., Stafford, M. (2004). Oral, rectal, and vaginal pharmacokinetics of misoprostol. *Obstetrics & Gynecology*, 103 : 866 – 870.

Khan, R., el-Refaey, H.(2003). Pharmacokinetics and Adverse-Effect Profile of Rectally Administered Misoprostol in the Third Stage of Labor. *The American College of Obstetricians and Gynecologists* , 101(5) : 968 - 974

Kim, J., Han, J., Choi, J., Ahn, H., Yang, J., Kang, I. (2005). Oral misoprostol and uterine rupture in the first trimester of pregnancy. *Reproductive Toxicology*,20 : 575 – 577.

Kotsonis, F., Dodd, D., Regnier, B., Kohn, F. (1985).Preclinical toxicology profile of misoprostol. *Digestive Diseases and Sciences*,30(11 Suppl),pp. 142S – 146S.

Liggins G.(1981). *The cervix in pregnancy and labor: clinical and Biochemical Investigations*. Edinburgh: Churchill Livingstone. Ellwood, D., Anderson, A., editors

Meckstroth, K., Whitaker, A., Bertisch, S., Goldberg, A., Darney, P.(2006) Misoprostol administered by epithelial routes. *Obstetrics & Gynaecol* ,108 : 82–90.

Mousa, H., Walkinshaw,S.(2001). Major postpartum haemorrhage. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 13 (6) : 595 – 603.

Murota, S., Abe, M., Otsuka, K. (1997).Stimulatory effect of prostaglandins on the production of hexosamine-containing substances by cultured fibroblasts (3) induction of hyaluronic acid synthetase by prostaglandin F2alpha. *Prostaglandins*,14 : 983 – 991.

Ngai, S., Tang, O., Lao, T., Ho, P., Ma, H. (1995).Oral misoprostol versus placebo for cervical dilatation before vacuum aspiration in first trimester pregnancy. *Human Reproduction*,10 : 1220 – 1222.

Orioli, I., Castilla, E.(2000).Epidemiological assessment of misoprostol teratogenicity. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*,107 : 519 – 523.

Plaut, M., Schwartz, M., Lubarsky, S.(1999). Uterine rupture associated with the use of misoprostol in the gravid patient with a previous cesarean section. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* ,180 : 1535 – 1542.

Rajabi, M., Solomon, S., Poole, A.(1991). Biochemical evidence of collagenase-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical dilatation at parturition in the guinea pig. *Biology of Reproduction*, 1991(45) : 764 – 772.

Rath, W., Theobald, P., Kuhnle, H., Kuhn, W., Hilgers, H., Weber, L. (1982).Changes in collagen content of the first trimester cervix uteri after treatment with prostaglandin F2 alpha gel. *Archives of Gynecology and obstetrics* ,231 :107 – 110.

Robert, A., Nezamis, J. Phillips,E.(1967). Inhibition of gastric secretion by prostaglandins. *American Journal of Digestive Diseases*, 12 : 1073 – 1076.

Salvemini, D., Misko, T., Masferrer, J., Seibert, K., Currie, M., Needleman, P. (1993).Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proceeding of the National Academy of Sciences*,90 : 7240 – 7244.

Schaff, E., DiCenzo, R., Fielding, S. (2005).Comparison of misoprostol plasma concentration following buccal and sublingual administration. *Contraception* ,71 : 22 – 25.

Schaff, E., DiCenzo, R., Fielding, S. (2005).Misoprostol levels comparaisn after oral and sublingual administration. *Contraception* , 71 : 22 - 25

Shannon, C., Brothers, P., Philip, N., Winikoff, B.(2004). Infection after medial abortion: a review of the literature. *Contraception*,70 : 183 – 190.

Sigma-Aldrich.(2016).Material Safety Data Sheet. Consultado 07 junio 2015. <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=PE&lang>

uage=en&productNumber=M6807&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2FSIGMA%2FM6807%3Flang%3Den

Tang, O., Gemzell-Danielsson, K., Ho, P.(2007). Misoprostol: Pharmacokinetic profile, effects on the uterus and side-effects. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 99 : S160-S167.

Tang, O., Schweer, H., Seyberth, H., Lee, S., Ho, P.(2002). Pharmacokinetics of different routes of administration of misoprostol. *Hum Reprod* , 17 : 332 – 336.

Uldbjerg, N., Ekman, G.,Malmstrom, A., Olsson, K., Ulmsten, U.(1983).Ripening of the human uterine cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans and collagenolytic activity. *American Journal of Obstetric and Gynecology*, 147 : 662 - 666

Vijaya, D.,Jagadeesh, B.,Kumar, K.,Patil, U.,Bhushan, I.(2011).Development and validation of highly sensitive method for determination of misoprostol free acid in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry : Application to a clinical pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 879 : 2827 – 2833.

Vogel, D., Burkhardt, T., Rentsch, K., Schwee, H., Watzer, B.,Zimmermann, R. (2004).Misoprostol versus methylethergometrine: pharmacokinetics in human milk. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*,;191 : 2168 –2173.

Watkinson, G., Hopkins, A., Akbar, F.(1988). The therapeutic efficacy of misoprostol in peptic ulcer disease. *Postgrade Medical Journal*,64(suppl 1) : 60 – 77.

Zieman, M., Fong, S., Benowitz, N., Banskter, D., Darney, P. (1997).Absorption kinetics of misoprostol with oral or vaginal administration. *Obstetrics & Gynecology*, 90 : 88–92.

Zou, Y., Chen, X., Song, B., Zhong, D. (2007). Determination of misoprostol acid in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 852 : 122 - 127