

Determinación cromatográfica de misoprostol a dosis baja en plasma neonatal y calostro materno

Chromatographic determination of misoprostol at a low dose in neonatal plasma and mother colostrum

Dr.C. Danilo Nápoles Méndez ¹ y Dr.C. Eloy Álvarez Guerra ²

¹ Especialista de II Grado en Ginecología y Obstetricia. Máster en Urgencias Médicas. Doctor en Ciencias Médicas. Profesor Titular. Hospital Provincial Ginecoobstétrico "Mariana Grajales Coello", Santiago de Cuba, Cuba.

² Especialista de II Grado en Bioquímica. Doctor en Ciencias Médicas. Profesor Titular. Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

Se efectuó un estudio de cromatografía con el objetivo de realizar un análisis cualitativo que definiera un rango de seguridad; demostrar la presencia o no del misoprostol en sangre neonatal o calostro materno cuando se emplea a bajas dosis (25 microgramos) por vía vaginal, en pacientes con distocia de fase latente del trabajo de parto, así como determinar la presencia de complicaciones en el recién nacido. Las muestras fueron analizadas en 2 momentos entre 2008 y 2009, previa coordinación del Hospital Ginecoobstétrico "Mariana Grajales Coello" de Santiago de Cuba con el Centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente y el Centro Nacional de Toxicología en Ciudad de La Habana, si bien la investigación formó parte de un ensayo clínico en fase III, donde se empleó el misoprostol en 327 gestantes. Para la cromatografía se escogieron 50 muestras de plasma neonatal y 50 de calostro materno, de pacientes que parieron en las primeras 6 horas de la última dosis del medicamento, cuando supuestamente existe actividad plasmática. Los recién nacidos fueron observados clínicamente durante 72 horas, en cuyo intervalo se les indicaron pruebas de laboratorio para precisar posibles complicaciones, pero estas no se produjeron; tampoco resultó posible cuantificar señales en los tiempos de retención esperados para los derivados y el principio activo del misoprostol. Se concluyó que en las condiciones de administración establecidas en la casuística, los datos cromatográficos obtenidos muestran que la dosis empleada es segura para el neonato.

Palabras clave: embarazada, recién nacido, plasma neonatal, calostro materno, cromatografía, misoprostol

ABSTRACT

A chromatography study was conducted with the aim of a qualitative analysis to define a range of safety, demonstrate the presence or absence of misoprostol in neonatal blood or mother colostrum when used at low doses (25 micrograms) vaginally in patients with dystocia in latent stage of labor, as well as to determine the presence of complications in the newborn. The samples were analyzed in 2 times between 2008 and 2009, after

coordination of "Mariana Grajales Coello" Obstetrics and Gynecology Hospital in Santiago de Cuba with the Center for Medical Biophysics of the Oriente University and the National Center of Toxicology in Havana city, although the research was part of a phase III clinical trial, where misoprostol was used in 327 pregnant women. For chromatography 50 samples of neonatal plasma and 50 of mother colostrum were chosen from patients that gave birth in the first 6 hours after the last dose of the medication, when supposedly there is activity in plasma. Newborns were observed clinically for 72 hours, at which time laboratory tests were indicated to specify potential complications, but these did not occur, nor was it possible to quantify signals on the retention times expected for derivatives and the active ingredient of misoprostol. It was concluded that in the conditions of administration established in our cases the chromatographic data obtained show that the dose used is safe for the baby.

Key words: pregnant woman, newborn, neonatal plasma, mother colostrum, chromatography, misoprostol

INTRODUCCIÓN

La cromatografía continúa siendo una técnica eficaz para disolver adecuadamente mezclas de compuestos naturales o sintéticos, con fines de identificación y cuantificación. El origen de los métodos cromatográficos se remonta a la segunda mitad del siglo XIX, cuando Tswett, ¹ considerado como su descubridor, logró separar pigmentos vegetales; pero no fue hasta mediados de los años 60 de la pasada centuria cuando se introdujo la cromatografía líquida de alta presión, según sus siglas HPLC en inglés, de gran importancia hoy en día. ²

El misoprostol, análogo semisintético de la prostaglandina E₁, es el producto más usado para madurar e inducir el parto. Se sabe que al final del embarazo, el cérvix experimenta determinados cambios bioquímicos y físicos, que modifican su estructura y favorecen su borramiento y dilatación. El cuello uterino está compuesto por músculo liso, cuyo contenido de arriba abajo es de 25–6 % en colágeno y tejido conectivo, que constituye el material básico para formar importantes componentes cervicales (glucosaminoglicanos). ³ La disminución de la colágena se produce por su digestión proteolítica con intervención de las colagenasas, presentes en el cuello, además de lo cual varía la correlación de las concentraciones de glucosaminoglicanos, con descenso de los volúmenes de sulfato de dermatán y condroitinsulfato, así como predominio del ácido hialurónico, que es el que menos fija la colágena y permite la entrada de agua, con reducción de la textura del tejido y del biglicán en 40 %, pero a la vez incremento de los sulfatos de heparán y perlecán obtenidos de actividad fibroblástica; proceso que se ve favorecido en su totalidad por el misoprostol, por lo cual constituye un medicamento indispensable para la madurez cervical. ⁴⁻⁷

Teniendo en cuenta que la inmadurez del cérvix deviene la causa fundamental de la prolongación de la fase latente, se extrapoló el uso del citado medicamento a esta nueva indicación, con el marcado interés de explorar la seguridad de la dosis de 25 microgramos, que aunque considerada eficaz y confiable, no aparece avalada en investigaciones donde se haya confirmado su presencia en el plasma neonatal o calostro materno, en este último a bajas dosificaciones. ^{3,4}

En diferentes estudios cromatográficos, sus autores se han dedicado a investigar la farmacocinética del misoprostol en el plasma materno y aportado el conocimiento preciso

sobre sus concentraciones, tiempo de actividad plasmática y eliminación, según vías de administración del fármaco;⁸ pero en algunas publicaciones se menciona incluso la evaluación de su permanencia en el calostro materno cuando se han suministrado altas dosis del preparado.⁹ Por consiguiente, la motivación para elaborar este artículo y someterlo a la valoración de los lectores consistió en determinar si el medicamento pasaba a la estructura fetal primero y a la neonatal después, con repercusión anatómica en el recién nacido; propósito que demandó el uso de un método separatista de compuestos, lo suficientemente eficaz y fidedigno como para confiar en la validez de sus resultados.

MÉTODOS

Se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para determinar la presencia del misoprostol en 50 muestras de plasma neonatal y otras 50 de calostro materno, las cuales se corrieron en 2 tiempos durante el bienio 2008-2009, después de conservadas.

Descripción del sistema

Está compuesto por una bomba de alta presión 2 248 (Farmacia, Suecia), con una columna estándar de fase reversa (C-18) que mide 25 cm por 4,6 mm y precolumnas de 5 cm por 4,6 mm, así como un detector ultravioleta visible, acompañado de integrador (Zhimatzu, Japón).

Sistema solvente: acetonitrilo: metanol: agua (45:20:35). Para la fase móvil se aplicó un flujo de 1,5 mL/min del solvente.

La muestra (1 mL de la de plasma neonatal, con la adición de 2 mL de acetonitrilo) se procesó previamente mediante extracción orgánica en acetonitrilo, se agitó y dejó reposar por 10 minutos, se le dio un golpe de centrifuga, se tomó el sobrenadante y se inyectaron 50 µL de la muestra en el puerto de inyección del equipo de HPLC.

En una columna de fase reversa C-18 se analizaron las muestras de plasma neonatal y calostro materno, respectivamente, después de haberse administrado 25 µg de misoprostol para tratar la fase latente prolongada del trabajo de parto a las madres que parieron en las primeras 6 horas de aplicado el medicamento, partiendo del conocimiento de su actividad plasmática durante ese intervalo cuando se empleaba por vía vaginal. En este estudio no se pretendió validar un nuevo método farmacocinético ni someter a prueba los ya conocidos; por el contrario, teniendo en cuenta las limitaciones en el recién nacido como grupo vulnerable, según establece el registro federal estadounidense, la intención fue realizar un análisis cualitativo que definiera un rango de seguridad para demostrar la presencia o no del misoprostol en ambos tipos de muestras.

Preliminarmente se prepararon patrones de concentraciones de 400, 200 y 100 µg/mL, así como también por dilución del medicamento utilizado (comprimidos de misoprostol) en 10 mL de acetonitrilo, pues con ello se estandarizó la técnica para detectar fracciones del producto por HPLC, mediante inyecciones aplicadas en condiciones diferentes hasta optimizar el procedimiento que se utilizaría con ese fin. De igual forma, los patrones inyectados en la fase móvil durante un primer momento para valorar la línea base una vez alcanzado el estado de equilibrio cromatográfico, fueron: 2; 1; 0,5 y 0,25 µg/mL.

En la cromatografía, el límite de detección se determinó mediante recta de regresión (coeficiente de correlación).

De hecho, en un segundo momento se realizó una evaluación cruzada con un equipo de cromatografía líquida de alta presión (Knauer, Alemania), a fin de mejorar las condiciones de sensibilidad para plantear un nivel de seguridad más bajo. Se mantuvieron las mismas circunstancias de corrida: columna C-18 de fase reversa, solventes para disolver la mezcla, fase móvil, temperatura de columna, velocidad de flujo y detector ultravioleta. Se inyectaron concentraciones iniciales de 0,0006, 0,0005 y así sucesivamente hasta 0,00005 y 0,000005 $\mu\text{g/mL}$. Los solventes empleados tuvieron calidad, según HPLC, e igualmente el límite de detección se estimó mediante una recta de regresión (coeficiente de correlación).

A lo anterior se adicionó una observación clínica estricta de los recién nacidos por el equipo de neonatología, durante 72 horas, que incluyó los sistemas digestivo, neurológico y hematológico, así como también la indicación de estudios hemoquímicos para determinar la posible ocurrencia de complicaciones relacionadas con el tratamiento.

RESULTADOS

La **figura 1** representa el cromatograma típico, obtenido a partir de un patrón de misoprostol.

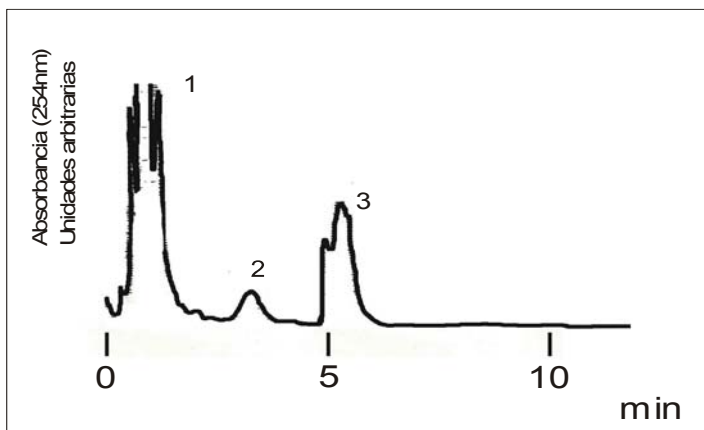


Figura 1. *Cromatograma típico para el extracto en acetonitrilo del misoprostol (4 $\mu\text{g/mL}$)*

El pico 1 pertenece a los agregantes, el pico 3 corresponde al misoprostol y el pico 2 se supone asociado al ácido misoprostico, derivado por oxidación del fármaco.

La disolución de una tableta de prostaglandina sintética con acetonitrilo produjo un extracto del principio activo y los agregados, que fue inyectado en el cromatógrafo luego de una filtración para eliminar partículas existentes en la solución. El primer pico del cromatograma se relaciona con los agregantes presentes en un tiempo de retención menor de 2 minutos; pero el segundo y tercero, con los componentes del comprimido a los 3 y 5,3 minutos, respectivamente. El segundo pico tiene el tiempo de retención informado para el ácido misoprostico y puede producirse por oxidación de la prostaglandina; pero el último está vinculado con la concentración del misoprostol, que al

ser mayor, resulta idónea para evaluar la presencia de derivados de la tableta en plasma u otro fluido biológico. El patrón de concentración mínima se limitó a 0,25 µg/mL del comprimido.

La composición química del fármaco, la estructura de los agregantes empleados en la formulación y la forma de preparación de la muestra en extracción orgánica, tornan poco probable la relación de estos picos con sustancias compactantes como celulosa, almidones, talco u otras. Los patrones preparados en plasma neonatal permiten sugerir que una cierta cantidad del misoprostol detectado parece enlazarse con compuestos plasmáticos, como puede inferirse de la cuantificación de áreas totales. Al igual que en las muestras disueltas en acetonitrilo, determinados procesos de oxidación (quizás generados enzimáticamente) incrementan el nivel del segundo pico y confirman la relación existente entre este y la concentración del medicamento cuantificada en el tercer pico (**figura 2**); hecho revelador de que el segundo está químicamente relacionado con el tercero.

Note la dependencia con la concentración para los picos señalados mediante flechas y la presencia de ambos: el referido al ácido misoprostico (aproximadamente 3 minutos) y el correspondiente al misoprostol (alrededor de 5 minutos).

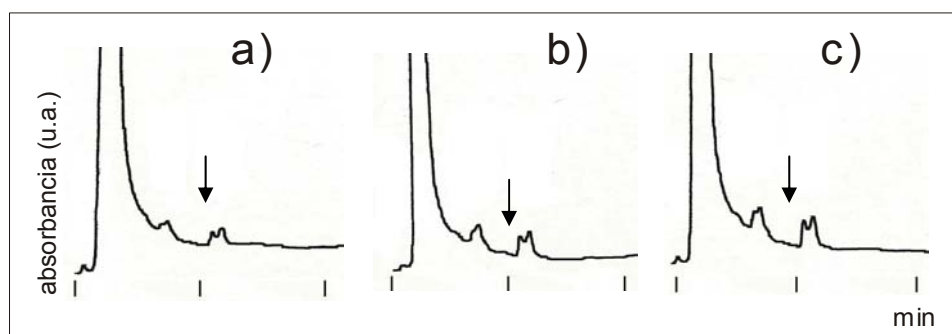


Figura 2. Plasma neonatal con adición de misoprostol: a) 4 µg/mL; b) 8 µg/mL y c) 10 µg/mL

Las barras representan la desviación estándar del área medida. Se incluye el punto correspondiente a la respuesta cero (controles), se inserta la recta de regresión con el límite de detección estimado en 1,8 ng/mL y se distingue una ampliación de la línea base de la paciente a), donde se observa con mayor precisión la ausencia de picos cuando supuestamente debían estar presentes en la grávida.

Al respecto, conviene remitir a la observación de las muestras de plasma neonatal cuando se adicionó experimentalmente el misoprostol, puesto que en su representación gráfica se detecta la señal correspondiente, dada por los picos de retención, y se demuestra la consistencia del estudio.

En la **figura 3a** aparece trazada una curva de concentración *versus* área de referencia para 4 valores de concentración, obtenida en este estudio, con un límite de detección estimado de acuerdo con la recta de regresión, de 1,8 ng/mL. La linealidad se considera adecuada, al comunicarse un R de 0,99; y aunque los objetivos de este ensayo no persiguieron investigar la farmacocinética del producto sobre el neonato, la curva de concentración es útil para formular conclusiones al respecto. Estos valores se utilizaron previamente como límite de seguridad para detectar el misoprostol en plasma.

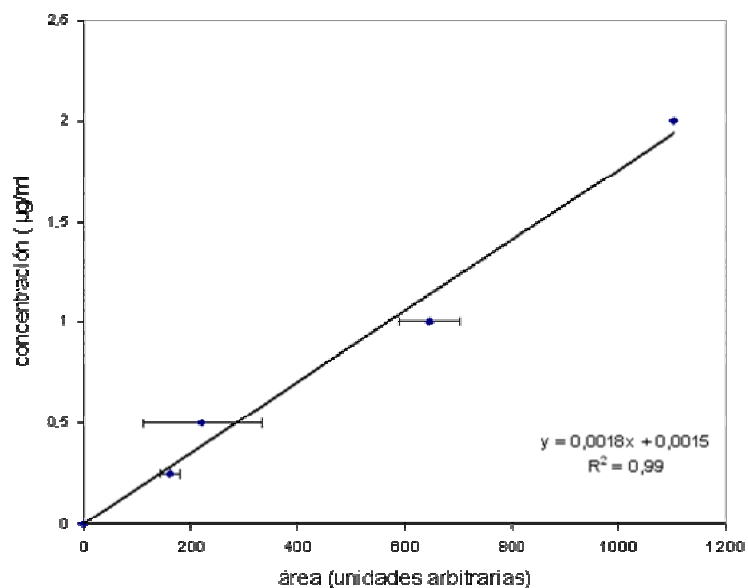


Figura 3a. Curva de concentración versus área para el extracto de tableta de misoprostol

Microgramo/mililitro (µg/mL)	nanogramo/mililitro (ng/mL)
2,5 µg/mL	2 500 (ng/mL)
2,0 µg/mL	2 000 (ng/mL)
1,5 µg/mL	1 500 (ng/mL)
1,0 µg/mL	1 000 (ng/mL)
0,5 µg/mL	500 (ng/mL)
0,25 µg/mL	250 (ng/mL)
	Recta de regresión en el límite de seguridad
0,0018 µg/mL	1,8 (ng/mL)

En la **figura 3b** se observa una expansión del rango de sensibilidad entre 5-500 pg/mL, cercano al punto de seguridad (700 pg/mL); evaluación esta que garantizó una mayor certeza de los cromatogramas en plasma neonatal y calostro materno para precisar la ausencia de derivados del misoprostol, con una linealidad de R = 0,999.

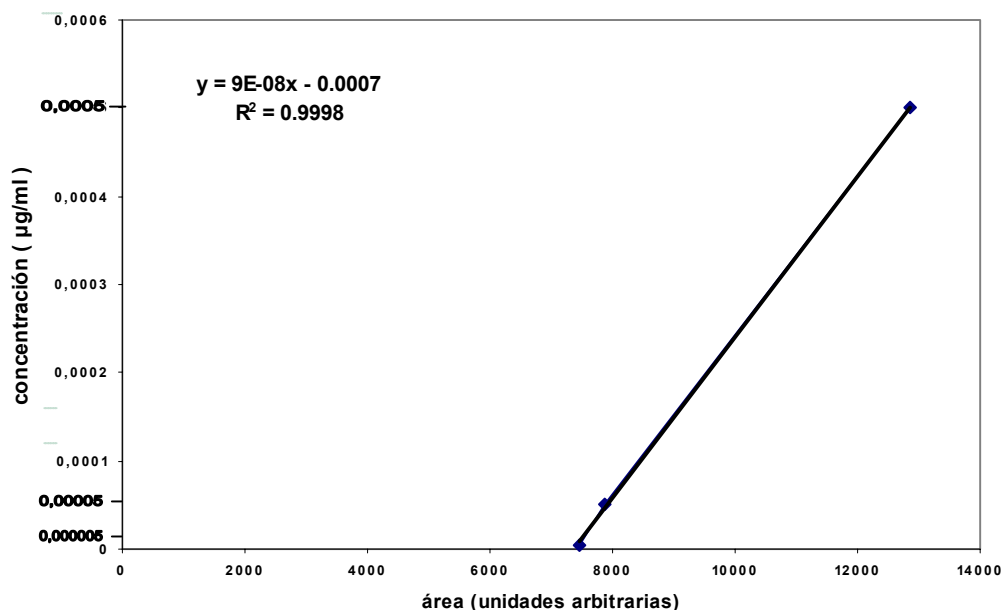


Figura 3b. Se muestra un rango de expansión entre 5–500 pg/mL para evaluarla sensibilidad del método.

Microgramo/mililitro (µg/mL)	nanogramo/mililitro (ng/mL)	picogramo/mililitro (pg/mL)
0,0006 µg/mL	0,6 (ng/mL)	600 pg/mL
0,0005	0,5	500
0,0004	0,4	400
0,0003	0,3	300
0,0002	0,2	200
0,0001	0,1	100
0,00005	0,05	50
0,000005	0,005	5
Recta de regresión en el límite de seguridad		
0,0007 µg/mL	0,7 ng/mL	700 pg/mL

En ninguna de las muestras procedentes del plasma neonatal y calostro humano fue posible cuantificar resto alguno de misoprostol en los tiempos de retención esperados para los derivados y el principio activo del fármaco. La **figura 4** contiene algunos ejemplos de los cromatogramas examinados.

Seguidamente se informan los resultados de las muestras en plasma neonatal y calostro materno, analizadas después del uso del misoprostol en aquellas gestantes que se hallaban en fase latente prolongada y tuvieron su parto en las primeras 6 horas de haberseles administrado el medicamento.

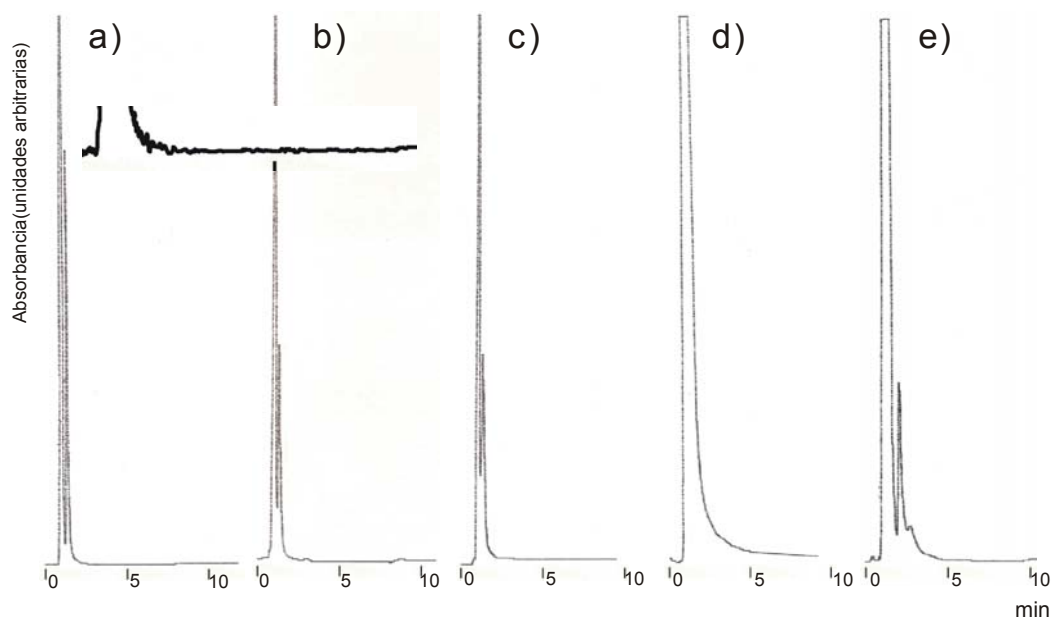


Figura 4. Cromatogramas obtenidos de extractos de plasma neonatal (a-d) y calostro humano (e) de pacientes en fase latente prolongada, tratadas con misoprostol

DISCUSIÓN

Byderman⁸ y Cecatti¹⁰ comunican que el misoprostol alcanza su concentración máxima en plasma materno entre los 12,5-120 minutos, en dependencia de la vía de administración empleada; sin embargo, los autores de esos artículos no han investigado otras variantes como el plasma neonatal y el calostro materno, pues los estudios realizados en este último se han llevado a cabo con dosis altas administradas para eliminar complicaciones hemorrágicas del parto, pero no con dosificaciones bajas.

Vogel¹¹ comparó la farmacocinética de 200 µg del medicamento por vía oral con 250 µg de metilergometrina en la leche humana y demostró que las concentraciones del primero eran solo un tercio de las que se producían con la segunda, que se eliminaban más rápidamente y que el recién nacido se exponía menos a su acción.

Andel *et al*⁹ probaron que el misoprostol pasa a la leche materna en concentraciones muchísimo más bajas que a la sangre y que se encuentra en los límites de detección 5 horas después de haber sido administrado por vía oral, lo cual impone suspender la lactancia por un período de 6 horas cuando se usa el fármaco en dosis altas para combatir la hemorragia posparto.

En consecuencia, estos estudios se han visto limitados en el neonato por razones de seguridad, puesto que la elevada solubilidad de las prostaglandinas lleva a suponer que pudieran quedar depositadas en el plasma del recién nacido en determinadas cantidades. Considerando el volumen plasmático neonatal y las condiciones fisiológicas podría obtenerse una determinada concentración del medicamento; por consiguiente, se consideró oportuno evaluar, dentro de un rango de seguridad, la ausencia del misoprostol en plasma neonatal y calostro humano. La volemia de un neonato de 3 kg de peso puede estimarse en 255 mL. El paso de 459 ng de misoprostol al feto (dosis 54 veces menor que la utilizada en el estudio) puede proporcionar una concentración

equivalente a 1,8 ng/mL, capaz de acumularse en el recién nacido si los mecanismos de excreción no son los más adecuados. Inicialmente, esa cantidad fue prefijada como límite de seguridad para la investigación; pero luego, al mejorar el rango de sensibilidad, se fijó en 700 pg/mL.^{12, 13}

Numerosos trabajos científicos acerca de farmacocinética en la madre, donde se ha usado el misoprostol por vías oral, vaginal, sublingual, rectal y bucal, en distintas dosis, incluso con polímero de hidrogel para liberación lenta, han proporcionado información suficiente sobre el asunto.¹⁴⁻¹⁶

La carencia de estudios previos sobre el compartimiento fetal o su presencia en el recién nacido impide tener puntos de referencia sobre el particular; de igual manera, tampoco se ha publicado información concerniente al hallazgo de misoprostol en calostro materno cuando se ha indicado en bajas dosis.¹³

Del citado fármaco suelen prescribirse 25-100 µg para preinducción e inducción del parto por vía vaginal, respectivamente; valores que se corresponden con una concentración máxima de 4,5-17,8 ng/mL en una gestante de 70 kg de peso con volemia de 5 600 mL. La dosis utilizada en este ensayo fue la mínima en ese rango.^{13,17,18}

Se conoce, a través de observaciones farmacocinéticas, que cuando el misoprostol se emplea por vía vaginal, permanece elevado en el plasma materno por un término de hasta 6 horas; sin embargo, en esta casuística no se hallaron vestigios del medicamento o sus derivados en el líquido plasmático neonatal, lo cual lleva a presuponer que si el compuesto pasa al feto, no se acumula en el embrión -- como tampoco persiste en la madre --, de donde se infiere que en las condiciones de administración establecidas en el presente estudio, los datos obtenidos por medio de la cromatografía permiten afirmar que la dosis ensayada (25 µg) es segura para el recién nacido^{13,19,20} y revalida la utilidad del método.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ettre LS, Sakodynskii KI. M.S. Tswett and the discovery of chromatography II: Completion of the development of chromatography (1903-1910). *Chem Materials Sci Chromatog*; 35(5-6). <<http://www.springerlink.com/content/f40j18528m2638tn/>> [consulta: 7 marzo 2011].
2. Dierksmeier G. *Métodos cromatográficos*. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 2005.
3. Nápoles Méndez D. Misoprostol en la inducción y fase latente del trabajo de parto. *Rev Cubana Obstet Ginecol* 2006; 32(2). <http://bvs.sld.cu/revistas/gin/vol32_2_06/gin05206.pdf> [consulta: 12 marzo 2007].
4. Nápoles Méndez D, Gómez Neyra Y, Caveda Gil A. Experiencia del uso del misoprostol en la preinducción e inducción del parto. *Rev Cubana Obstet Ginecol* 2007; 33(3). <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2007000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es> [consulta: 12 febrero 2008].
5. Hofmeyr GJ, Gülmezoglu AM. Misoprostol vaginal para la maduración cervical y la inducción del trabajo de parto. <http://apps.who.int/rhl/pregnancy_childbirth/induction/cd000941/es/index.html> [consulta: 21 febrero 2006].

6. Akerud A, Dubiecke A, Sennstrom M, Ekmon Orderberg G, Malmström A. Differences in heparan sulfate production in cervical fibroblast cultures from women undergoing term and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87(11):1220-8.
7. Durn JH, Marshall KM, Farrar D, O' Donovan P, Scally AJ, Woodward DF, et al. Lipidomic analysis reveals prostanoid profiles in human term pregnant myometrium. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010; 82(1):21-6.
8. Bygdeman M. Pharmacokinetics of prostaglandins. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 2003; 17(5):707-16.
9. Andel AH, Villar J, Gümezoglu MA, Mostafa SA, Youssef AA, Shokry M, et al. The pharmacokinetics E₁ analogue misoprostol in plasma and colostrum after postpartum oral administration. *Eur J Obstet Gynecol* 2003; 108:25-8.
10. Cecatti JG, Barbosa de Moraes Filho O. Farmacodinamia y vías de administración. En: *Uso de misoprostol en obstetricia y ginecología*. 2 ed. Santo Domingo: FLASOG, 2007:17-27.
11. Vogel D, Burkhardt T, Rentsch K, Schweer H, Watzer B, Zimmermann R, et al. Misoprostol versus methyletergometrine: pharmacokinetics in human milk. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(6):2168-73.
12. Zou Y, Chen X, Song B, Zhong D. Determination of misoprostol acid in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 852(1-2):122-7.
13. Nápoles Méndez D, Cutié León ER. Nuevo protocolo diagnóstico y terapéutico en la distocia de fase latente del trabajo de parto [tesis doctoral]. 2008. Hospital Provincial Ginecoobstétrico "Mariana Grajales Coello", Santiago de Cuba. <http://tesis.repo.sld.cu/83/1/Danilo_Napoles.pdf> [consulta: 12 marzo 2011].
14. Fiala C, Aronsson A, Granath F, Stephansson O, Seyberth HW, Watzer B, et al. Pharmacokinetics of a novel oral slow-release form of misoprostol. *Hum Reprod* 2005; 20(12):3414-8.
15. Aronsson A, Fiala C, Stephansson O, Granath F, Watzer B, Schweer H, et al. Pharmacokinetic profiles up to 12 h after administration of vaginal, sublingual and slow-release oral misoprostol. *Hum Reprod* 2007; 22(7):1912-8.
16. Rayburn WF, Powers BL, Plasse TF, Carr D, Di Spirito M. Pharmacokinetics of a controlled-release misoprostol vaginal insert at term. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13(2):112-7.
17. Shan Tang O, Chung Ho P. The pharmacokinetics and different regimens of misoprostol in early first-trimester medical abortion. *Contraception* 2006; 74(1):26-30.
18. Powers BL. Pharmacokinetics and safety of the 100 mcg misoprostol vaginal insert. *Cytokine Pharma Sciences* 2007. <<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00528255>> [consulta: 12 julio 2007].
19. Colquhoun H. Safety and efficacy study of misoprostol vaginal insert for induction of labour. *Cytokine Pharma Sciences* 2007. <<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00346840>> [consulta: 12 julio 2007].
20. Joya X, Pujadar M, Falcon M, Civit E, García Algar O, Vall O, et al. Gas chromatography mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056364>> [consulta: 12 marzo 2011].

MEDISAN 2011; 15(5):590

Recibido: 12 de marzo de 2011
Aprobado: 16 de marzo de 2011

Dr.C. Danilo Nápoles Méndez. Hospital Provincial Ginecoobstétrico "Mariana Grajales Coello", avenida Victoriano Garzón, Santiago de Cuba, Cuba.
Dirección electrónica: danilon@medired.scu.sld.cu