

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México



Mecanismos de Acción de la Anticoncepción de Emergencia:
Evaluación hormonal y patrón de secreción intrauterina de glicodelina durante la fase ovulatoria del ciclo en mujeres tratadas con levonorgestrel a las dosis utilizadas en anticoncepción de emergencia.

T E S I S

Que para obtener el Título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P r e s e n t a

MARTA MARGARITA DURAND CARBAJAL

Tutor:

Dr. Fernando Larrea Gallo

Comité Tutorial:

Dra. Elena Zambrano González

Dr. Horacio Merchant Larios



Universidad Nacional
Autónoma de México

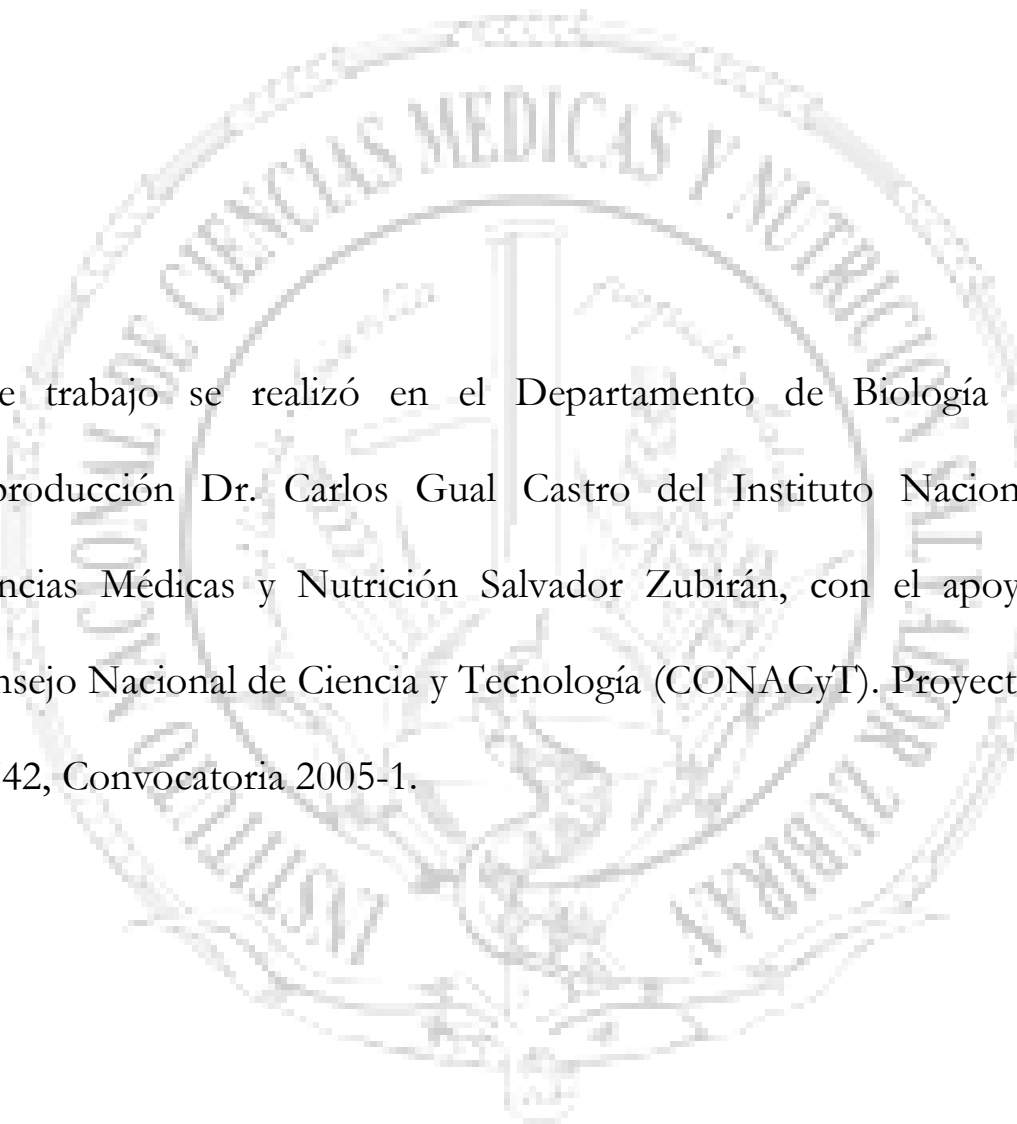


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción Dr. Carlos Gual Castro del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Proyecto No. 13742, Convocatoria 2005-1.

AGRADECIMIENTOS

A mis hijos

A mis padres

A mis hermanos y amigos

A mis maestros

INDICE

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Definición de la anticoncepción de emergencia	7
1.2 Desarrollo de métodos de uso poscoital	8
1.3 Dosis y principio activo	9
1.4 Efectividad y mecanismos de acción	11
1.5 Glicodelina en suero como marcador del efecto de la P ₄ en el endometrio	15
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
3. MATERIAL Y METODOS	19
3.1 Participantes	19
3.2 Diseño del estudio	19
3.3 Cuantificaciones hormonales	21
3.4 Análisis estadístico	23
4. RESULTADOS	25
4.1 Características clínicas	25
4.2 Efectos del LNG sobre las características hormonales del ciclo ovárico	26
4.3 Efectos del LNG sobre el desarrollo folicular	28
4.4 Efectos del LNG sobre los parámetros hormonales	29
4.5 Efectos sobre las concentraciones de Gd en suero y en el tracto genital.....	32
5. DISCUSIÓN	36
6. CONCLUSIONES	43
7. REFERENCIAS	45
8. ANEXOS	54

RESUMEN

La anticoncepción de emergencia (AE), que en la actualidad consiste en la administración de una progestina sintética (levonorgestrel) dentro de las primeras 72 horas posteriores al coito, representa una de las alternativas más confiables para la prevención de embarazos no deseados. Sin embargo, por su connotación poscoital es considerada por algunos sectores de la sociedad como un método abortivo y por lo tanto su uso y distribución han sido ampliamente controvertidos. En este trabajo de tesis, y con la finalidad de contribuir con información basada en evidencias, se propuso estudiar los efectos de la administración de levonorgestrel (LNG) sobre la función neuroendócrina y ovárica, así como endometrial de mujeres en edad reproductiva. La hipótesis de este estudio establece que el LNG, además de su efecto anovulatorio, actúa a otros niveles con la finalidad de explicar su efecto anticonceptivo cuando la progestina no inhibe la ovulación. El estudio fue diseñado con base en la experiencia previa de nuestro grupo en relación al establecimiento de la eficacia anovulatoria del LNG en el ciclo menstrual. Los resultados de este estudio, derivados del tratamiento con LNG durante la fase periovulatoria del ciclo (día LH-2), claramente demostraron la capacidad de la progestina de inhibir de manera significativa la amplitud del pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH), así como de las concentraciones circulantes de estradiol (E_2) y estrona (E_1) en esta fase del ciclo, sin afectar la secreción de progesterona (P_4) durante la fase lútea. Por otra parte, el tratamiento con LNG resultó en cambios

en el patrón de secreción de glicodelina (Gd) tanto en la circulación como en el tracto reproductivo. Estos cambios estuvieron caracterizados por la elevación de la Gd tanto en la circulación como en los fluidos uterinos obtenidos durante la fase periovulatoria y lútea temprana a diferencia de lo observado en el ciclo control. Estos resultados sugieren la participación de mecanismos de acción adicionales del LNG para ejercer su acción anticonceptiva en ausencia de efectos sobre la ovulación. Estos cambios se ubicaron principalmente a nivel de la síntesis de estrógenos por las células de la granulosa, así como a nivel endometrial sobre la expresión de genes responsivos a la P_4 .

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de la anticoncepción de emergencia

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud más de la mitad de los embarazos no deseados terminan en abortos provocados. Esta cifra asciende globalmente a 45.5 millones de abortos cada año, de los cuales 19-20 millones ocurren en condiciones de riesgo. Estos abortos ocasionan la muerte de aproximadamente 68,000 mujeres, y millones presentan complicaciones secundarias al procedimiento. El 97% de estas muertes ocurren en países en vías de desarrollo. Por otra parte, se estima que cada año se registran cerca de 600,000 muertes maternas causadas por complicaciones del embarazo y el parto. El embarazo no deseado y el aborto en condiciones de riesgo son dos problemas prevenibles que ocasionan gastos en salud importantes a nivel mundial (1). La anticoncepción de emergencia (AE) representa una alternativa para la prevención de embarazos no deseados que ocurren por falta de protección anticonceptiva regular, y por lo tanto se espera tenga impacto importante en la reducción de las tasas de abortos provocados y de la muerte materna. La AE se define como el uso de ciertos métodos anticonceptivos después del coito no protegido con la finalidad de prevenir la ocurrencia de embarazo. Un acto sexual sin protección se define como cualquier situación en la que no se utiliza un método anticonceptivo regular, o bien en aquellos casos de violación, falla u olvido del método (2).

1.2 Desarrollo de métodos de uso poscoital

Los primeros informes sobre el uso de un método anticonceptivo de emergencia consistieron en duchas vaginales poscoitales con Coca-Cola (3). El uso de estrógenos fue descrito en modelos animales en la segunda década del siglo pasado (4-6); sin embargo, no fue sino hasta los años 60's, del siglo pasado, cuando la anticoncepción hormonal poscoital se utilizó en seres humanos (7). La introducción de la AE como un método eficaz para la prevención de embarazos no deseados alcanzó su popularidad en los años 70's, conociéndose en los Estados Unidos de Norteamérica como el método de Yuzpe (8). Este método anticonceptivo consiste en la administración combinada de etinil estradiol y LNG dentro de las primeras 72 horas poscoito (9). A partir de 1980, y con la finalidad de disminuir los efectos secundarios derivados de la administración de dosis elevadas del componente estrogénico, la producción de píldoras anticonceptivas conteniendo únicamente LNG representa la nueva generación de preparaciones para uso poscoital (10-12). Por otra parte, y gracias al trabajo de investigación realizado durante los últimos 40 años en tecnología anticonceptiva, existen hoy en día nuevas alternativas en AE tales como los antagonistas del receptor de progesterona (mifepristona) (13), los nuevos antagonistas de la neurohormona liberadora de gonadotropinas hipofisarias (GnRH) (14), y recientemente el acetato de Ulipristal, un modulador selectivo del receptor de progesterona, y de eficacia similar al LNG (15).

1.3 Dosis y principio activo

El LNG es una progestina derivada de la 19-nortestosterona de segunda generación que actúa como agonista del receptor de progesterona (Figura 1) y es el componente activo de la AE de progestina sola. Su actividad progestacional la hace parte de varias formulaciones utilizadas en anticoncepción hormonal. La administración de LNG solo o en combinación con compuestos con actividad estrogénica ha sido utilizada exitosamente como anticonceptivo poscoital en diversos países. El método de progestina sola consiste en 0.75 mg de LNG poscoital administrados dentro de un periodo no mayor a 120 horas seguido de una dosis similar 12 horas después, o bien de una dosis única de 1.5 mg de LNG (13,14,16).

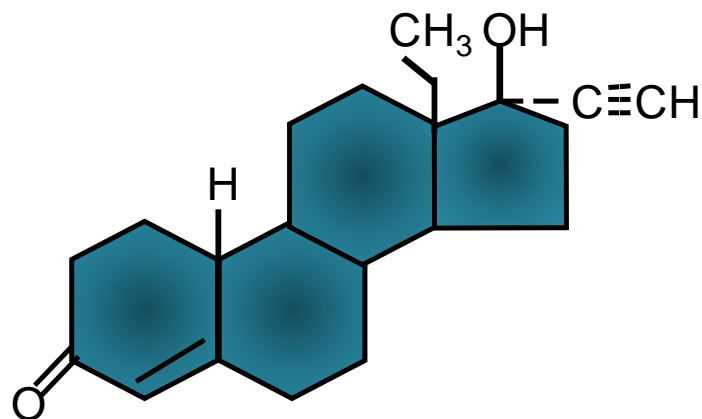


Figura 1. Estructura bioquímica del 13-etil-17 β -etinil-17 β -hidroxi-4-gonen-3-ona (LNG).

Este compuesto es biotransformado *in vivo* a otros metabolitos tetrahidro reducidos en el anillo A de la molécula con diversas actividades agonistas a nivel de los receptores para P₄ y estrógenos (Figura 2) (17).

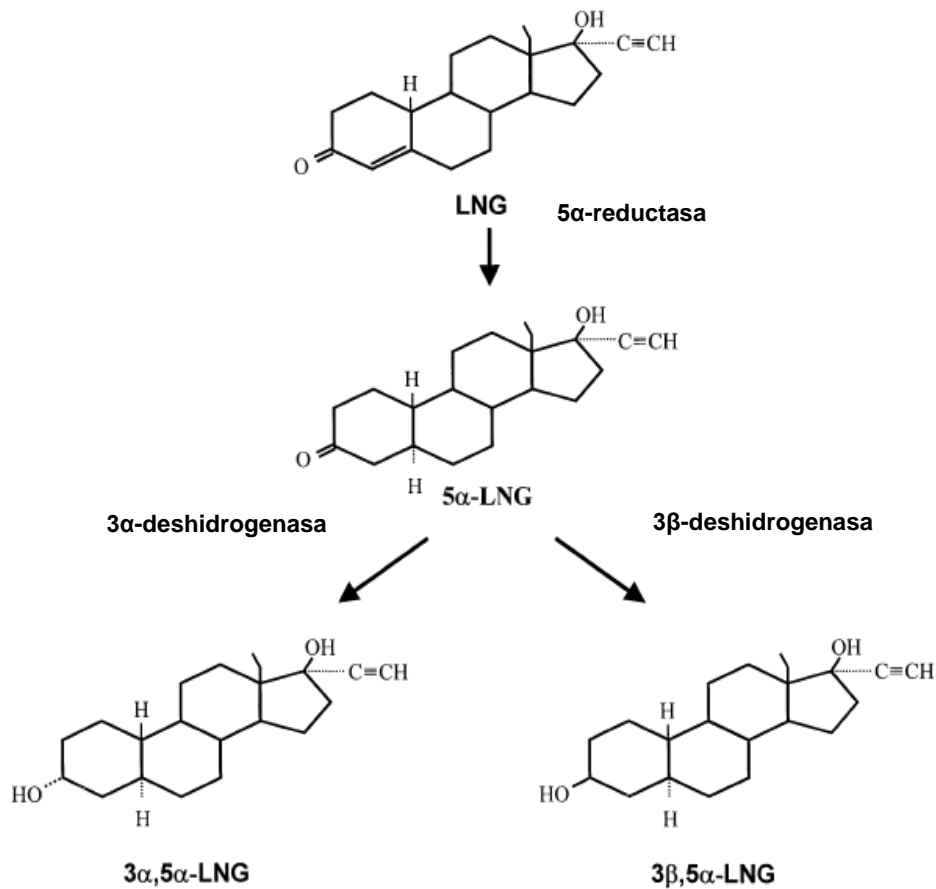


Figura 2. Biotransformación y estructura bioquímica de LNG y sus diferentes metabolitos reducidos en el anillo A de la molécula. 5α-dihidrolevonorgestrel (5α-LNG), 3α,5α- y 3β,5α-tetrahidrolevonorgestrel (3α,5α-LNG y 3β,5α-LNG). Tomado de Rocío-Becerra y cols. (17).

El LNG es una progestina sintética con elevada afinidad por el receptor de P₄. Su actividad biológica es considerablemente mayor a la de la P₄ natural a juzgar por estudios a nivel de la transcripción. En la figura 3 se muestran los patrones de respuesta transcripcional de genes reporteros con elementos de respuesta al receptor de P₄. Como puede observarse el uso de dosis equimolares

de LNG resulta en la activación de la transcripción génica 10 veces mayor que la obtenida con la P_4 natural (17).

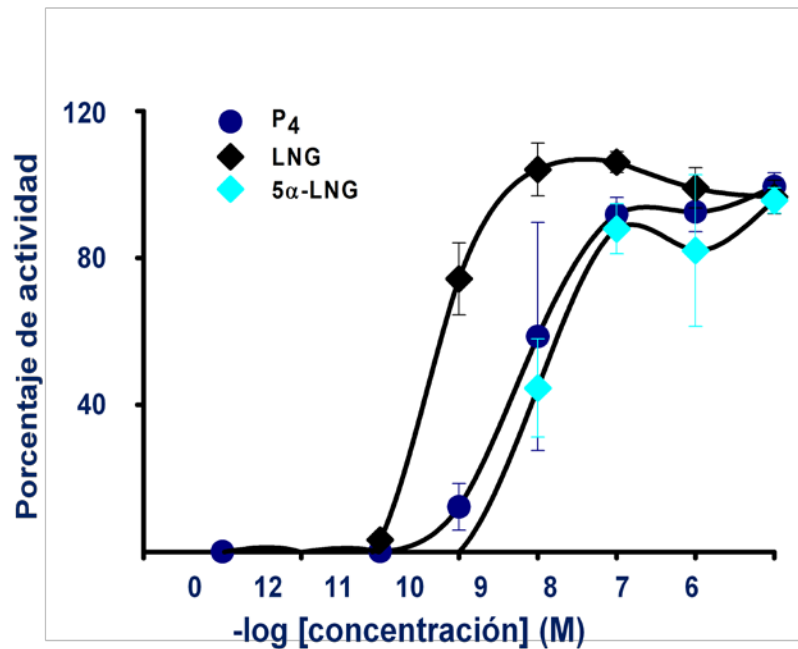


Figura 3. Actividad transcripcional del LNG vía el receptor de P_4 en un sistema de co-transfección en células HeLa con genes reporteros. El 100% de la actividad corresponde a la obtenida con la dosis de 1×10^{-9} M de P_4 . Tomado de Rocío-Becerra y cols. (17).

1.4 Efectividad y mecanismos de acción

La AE no es ni tampoco forma parte de los métodos de uso regular para el control de la fertilidad (16). La eficacia relativa de este método es del 85% comparada con la obtenida con los métodos combinados de uso regular (>99%) (9). La eficacia también depende del intervalo que existe entre el coito y su administración, entre mayor, menor es su efecto anticonceptivo (Figura 4). Sin embargo, la verdadera eficacia del método se desconoce ya que depende de estudios clínicos controlados con placebo, mismos que por sus características de

diseño no son éticamente recomendables (9, 13, 18). Existe evidencia clínica que indica que la administración de LNG después de las primeras 24 horas posteriores a la ruptura folicular no modifica la tasa de embarazos esperados (19). Esta observación concuerda con los estudios de Novikova y cols. (20) y Noé y cols. (21), los que demostraron que el efecto anticonceptivo del LNG se observó cuando la administración ocurrió durante la fase preovulatoria, y no así en la fase posovulatoria (Tabla 1). Estos hallazgos fueron calculados de acuerdo a las probabilidades de embarazo establecidas durante la ventana fértil del ciclo ovárico por Wilcox y cols. (19).

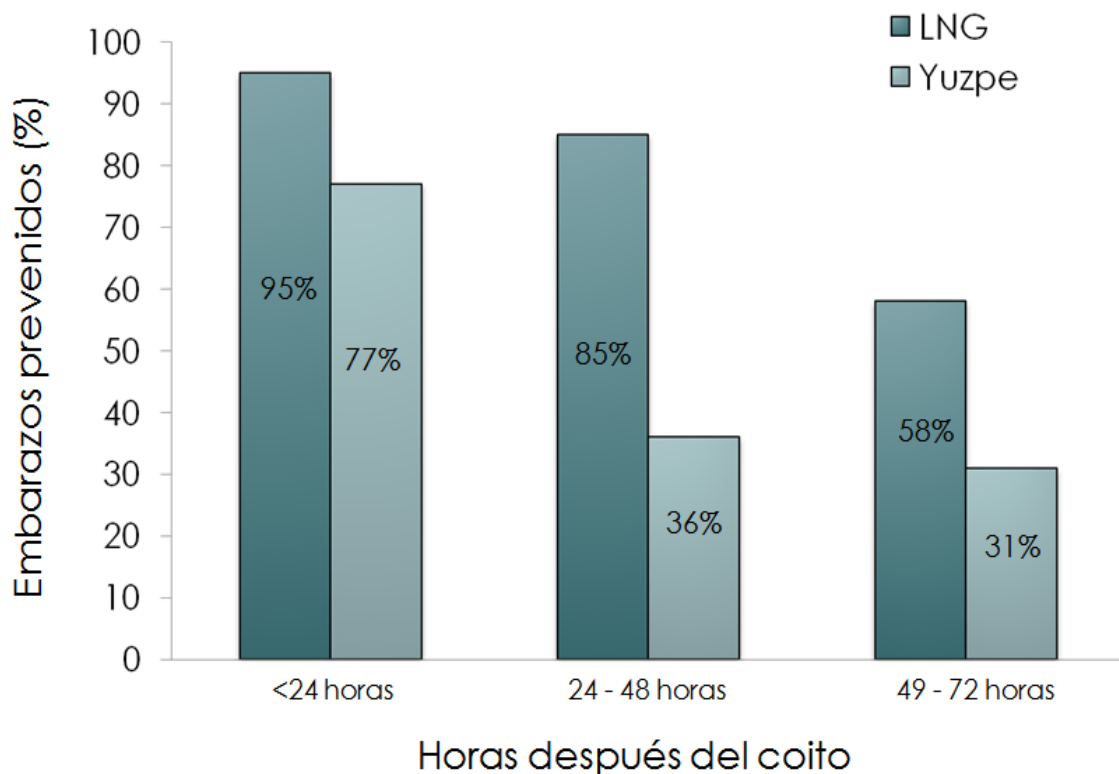


Figura 4. Relación entre la efectividad de la AE en sus dos modalidades combinada (Yuzpe) o de progestina sola (LNG) con el intervalo coito-tratamiento en horas (9).

Tabla 1. Efectividad del LNG administrado en las fases pre y posovulatoria del ciclo ovárico.

Días del coito con respecto a la ovulación (día 0)	No. mujeres en riesgo de embarazo	Administración de LNG	Número de embarazos esperados/observados	Efectividad
Novikova N. y cols. (ref. 20):				
Días -5 a -2	34	Preovulatoria	4.15/0	100%
Días -1 a 0	17	Posovulatoria	3.45/3	13%
Totales	51	Pre+Posovulatoria	7.60/3	60%
Noé G. y cols. (ref. 21):				
Días -5 a -1	87	Preovulatoria	13.2/0	100%
Días 0 a +1	35	Posovulatoria	7.1/6	13%
Totales	122	Pre+Posovulatoria	20.3/6	70%

En apoyo a estas observaciones, los estudios sobre los mecanismos de acción publicados por otros autores y por nuestro grupo (22-25), corroboraron que el efecto del LNG a la dosis recomendada para AE es la inhibición o el retraso de la ovulación, sin efectos significativos sobre la capacidad de migración y la penetración de los espermatozoides al ovocito, así como, alteraciones morfológicas y/o moleculares del endometrio. Los resultados obtenidos a partir de biopsias endometriales de mujeres que recibieron LNG tomadas durante la llamada ventana de implantación (día LH+9), demostraron la presencia de patrones histológicos de la morfología endometrial, así como sobre diferentes marcadores de receptividad endometrial evaluados por inmunohistoquímica similares a los observados en muestras obtenidas durante los ciclos control (23). Estos resultados sugieren que los efectos biológicos del LNG fueron similares si no idénticos a los producidos por la P₄ natural (Tabla 2) (22, 25). Estas evidencias se apoyan en las observaciones de Lalitkumar y cols., quienes

demonstraron en cultivos mixtos del estroma y células epiteliales del endometrio la ausencia de cambios en las tasas de adhesión del blastocisto en presencia de LNG a diferencia de lo observado con la mifepristona, un inhibidor selectivo del receptor de P₄ (26).

Tabla 2. Parámetros morfométricos y marcadores de receptividad endometrial en biopsias de endometrios de mujeres tratadas con LNG.

Parámetro morfométrico	Control (n=41) media ± DE	LNG (n=24) media ± DE
No. de glándulas/ mm ²	29.3 ± 6.3	28.5 ± 3.8
Porcentaje de edema estromal	52.7 ± 15.4	55.9 ± 12.1
No. de arterias espirales/campo	5.6 ± 3.1	4.5 ± 2.7
Marcadores de receptividad endometrial	Control (n=41) media ± EE*	LNG (n=24) media ± EE*
Integrina αv-β3	15 ± 5	19 ± 5
Mucina-1	140 ± 7	113 ± 9
Calcitonina	69 ± 8	47 ± 6
Factor inhibidor de la leucemia	36 ± 6	21 ± 4
Factor de crecimiento epidermal unido a la heparina	25 ± 4	21 ± 4
Factor de crecimiento epidermal vascular	89 ± 8	94 ± 8
Gene Hox-11	67 ± 10	56 ± 8

* Unidades de densidad óptica/1500μ₂. Tomado de Durand y cols. (22).

Estudios previos de nuestro laboratorio han identificado la presencia de una “ventana” muy estrecha dentro del ciclo menstrual donde la administración del LNG no afecta el proceso de la ovulación (25), en otros estudios, nuestro grupo demostró en mujeres tratadas con LNG durante la fase estrogénica tardía, la presencia de glicodelina (Gd) en suero en las fases periovulatoria y lútea temprana, a diferencia de los ciclos control (Figura 5), sugiriendo cambios en los patrones de secreción de proteínas endometriales cuya expresión se encuentra muy probablemente regulada bajo el efecto progestacional del LNG (27). Estos

resultados son importantes en el sentido que ofrecen alternativas adicionales para el estudio del efecto anticonceptivo del LNG cuando este no modifica el fenómeno de la ovulación.

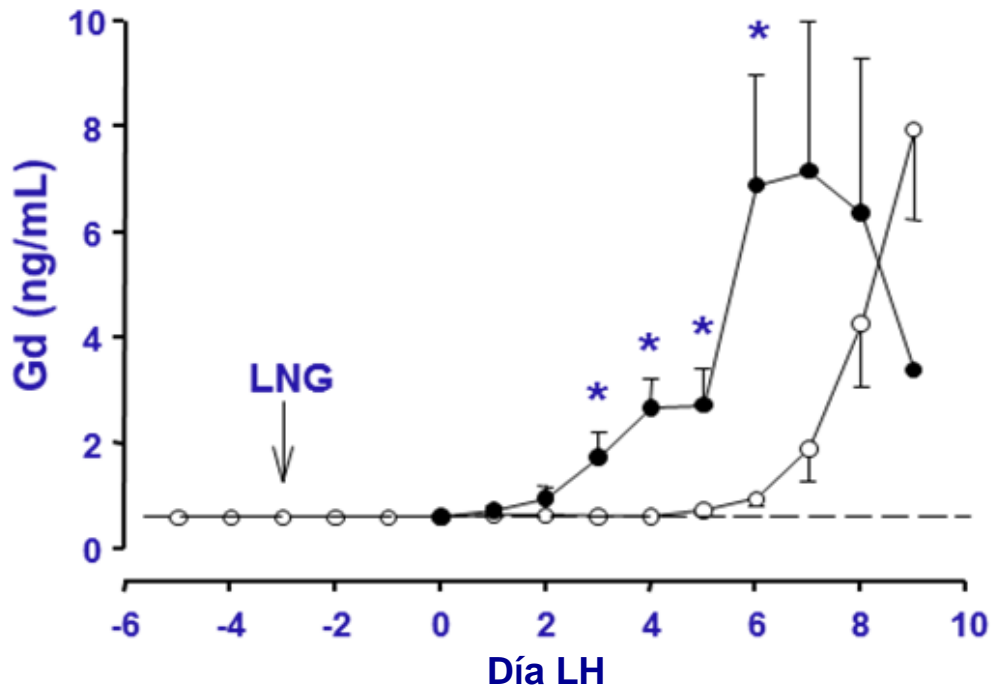


Figura 5. Concentraciones medias circulantes diarias de Gd durante la fase lútea de los ciclos control (○) y tratados con LNG (●) el día LH-3. Cada punto representa la media \pm DS. Los resultados fueron normalizados con respecto al día de la mayor secreción de la LH en suero (LH 0). * $p < 0.05$ vs ciclos control. Tomado de Durand y cols. (27).

1.5 Glicodelina en suero como marcador del efecto de la P_4 en el endometrio

La Gd es una glicoproteína que pertenece a la super-familia de las lipocalinas y que dependiendo de las modificaciones que ocurren en su molécula a nivel postraduccional se generan varias isoformas responsables de una variedad de acciones que ocurren a nivel reproductivo e inmunológico (28-30). La glicosilación de Gd varía significativamente de un tejido a otro confiriéndole

patrones de secreción y función diferenciales. La isoforma de origen endometrial llamada Gd-A, (28, 29) es una glicoproteína de estructura monomérica de 28-kDa y sintetizada por las células epiteliales del endometrio. La síntesis de esta proteína endometrial es regulada por la P₄ lútea (30). El grupo de Seppälä y cols. (31) y el nuestro (32) han identificado en ciclos ovulatorios la presencia de Gd en suero en mujeres durante la fase lútea, la cual ocurre inmediatamente posterior a la secreción máxima de P₄. Estos cambios no se observaron en el suero de mujeres con ciclos anovulatorios (Figura 6).

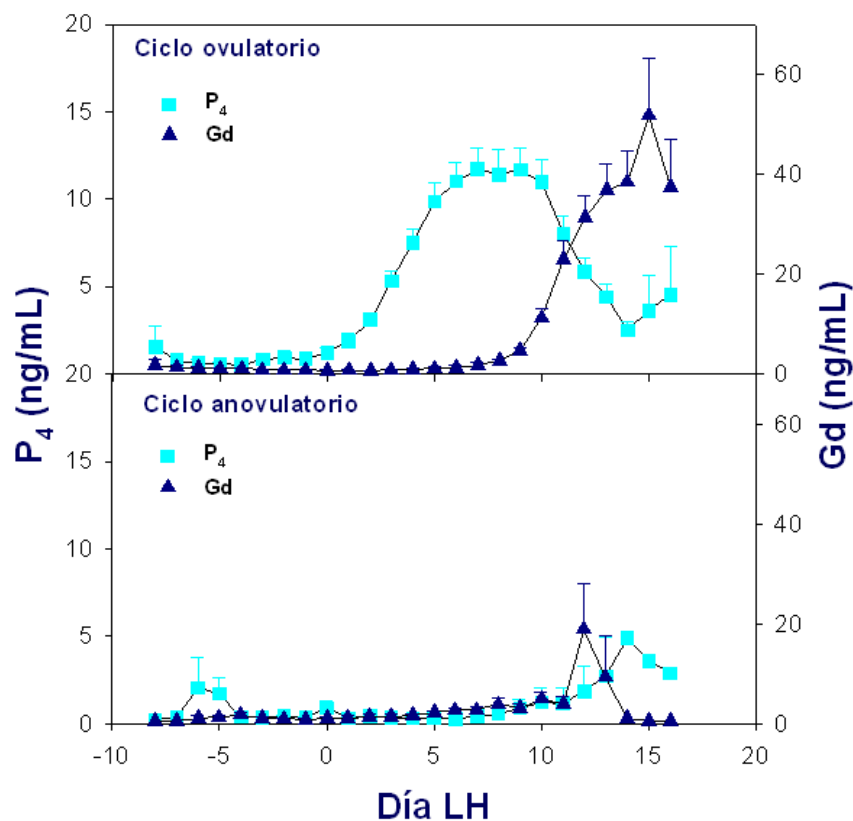


Figura 6. Concentraciones circulantes de Gd y P₄ lútea en mujeres ovulatorias y mujeres anovulatorias. Los resultados fueron normalizados tomando como día 0 la máxima secreción de la LH en suero. Tomado de Durand y cols. (32).

De manera interesante la Gd-A tiene propiedades inhibitorias sobre la interacción que ocurre entre ambas gametas, masculina y femenina, durante el proceso de la fecundación (33). Esta capacidad inhibitoria radica en la propiedad del espermatozoide de interactuar con Gd-A saturando los sitios de reconocimiento los que a su vez interactúan con las células del cúmulo ovárico (34-36). Como la expresión endometrial de la Gd se encuentra bajo la regulación de la P₄ lútea (30, 37, 38), ésta, durante la fase periovulatoria, se encuentra ausente tanto en el endometrio como en el resto del tracto reproductivo (30). El gene que codifica a esta proteína en el humano se localiza en el cromosoma 9q34, y su región promotora posee elementos de respuesta hormonal para glucocorticoides y P₄ (39, 40). La expresión de Gd-A, evaluada por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, ocurre entre 5 y 7 días posteriores a la ovulación y permanece hasta finales de la fase lútea (41). Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de Gd-A en suero es paralela y correlaciona significativamente con su contenido en el tracto reproductivo ($r=0.77$; $p<0.0001$) (42). De esta manera, la determinación de las concentraciones en suero de Gd-A refleja los cambios de esta proteína que ocurren a nivel endometrial e intrauterino y suelen ser utilizadas como marcadores del efecto de la P₄ sobre el endometrio.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de este estudio establece que la administración periovulatoria de LNG resulta, por su efecto progestacional, en el cambio del patrón temporal de secreción de la Gd endometrial durante el ciclo menstrual tanto en suero como en el tracto reproductivo femenino. La hipótesis nula establece que la administración de LNG no ocasiona cambios significativos en el patrón de secreción de Gd endometrial cuando se compara con el obtenido en el ciclo control.

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de Gd en suero y en el tracto reproductivo durante la fase ovulatoria y lútea tardía del ciclo ovárico de mujeres que permanecieron ovulatorias después del tratamiento con LNG. Los objetivos específicos de esta tesis fueron los relacionados con el estudio de los cambios hormonales a diferentes niveles del eje reproductivo de mujeres expuestas a la administración de LNG a las dosis utilizadas en anticoncepción de emergencia en la fase folicular tardía del ciclo menstrual.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Participantes

Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Todas las mujeres aceptaron participar voluntariamente, así como firmar la carta de consentimiento informado. Se reclutaron 30 mujeres sanas sin riesgo de embarazo con salpingoclasia bilateral (8 mujeres), pareja vasectomizada (1 mujer) o en abstinencia sexual (21 mujeres), entre los 22 y 37 años de edad (mediana de 30 años), con ciclos menstruales regulares con duración entre 25 y 34 días (29.2 ± 0.5 días). Todas las voluntarias negaron el uso de anticonceptivos hormonales u otra medicación en los últimos 6 meses previos al ingreso del estudio. Las participantes fueron mujeres sanas tanto por la historia clínica como a la exploración física, así como por estudios de laboratorio, incluyendo citología hemática completa, general de orina y citología cérvico-vaginal. Las variables de peso, talla y presión arterial fueron registradas por un mismo investigador al momento de su ingreso. A cada mujer se le solicitó el registro de sus sangrados menstruales durante el estudio.

3.2 Diseño del estudio

Se trata de un estudio clínico auto-controlado realizado en 30 mujeres sanas con función ovárica normal y sin riesgo de embarazo. Se estudiaron dos ciclos menstruales en cada mujer uno correspondió al ciclo control y el siguiente al

ciclo tratado con LNG. El ciclo menstrual se definió como el intervalo de tiempo que ocurre desde el primer día del sangrado menstrual hasta el día previo del siguiente periodo menstrual. El ciclo fue subdividido en varias fases. La fase folicular se consideró desde el primer día del sangrado hasta el día que ocurrió la máxima liberación de LH y la fase lútea, desde el final de la fase folicular hasta el día previo de la siguiente menstruación. Las mujeres fueron admitidas en el estudio durante los primeros 10 días del ciclo menstrual. En el ciclo tratado, las voluntarias recibieron 1.5 mg de LNG (Glanique, Asofarma de México, SA de CV) en dos dosis de 0.75 mg administradas con 12 horas de intervalo durante la fase preovulatoria del ciclo ovárico aproximadamente dos días antes del pico de liberación máxima de LH. En esta fase del ciclo, el diámetro folicular por ultrasonido vaginal (UTV) osciló entre 16 y 19 mm de diámetro. En ambas fases del ciclo, las voluntarias fueron instruidas para identificar a través de un análisis colorimétrico la presencia de LH en orina (LHu) a partir del día 11 del ciclo menstrual. Una vez identificada la presencia de LHu se llevó a cabo la monitorización diaria del crecimiento folicular por UTV hasta la ocurrencia de la ruptura folicular (RF). La RF por UTV se estableció por la presencia de por lo menos tres de los siguientes criterios: disminución o desaparición del diámetro y/o del folículo dominante, respectivamente, la presencia de bordes gruesos e irregulares y el incremento de la ecogenicidad del folículo y/o la presencia de líquido libre en la cavidad peritoneal (43). El análisis por UTV se realizó por el mismo observador con un equipo de Antares Sonoline Siemens (Siemens

Medical Solutions EUA, CA) adaptado con transductores de multifrecuencia de 5 y 7.5 Hz. Las mujeres que no presentaron durante el ciclo control la prueba positiva de LH_u y datos ultrasonográficos de RF fueron excluidas del estudio. Se tomaron muestras diarias de sangre total durante ambos ciclos del estudio durante la fase periovulatoria y lútea completa para la cuantificación de LH, E₂, E₁, P₄ y Gd. Las muestras de sangre fueron centrifugadas y almacenadas a -35°C hasta su procesamiento. La presencia de Gd-A en el tracto reproductivo se llevó a cabo en muestras de líquido uterino obtenidas durante la fase periovulatoria (LH+1) y lútea tardía (LH+12). Los líquidos uterinos se obtuvieron por lavados uterinos realizados previa administración de 400 mg de ibuprofeno (Advil, Wyeth SA de CV, México). Posterior a la exposición del cervix y limpieza del mismo con solución fisiológica, se insertó un catéter para inseminación (CORNE, SA de CV, México) en la cavidad uterina para gradualmente inyectar 10 mL de solución fisiológica y la aspiración de la misma con una jeringa de 20 cc. Este procedimiento se repitió tres veces con la finalidad de recuperar la mayor cantidad posible de muestra. Las muestras se almacenaron a -35°C hasta su análisis.

3.3 Cuantificaciones hormonales

La detección de LH_u se realizó con la prueba colorimétrica Ovuquick (CORNE SA de CV, México) (44). Las concentraciones de LH, E₂, E₁ y P₄ en suero y líquido uterino se cuantificaron por duplicado por métodos inmunoradiométricos (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) con

la metodología descrita previamente (23). Los coeficientes de variación inter-análisis fueron $<10\%$ para todas las hormonas y el de variación intra-análisis fue de 3.08% , 6.75% , 7.61% y 7.95% para LH, E_2 , E_1 y P_4 , a las concentraciones de 23.9 mUI/mL , 66 pg/mL , 30 pg/mL y 1.46 ng/mL , respectivamente. Las concentraciones de Gd en suero y líquido uterino se determinaron utilizando análisis inmunofluorométricos tipo sándwich descritos previamente (27, 32). Los coeficientes de variación intra e inter-análisis fueron de 7.2% y 5.2% , respectivamente. La concentración de Gd en suero y líquido uterino se expresó en ng/mL . La concentración de Gd-A en los líquidos intrauterinos se normalizó por la concentración de proteína expresada en mg/mL . Para evitar sesgos de medición, todas las muestras provenientes de la misma mujer fueron cuantificadas en el mismo análisis. Debido a que las variaciones en las concentraciones hormonales durante el ciclo ovárico es un fenómeno biológico muy variable e inclusive de ciclo a ciclo en un mismo sujeto, establecimos nuestros propios valores de referencia de las diferentes hormonas y de Gd a lo largo de los ciclos ováricos controles en la población estudiada. Dividimos el “ciclo ideal” de 28 días en fases establecidas. Para dividir el ciclo en las diferentes fases utilizamos el mismo criterio que en el estudio de Novikova y cols. (20). Los datos de cada hormona fueron normalizados tomando como día 0 el día de la máxima secreción de LH en suero. La fase folicular se subdividió en temprana (desde el primer día de la menstruación al día LH-9), media (desde el día LH-8 - LH-5) y tardía (desde el día LH-4 - LH-2). La fase peri-ovulatoria comprendió

del día LH-1 - LH+1, la fase lútea temprana (los días LH+2 - LH+4), la lútea media (los días LH+5 -LH+11), y la fase lútea tardía los días LH+12 hasta el día previo del siguiente periodo menstrual. Los resultados de estos valores de referencia expresados como la media \pm EE, así como los valores máximos de secreción de cada una de estas hormonas en las diferentes fases del ciclo se muestran en la Tabla 3. Basados en estos valores de referencia establecimos que el pico máximo de secreción de E₂ ocurrió entre los días LH-2 y LH-1 y la ocurrencia de la RF el día LH+1.

Tabla 3. Concentraciones hormonales durante el ciclo menstrual.

Fase del ciclo	LH mUI/mL		E ₂ pg/mL		P ₄ ng/mL		Gd ng/mL	
	Media \pm EE	V. max	Media \pm EE	V. max	Media \pm EE	V. max	Media \pm EE	V. max
Fase folicular:								
temprana	2.9 \pm 0.6	6.8	33.2 \pm 3.9	53.3	2.6 \pm 0.9	2.56	1.2 \pm 0.4	3.90
media	3.9 \pm 0.3	16.1	69.4 \pm 5.2	199.8	0.6 \pm 0.1	3.90	1.1 \pm 0.1	2.90
tardía	8.2 \pm 0.6	23.4	162 \pm 12	521.8	0.9 \pm 0.2	11.30	0.8 \pm 0.1	2.40
Fase peri-ovulatoria								
	27.8 \pm 2.9	87.60	155 \pm 14	618.8	1.5 \pm 0.3	13.0	0.7 \pm 0.1	1.50
Fase lútea:								
temprana	3.96 \pm 0.28	15.70	109 \pm 6	306.6	6.4 \pm 0.4	23.90	0.9 \pm 0.1	11.20
media	2.22 \pm 0.15	10.30	134 \pm 5	366.3	10.3 \pm 0.5	35.20	10.5 \pm 1.1	74.90
tardía	2.02 \pm 0.24	8.10	73 \pm 6	215.6	3.7 \pm 0.6	19.70	39.8 \pm 3.6	117.50

V. max: valor máximo.

3.4 Análisis estadístico

La secreción endometrial de Gd-A evaluada en líquido uterino durante la fase peri-ovulatoria y lútea tardía del ciclo fue el principal desenlace y objeto de este estudio, por lo que el análisis estadístico se planeó con base a este parámetro. El análisis estadístico comparó las diferencias entre las concentraciones en suero

diarias e integradas de Gd durante las fases periovulatoria y lútea completa entre los ciclos control y los ciclos tratados, así como las concentraciones periovulatorias y de la fase lútea tardía de Gd-A en líquido uterino. De la misma manera, el análisis comparó las diferencias entre las concentraciones periovulatorias en suero diarias e integradas de LH, E₂ y E₁, y las concentraciones lúteas de P₄.La RF, las características de los ciclos y los patrones de sangrado entre los ciclos control y tratados también fueron analizados. El análisis se realizó tanto en las mujeres que ovularon como en las que no ovularon posterior al tratamiento con LNG. Las concentraciones integradas para todas las hormonas fueron analizadas calculando el área bajo la curva (ABC) durante las fases periovulatoria y lútea de los ciclos control y tratados. Se utilizó la prueba de análisis de varianza ANOVA con pruebas Post-hoc o bien la prueba equivalente no paramétrica según el caso para determinar las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones hormonales tanto en suero como en líquido uterino, las características del ciclo y el desarrollo folicular en los ciclos del grupo control y en los ciclos de ambos grupos tratados. Las concentraciones intrauterinas de Gd-A en los ciclos control y tratados fueron comparadas utilizando la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Todos los valores fueron expresados en medias \pm EE. Finalmente, se realizaron análisis de regresión lineal para correlacionar las concentraciones periovulatorias de E₂ con los diámetros foliculares registrados durante los días LH-4 a LH+0.

4. RESULTADOS

4.1 Características clínicas

En este estudio participaron voluntariamente 30 mujeres sanas entre los 22 y 37 años de edad, con ciclos menstruales regulares para ser estudiadas durante un ciclo control (sin tratamiento) y un ciclo experimental (con tratamiento). Las características clínicas de las voluntarias se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características clínicas basales de los grupos estudiados.

	Ciclo control n = 30	ov-LNG† n= 20	anov-LNG† n=10	p
Edad (años)	30.0 ± 0.7 [22-37]	29.2 ± 0.9 [22-36]	31.6 ± 1.1 [27-37]	0.277
Paridad (embarazos)	1.9 ± 0.3 [0-5]	1.4 ± 0.3 [0-4]	2.9 ± 0.5* [0-5]	0.024
Peso (Kg)	67.7 ± 3.0 [50-105]	64.6 ± 3.2 [50-105]	74 ± 4.7 [57-92]	0.175
Talla (cm)	154.4 ± 1.0 [145-167]	154 ± 1.2 [145-166]	156 ± 2.1 [148-167]	0.725
IMC (Kg/m ²)	28.4 ± 1.1 [21-45]	27.4 ± 1.3 [21-45]	30.5 ± 2.1 [24-40]	0.342
Tensión arterial (mmHg):				
Sistólica	111 ± 1.8	113 ± 2.1	109 ± 3.5	0.614
Diastólica	73 ± 1.4	72 ± 1.7	75 ± 2.4	0.728
Método anticonceptivo durante el estudio (n (%)):				
Oclusión tubaria	8 (26.7)	4 (20)	4 (40)	0.364
Abstinencia sexual	21 (70)	16 (80)	5 (50)	
Vasectomía	1 (3.3)	0 (0)	1 (10)	

† Mujeres ov-LNG (mujeres ovulatorias tratadas con LNG), mujeres anov-LNG (mujeres anovulatorias tratadas con LNG). *p = 0.007 vs mujeres ov-LNG. Los resultados están expresados como la media ± EE, [rango].

La administración de LNG resultó en la inhibición de la ovulación en 10 de las mujeres a juzgar por la ausencia de LH_u con disminución significativa de la liberación de LH en sangre y de la P₄ con ausencia de datos por UST de la ocurrencia de RF. Debido a que no se observaron diferencias significativas relevantes en las características clínicas en las mujeres que ovularon y las que no ovularon, los 30 ciclos control fueron considerados como grupo de referencia. De los parámetros clínicos mostrados en la Tabla 4, sólo la paridad fue significativamente mayor en el grupo de anovulatorias tratadas con LNG (anov-LNG), sin embargo, esta diferencia no tuvo relevancia clínica para los fines de este estudio. Aún a pesar de que la media del índice de masa corporal (IMC) de las mujeres estudiadas mostraron valores de sobrepeso, todas las voluntarias tuvieron ciclos controles ovulatorios.

4.2 Efectos del LNG sobre las características hormonales del ciclo ovárico

Como se muestra en la Tabla 5, todas las mujeres presentaron ciclos controles ovulatorios normales de 25 a 34 días de duración, presencia de LH urinaria, concentración máxima preovulatoria de LH en suero de 41.2 ± 21.2 mUI/mL, concentración máxima preovulatoria de E₂ en suero de 213 ± 108 pg/mL, evidencia ultrasonográfica de ruptura folicular y fases lúteas de 9 a 18 días de duración. Las concentraciones máximas de P₄ en la fase lútea se observaron en el día LH+8.1 \pm 0.3 con una media del área bajo la curva de P₄ (P₄-ABC) de 81 ± 6.5 ng/mL en 11 días posteriores al pico en suero de LH. La Gd en suero se

encontró en los límites de sensibilidad del análisis en los ciclos control durante la fase preovulatoria (LH-2 a LH0) y la fase lútea temprana (LH+1 a LH+4) del ciclo. La administración de LNG modificó significativamente la duración de los ciclos ($p < 0.001$) a expensas del acortamiento de la fase lútea ($p < 0.001$). Tanto el día del ciclo, así como el diámetro mayor del folículo dominante el día que se detectó el colapso folicular por UTV fueron similares en el ciclo control comparado con el ciclo tratado en las mujeres que ovularon (ov-LNG) ($p=0.309$ y $p=0.570$, respectivamente). En el grupo de mujeres anovulatorias (anov-LNG), no se observó la RF.

Tabla 5. Características del ciclo ovárico control y tratado.

	Ciclo control n = 30	ov-LNG† n= 20	anov-LNG† n=10	p
Duración del ciclo (días)	29.2 ± 0.5 [25-34]	26.9 ± 0.5* [23-33]	23.8 ± 2.6* [14-41]	<0.001
Duración de la fase folicular (días)	15.5 ± 0.5 [11-22]	14.5 ± 0.6 [11-22]	16 ± 2.0 [6-29]	0.326
Duración de la fase lútea(días)	13.7 ± 0.3 [9-18]	12.5 ± 0.6* [9-20]	7.8 ± 1.2*‡ [4-12]	<0.001
Ruptura folicular(día del ciclo)	15.9 ± 0.5	15.2 ± 0.4	--	0.309
(mm de diámetro mayor)	16.7 ± 1.6	14.4 ± 5.1	--	0.570
Día de máxima secreción de:				
LH (día del ciclo)	15.5 ± 0.5	14.5 ± 0.5	16.0 ± 1.8	0.285
P ₄ (día LH)	8.1 ± 0.3	8.1 ± 0.3	--	0.922
Máxima secreción ovulatoria de:				
LH (mUI/mL)	41.2 ± 21.2	15.9 ± 8.9*	12.5 ± 12.1*	<0.001
E ₂ (pg/mL)	213 ± 108	98 ± 45*	113 ± 84*	<0.001
ABC- P ₄ lútea (ng/mL/11 días)	81 ± 6.5	78 ± 9.1	4.8 ± 2.3*‡	<0.001
ABC -Gd lútea (ng/mL/9 días)	8.7 ± 5.6	22.8 ± 3.2*	14.5 ± 3.3*	<0.001
Diámetro folicular (mm) el día de la administración de LNG	--	18.4 ± 0.4	16.8 ± 0.5	0.028
Administración de LNG (día LH)	--	-2.1 ± 0.4	-2.5 ± 0.6	0.877

La duración de la fase folicular fue calculada desde el primer día de sangrado y la fase lútea fue calculada a partir del día de la máxima secreción de LH en suero (LH0). † Mujeres ov-LNG (mujeres ovulatorias tratadas con LNG), Mujeres anov-LNG (mujeres anovulatorias tratadas con LNG). * $p < 0.05$ vs ciclo control. ‡ $p < 0.05$ vs mujeres ov-LNG. Los resultados están expresados como la media ± EE [rango].

4.3 Efectos del LNG sobre el desarrollo folicular

Como se muestra en la Figura 7, la RF ocurrió el día 2.7 ± 0.9 después del tratamiento. La administración de LNG no modificó la tasa de crecimiento folicular, incluyendo el día del ciclo en que ocurrió la RF al comparado con los ciclos control (15.2 ± 0.4 días vs 15.9 ± 0.5 días, respectivamente). La media del diámetro folicular el día de la toma del LNG fue similar a la observada en el ciclo control (17.8 ± 1.8 mm vs 18.2 ± 3.9 mm, respectivamente). Sin embargo, cuando se analizó en forma separada, en el grupo de mujeres ov-LNG el patrón de crecimiento fue similar al observado en el ciclo control mientras que la media del diámetro folicular fue significativamente menor en el grupo de mujeres anov-LNG al momento del pico máximo de secreción de LH en suero.

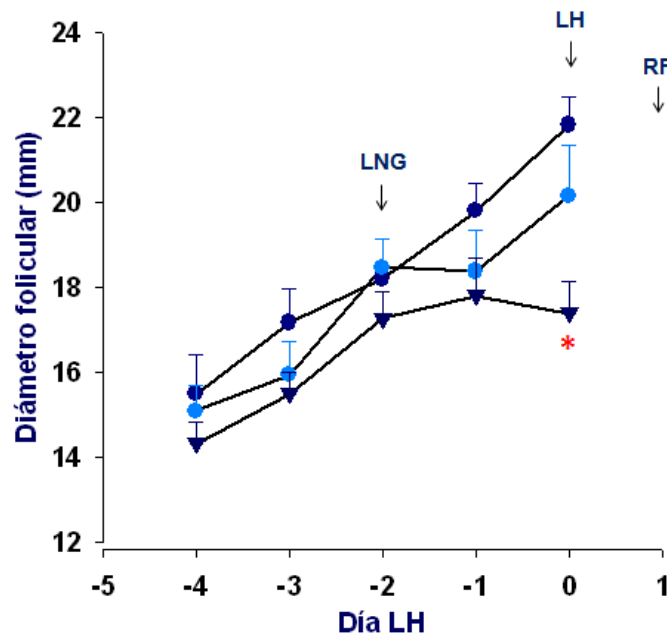


Figura 7. Diámetro folicular (mm) durante los ciclos control y tratado con LNG en las mujeres ovulatorias y anovulatorias. Ciclo control (●), ov-LNG (●), anov-LNG (▼). LH (día de la máxima secreción de LH en suero), RF: ruptura folicular. Los resultados están expresados como la media \pm EE. * $p < 0.05$ vs control

4.4 Efectos del LNG sobre los parámetros hormonales

El patrón de secreción de LH en los ciclos control y tratados, así como la media de las ABC en muestras de suero tomadas del día LH-3 a LH+3 se muestra en la Figura 8. El tratamiento con LNG resultó en la disminución significativa de la amplitud del pico preovulatorio de LH en suero, así como de las ABC de las concentraciones de LH obtenidas durante la fase estrogénica tardía, periovulatoria y lútea temprana en ambos grupos ov-LNG y anov-LNG. (Figuras 8A y 8B, respectivamente). A pesar de estos resultados, no se observaron diferencias en las concentraciones lúteas de E_2 en las mujeres del grupo ov-LNG comparadas con las del ciclo control (Figura 8C). La determinación de las concentraciones en suero de E_2 y E_1 se muestran en las Figuras 8C, 8D y 9, respectivamente. Como puede observarse las concentraciones de E_2 en los ciclos tratados fueron significativamente menores ($p < 0.05$) durante la fase ovulatoria comparadas con las obtenidas en los ciclos control. De manera similar, las determinaciones de E_1 en los ciclos tratados (Figura 9) fueron también significativamente menores ($p < 0.05$) durante la fase ovulatoria que las observadas en los ciclos control.

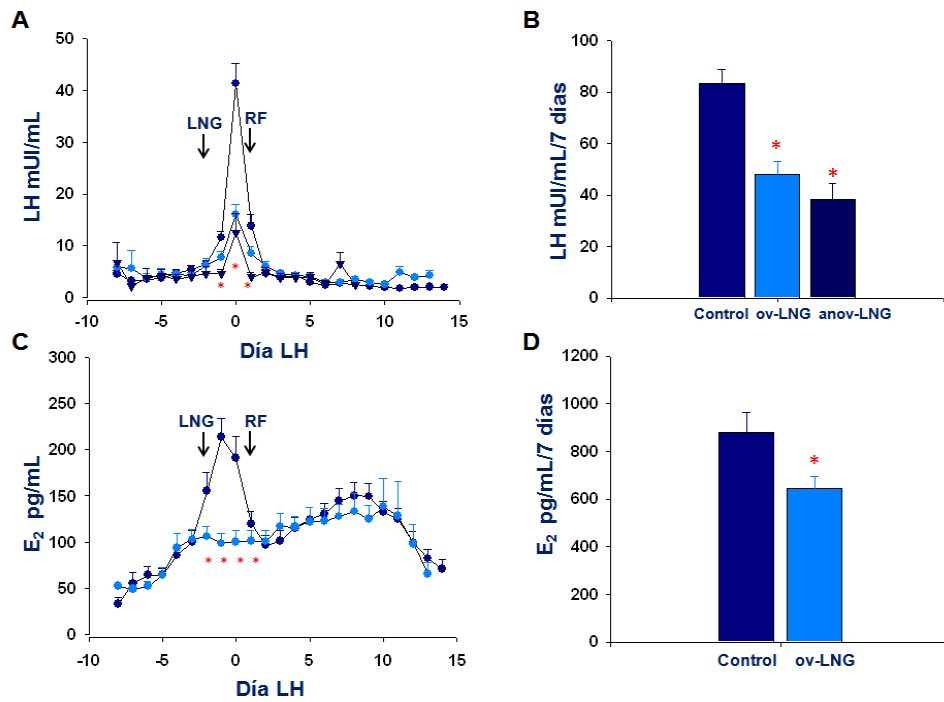


Figura 8. Concentraciones en suero de LH y E₂ en el ciclo control (●), ov-LNG (●) y anov-LNG (▼) RF: ruptura folicular. Los resultados están expresados como la media ± EE. *p<0.05 ov-LNG y anov-LNG vs control.

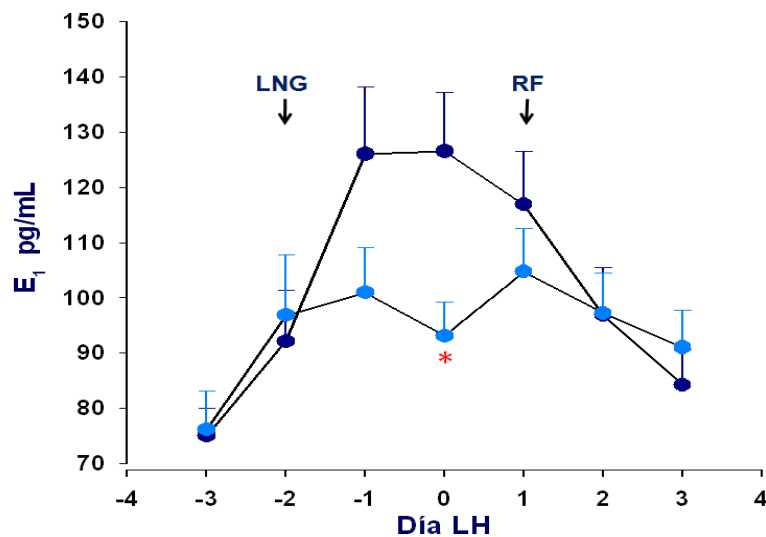


Figura 9. Concentraciones en suero de estrona. Ciclo control (●), ov-LNG (●), ruptura folicular (RF). Los resultados están expresados como la media ± EE. *p < 0.05 vs control.

El estudio de la correlación entre los diámetros foliculares con las concentraciones de E₂ en suero en los ciclos control mostró correlación positiva ($r=0.56$) y significativa ($p<0.0001$) durante los días LH-4 a LH+0. Esta correlación perdió significancia en los ciclos tratados ($r=0.21$, $p=0.09$); sin embargo, las medias de los diámetros foliculares no mostraron cambios significativos entre los ciclos tratados y controles (17.5 mm vs 18.9 mm, respectivamente), a diferencia de la media del ABC de las concentraciones de E₂ la que mostró diferencias estadísticamente significativas (880 ± 83.7 pg/mL vs 643 ± 51.5 pg/mL, respectivamente) (Figura 10).

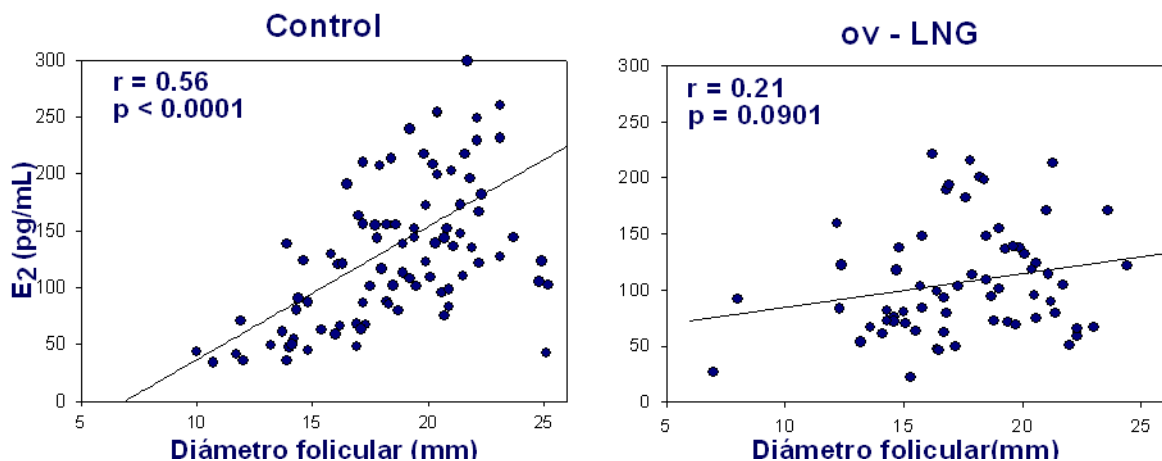


Figura 10. Correlación entre el diámetro folicular y las concentraciones circulantes de E₂ en los ciclos control y tratados con LNG.

Las concentraciones de P₄ en suero durante la fase lútea de los ciclos tratados tanto en las mujeres ov-LNG como anov-LNG se muestran en la Figura 11. Las mujeres que ovularon con LNG presentaron concentraciones de P₄ similares a las del ciclo control, mientras que las mujeres que no ovularon las concentraciones de P₄ lútea permanecieron en los límites de sensibilidad del

análisis. A pesar de este hallazgo, el tratamiento con LNG redujo significativamente la media de la duración del ciclo de las mujeres que ovularon vs la de los ciclos control (26.9 ± 0.5 días vs 29.2 ± 0.5 días, respectivamente; $p < 0.05$) a expensas de un acortamiento significativo de la duración de la fase lútea (12.5 ± 0.6 días vs 13.7 ± 0.3 días, respectivamente; $p < 0.05$) como se observa en la Tabla 5.

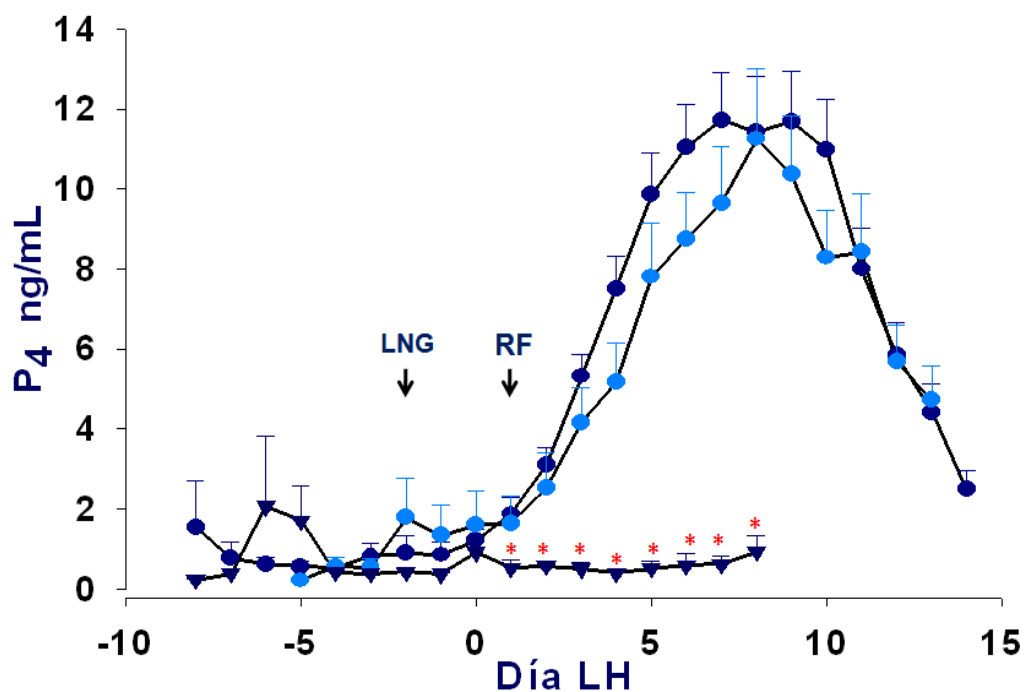


Figura 11. Concentraciones en suero de P₄. En el ciclo control (○) ov-LNG (●) y anov-LNG (▼) RF: ruptura folicular. Los resultados están expresados como la media \pm EE. * $p < 0.001$ vs control y ov-LNG.

4.5 Efectos sobre las concentraciones de Gd en suero y en el tracto genital

Como se muestra en la Figura 12, en los ciclos control las concentraciones máximas de Gd en suero se observaron durante la fase lútea tardía. La elevación

máxima ocurrió aproximadamente el día LH+15. El tratamiento con LNG en la fase preovulatoria del ciclo adelantó el patrón de secreción hacia la fase lútea temprana y lútea media a partir del día LH+2 (Figura 13A). La media de los valores del ABC de Gd (Figura 13B) fueron significativamente mayores comparada con la de los ciclos control (22.8 ± 3.2 ng/mL vs 8.7 ± 5.6 ng/mL, respectivamente; $p < 0.05$). Las concentraciones en suero de Gd en el grupo de mujeres que no ovularon incrementaron al igual que en las mujeres que ovularon con LNG (Figura 13A) a pesar de las bajas concentraciones de P_4 durante la fase lútea temprana como se muestra en la Figura 11.

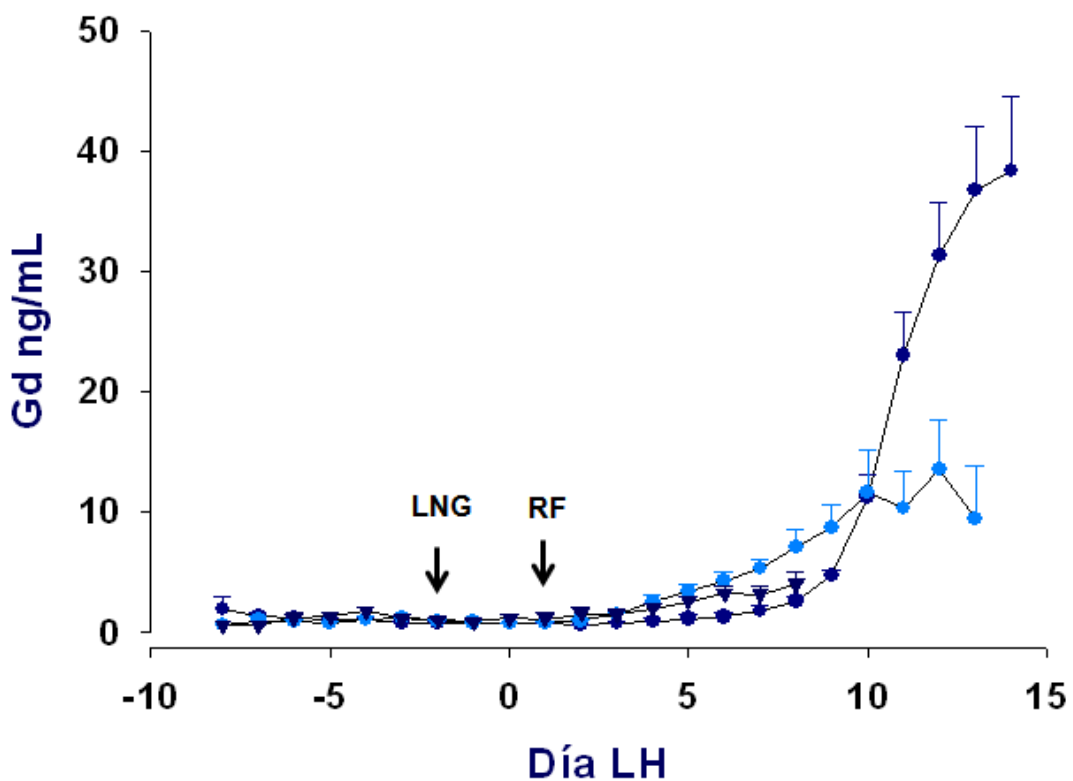


Figura 12. Concentraciones de Gd en suero durante el ciclo menstrual. Ciclo control (●), ov-LNG (●), anov-LNG (▼), RF: ruptura folicular. Resultados expresados como la media \pm EE.

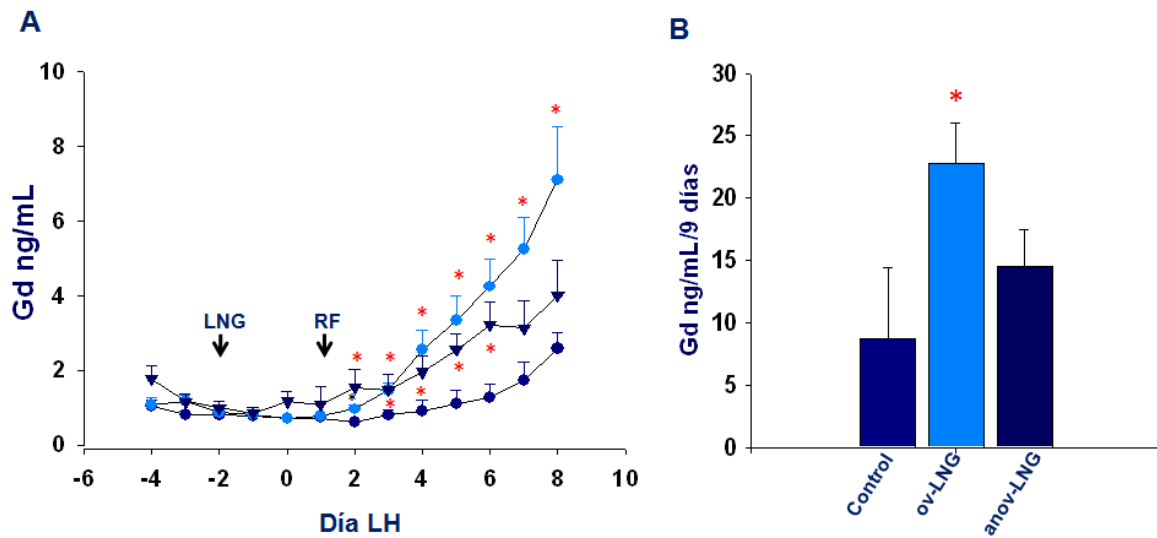


Figura 13. Concentraciones de Gd en suero durante la fase lútea temprana. Ciclo control (●), ov-LNG (●), anov-LNG (▼), RF: ruptura folicular. Los resultados están expresados como la media \pm EE. * $p < 0.05$ vs control.

Las concentraciones de Gd en los líquidos uterinos (Gd-A) obtenidas en los días LH+1 y LH+12 de ambos ciclos control y tratado en el grupo de mujeres ovulatorias se muestran en la Figura 14. En el panel A se observa que en los ciclos tratados con LNG, las medias de Gd-A en las muestras obtenidas el día LH+1, correspondiendo al día de la ruptura folicular y a tres días después de la administración de LNG, fueron significativamente mayores comparadas con las observadas en el ciclo control (17.7 ± 5.9 ng/mg de proteína vs 4.5 ± 0.99 ng/mg de proteína, respectivamente; $p = 0.019$). La media de las concentraciones de Gd-A en los líquidos uterinos tomados el día LH+12 en ciclos tratados con LNG fue menor pero estadísticamente no significativa cuando comparadas con la obtenida en los ciclos control (Figura 14B).

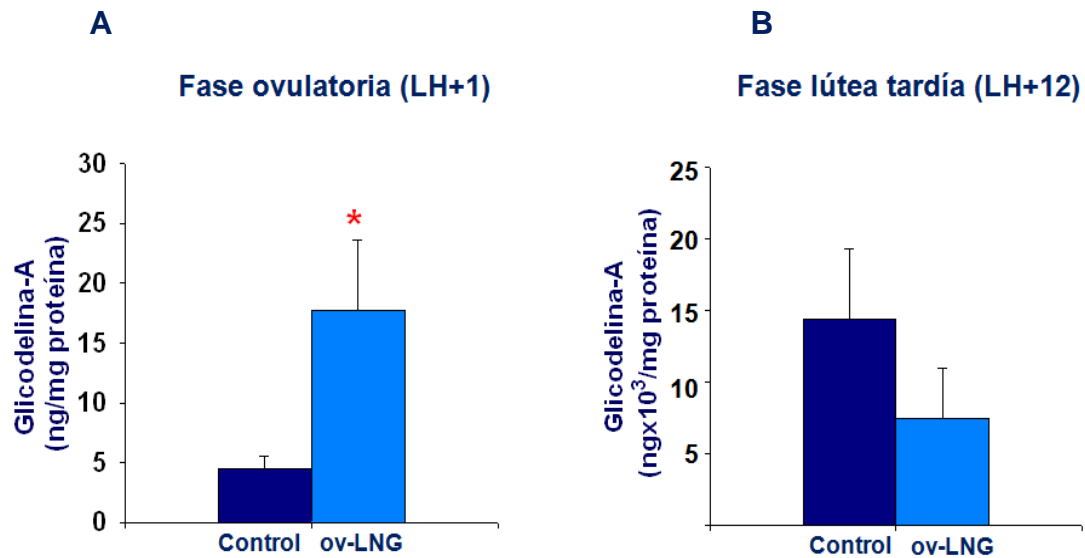


Figura 14. Concentraciones de Gd-A en los líquidos uterinos obtenidos en los días LH+1 y LH+12 (Panel A y B, respectivamente) tanto en los ciclos control como en el grupo ov-LNG. Los resultados están expresados como media \pm EE, * $p = 0.019$ vs control.

Las concentraciones de P_4 en los líquidos uterinos de las mujeres ov-LNG tomados en los días LH+1 y LH+12 se encontraron bajas y cercanas al límite de sensibilidad del análisis (<0.2 ng/mL) y sin cambios significativos comparadas con las obtenidas en los ciclos control. Las comparaciones entre el día LH+1 vs LH+12 tanto del grupo control como del tratado tampoco mostraron diferencias significativas (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones de P_4 en los líquidos uterinos.

Día del ciclo	Grupo control n = 30	ov-LNG† n= 20	p
LH+1	0.43 \pm 0.13	0.26 \pm 0.05	0.152
LH+12	0.58 \pm 0.26	0.32 \pm 0.10	0.355

† Mujeres ov-LNG (mujeres ovulatorias tratadas con LNG). Los resultados están expresados como la media \pm EE en ng/mg de proteína.

5. DISCUSIÓN

Este estudio se basó en experiencias previas de nuestro laboratorio sobre los efectos del LNG a nivel del eje reproductivo en la mujer (22, 23, 27). En estos estudios fue clara la relación que existe entre el día de la administración de la progesterina con la de sus efectos a nivel del proceso ovulatorio. En efecto, entre más cercana es la ovulación menor es el efecto del LNG para afectarla. Este estudio estuvo diseñado para que la administración del LNG no afectara la función ovulatoria y de esta manera poder investigar diferentes variables del ciclo como la tasa de crecimiento folicular, las características del pico preovulatorio de LH, la ocurrencia de ovulación y las características de duración de la fase lútea y de la secreción hormonal que la caracterizan, incluyendo otras variables como la determinación de las concentraciones en suero y líquido uterino de la Gd. Dentro de los hallazgos más interesantes de este estudio fue la observación de que la administración de LNG en una fase del ciclo, que de acuerdo a la determinación urinaria de la LH correspondía a la fase preovulatoria temprana (día LH-2), la tercera parte de los sujetos no presentaron ciclos ovulatorios. Esta observación puntualiza la imprecisión que existe entre los métodos cualitativos como marcadores del fenómeno ovulatorio comparados con otros como la cuantificación de la LH en suero o la estimación morfológica del desarrollo folicular durante el ciclo, que si bien no se recomiendan para su uso rutinario, sí son de importancia en estudios de investigación clínica. La observación en este estudio sobre las diferencias en el diámetro folicular al momento de la

administración de LNG en mujeres ovulatoria versus no ovulatorias confirma las imprecisiones arriba señaladas. Con este diseño experimental y aún en presencia de variables no esperadas como la inhibición de la ovulación, fue posible investigar, como objetivo principal en este estudio, la ocurrencia de cambios durante la fase periovulatoria del ciclo que pudieran explicar el efecto anticonceptivo del LNG en sujetos ovulatorios, tanto desde el punto de vista hormonal como morfológico. Uno de ellos y quizá el más importante fue la observación en las mujeres ovulatorias de la inhibición significativa de la amplitud y área bajo la curva de la descarga preovulatoria de la LH. Este hallazgo se acompañó de la ruptura del folículo y la presencia de un patrón de secreción de P_4 durante la fase lútea similar al observado en los ciclos control. Estos hallazgos sugieren que aun a pesar de la significativa disminución de la LH en suero durante la fase preovulatoria, los mecanismos responsables de la ruptura folicular y formación del cuerpo lúteo no sufrieron alteraciones. Estas observaciones indican que además de la elevación aguda de la LH existen otros factores involucrados y probablemente no alterados que participan en este fenómeno (45-49). Sin embargo, nuestros resultados sobre la significativa disminución de E_2 y E_1 durante la fase periovulatoria de mujeres tratadas con LNG sugiere fuertemente que la capacidad hormonal del folículo dominante para sintetizar cantidades adecuadas de estrógenos para esta fase del ciclo se encuentra significativamente disminuida, afectando muy probablemente también la calidad del ovocito expulsado y probablemente su capacidad reproductiva (50).

Por otra parte, el hallazgo de un patrón de secreción de estrógenos y P_4 similar al encontrado en los ciclos control sugiere que la diferenciación de la célula lútea depende sólo en parte del efecto luteinizante de la LH. Con relación a la disminución significativa de estrógenos durante el período periovulatorio, existe evidencia experimental que indica el importante efecto de la P_4 natural sobre la expresión de aromatasas en la célula de la granulosa (51). Estas observaciones permiten establecer el probable efecto de LNG, derivado de su actividad progestacional, sobre la expresión de aromatasas en el folículo ovárico durante la fase ovulatoria, alterando el patrón de secreción aguda de la LH en esta fase del ciclo. La observación, por otra parte, de la disminución también significativa de la E_1 apoya el concepto del efecto de LNG sobre las aromatasas sobre todo por la ausencia en el ovario de las enzimas responsables del metabolismo de E_2 a otros metabolitos como la E_1 , como la 17β -hidroxi esteroide deshidrogenasa tipo 2, la cual en otros tejidos como el endometrio y la glándula mamaria se encuentra bajo regulación de la P_4 natural (52). En apoyo de estas observaciones y como parte de nuestro objetivo principal, decidimos evaluar las correlaciones que existen entre el diámetro folicular y las concentraciones de estrógenos circulantes tanto durante el ciclo control como el tratado con LNG. Este análisis nos permitió establecer que a diferencia del diámetro folicular, las concentraciones de estradiol se encontraron significativamente menores que las observadas durante el ciclo control. Esta observación sugiere que la administración de LNG durante la fase periovulatoria (LH-2) no tuvo ningún

efecto significativo sobre los mecanismos responsables del adecuado desarrollo folicular a pesar de las diferencias significativas de la amplitud del pico preovulatorio de la LH durante la fase ovulatoria del ciclo tratado. Estos hallazgos están de acuerdo con el concepto de que el desarrollo folicular en las fases tardías del ciclo son independientes de las concentraciones de gonadotropinas y obedece más a un proceso relacionado con la expresión diferencial de factores de crecimiento que modifican el desarrollo y respuesta folicular a diferentes eventos hormonales que se suceden y conducen al fenómeno de la ovulación. Sin embargo, las diferencias observadas en las concentraciones de E_2 y E_1 circulantes, durante las fases periovulatorias de los ciclos control y tratado, nos permiten sugerir el efecto del LNG sobre la capacidad de biotransformación de estrógenos por la unidad teca-granulosa a nivel de la expresión de la aromatasa folicular. En efecto, una de las acciones de la P_4 natural son sus efectos a nivel transcripcional sobre la expresión de la aromatasa (51).

Este hallazgo por sí solo, explicaría satisfactoriamente el efecto anticonceptivo de LNG en la fase periovulatoria inmediata, en donde se pierde significativamente su efecto anovulatorio (23). En efecto en un estudio similar Croxatto y cols., sugirieron que parte de los mecanismos anticonceptivos del LNG, cuando se administra durante la fase periovulatoria, es la generación de una gameta femenina funcionalmente deficiente secundaria a la inadecuada estimulación por la LH hipofisaria (53). Estos resultados no esperados son

novedosos y de importancia para el conocimiento de los mecanismos de acción de la AE, y representan quizá la primera observación sobre el efecto del LNG durante los diferentes eventos que ocurren durante la fase fértil de ciclo, y sobre todo, sobre los mecanismos neuroendócrinos que ocurren a nivel de la unidad hipotálamo-hipófisis-ovario involucrados en el complejo fenómeno de la ovulación.

Este estudio, sin embargo, tuvo como objetivo principal establecer los cambios en los patrones de secreción de la Gd a nivel sanguíneo, así como en el tracto reproductivo en ciclos menstruales (fase ovulatoria y lútea temprana) de mujeres control y tratadas con LNG. La conocida y bien establecida dependencia de la expresión de Gd por P_4 a nivel endometrial fue el motivo por el cual se realizó este trabajo de tesis. La hipótesis experimental estableció que el LNG, por su actividad progestacional, ocasiona el incremento de las concentraciones de Gd de origen endometrial en el suero y el tracto genital. En efecto, estudios previos por este y otros grupos demostraron que la administración de LNG se acompaña de la presencia de Gd en la circulación a diferencia de los ciclos control (27). En estos casos la presencia de Gd ocurrió en la fase lútea temprana del ciclo menstrual a diferencia de los ciclos control en donde la mayor concentración de Gd se observó durante la fase tardía del ciclo y precedida del pico máximo de secreción de la P_4 . Estos hallazgos concuerdan con estudios previos realizados en mujeres que fueron tratadas con P_4 micronizada o portadoras de implantes subdérmicos o de dispositivos intrauterinos liberadores

de LNG (54-56) y apoyan que el efecto biológico del LNG es similar al de la P_4 natural. En este estudio, y de manera similar a los anteriores, la administración de LNG se acompañó de la es la elevación significativa de Gd circulante tanto en los ciclos ovulatorios como en los anovulatorios. Estos resultados sugieren que los cambios temporales durante el ciclo del patrón de secreción de Gd fueron secundarios al efecto de la progestina sintética y no al de la P_4 natural dada su ausencia en los ciclos anovulatorios. Estos resultados apoyan la naturaleza progestacional del LNG y sus efectos similares a los de la P_4 natural a nivel endometrial. Por otra parte, este estudio demostró, por primera vez, el aumento significativo de Gd en los líquidos uterinos de mujeres tratadas con LNG durante la fase periovulatoria. Este efecto se observó al momento de la ruptura folicular, en donde todavía las concentraciones de Gd en suero no mostraban cambios significativos con relación a los observados en los ciclos control. Estas observaciones sugieren que los cambios en la secreción de Gd en el tracto genital toman lugar de manera más temprana que las observadas en la circulación e indican que en caso de ovulación en los ciclos tratados con LNG, la Gd se encuentra presente y significativamente elevada en comparación con los ciclos no tratados. Independientemente de que estos resultados confirmen y apoyen la actividad progestacional de LNG y su capacidad de producir cambios a nivel transcripcional similares a los de la P_4 natural en el endometrio humano, los resultados de este estudio proporcionan una alternativa, además del efecto anovulatorio de LNG, para explicar su eficacia anticonceptiva cuando su efecto

anovulatorio es significativamente menor. La Gd en el tracto genital normalmente se encuentra ausente durante la fase fértil del ciclo, lo que aunado a otras evidencias experimentales que demuestran su interacción con el espermatozoide en el humano, sugiere que Gd tenga un papel regulador de la actividad fecundizante de la gameta masculina. En efecto, Oehninger y cols., y Seppala y cols., (31, 33, 36) han demostrado la actividad inhibitoria de Gd sobre los mecanismos de interacción de la gameta masculina con las proteínas que conforman a la zona pelúcida del ovocito humano. Esta propiedad, aunque demostrada *in vitro*, podría explicar de manera satisfactoria el efecto anticonceptivo de LNG en ausencia de su efecto anovulatorio. A este respecto, estudios recientes por nuestro laboratorio utilizando los líquidos uterinos obtenidos durante la fase periovulatoria de mujeres tratadas con LNG han demostrado, a diferencia de lo encontrado en líquidos uterinos de ciclos control, cambios en la fisiología espermática, sobre todo en relación a la tasa de reacción acrosomal espontánea, movilidad y capacitación (57, 58). Estos resultados apoyan fuertemente los efectos *in vitro* de la GdA; sin embargo, estudios recientes por Chiu y cols. (59) han demostrado el desplazamiento de GdA del espermatozoide cuando este interactúa con las células del cumulus del ovocito humano.

6. CONCLUSIONES

En este estudio se logró demostrar que los mecanismos de acción anticonceptiva del método de progestina sola como anticonceptivo de emergencia dependen del momento del ciclo en el cual se administra. Esta observación es de particular importancia dada su conocida eficacia anticonceptiva dependiendo de su relación temporal con la ocurrencia de la ovulación. En efecto las propiedades inhibitorias del LNG sobre la ovulación dependen del grado de desarrollo del folículo ovárico. Las implicaciones de estos resultados son relevantes dada la asociación entre la probabilidad de embarazo durante el ciclo y el efecto anovulatorio de la progestina sintética. En este estudio, parte de esta controversia sobre los mecanismos de acción anticonceptiva del LNG que difieren de los ya conocidos sobre la inhibición de la ovulación fue el motivo para la elaboración de la presente tesis de doctorado.

Los resultados de este estudio nos permitieron establecer que parte de los mecanismos de acción del LNG se ubican a nivel ovárico, particularmente sobre la expresión génica de la aromatasa folicular. Este efecto podría satisfactoriamente explicar los cambios a nivel neuroendócrino que conducen a la significativa disminución de la amplitud de la liberación aguda de la LH hipofisaria, y por consiguiente de la calidad del ovocito liberado. Por otra parte, estos cambios no modificaron la diferenciación, desarrollo y función del cuerpo lúteo a juzgar por el patrón de secreción de la P_4 , sugiriendo la integridad del componente endometrial como ya fue previamente descrito por nuestro

laboratorio. Por último, nuestros resultados sugieren que los cambios producidos por el LNG sobre el patrón de secreción y contenido intrauterino de Gd modifican la capacidad del espermatozoide para interactuar con la zona pelúcida del ovocito; sin embargo, no existen todavía estudios *in vivo* que así lo demuestren. Consideramos que este estudio contribuirá de manera significativa en proporcionar información basada en evidencias que sirvan de base para el diseño de futuras investigaciones con la finalidad de establecer los mecanismos de acción del LNG como anticonceptivo de emergencia o bien para el diseño de nuevas formulaciones anticonceptivas con base a modificaciones del medio hormonal durante los fenómenos de la RF y la fecundación.

7. REFERENCIAS

1. Grimes DA, Benson J, Singh S, et al. Unsafe abortion: the preventable pandemic. The Lancet Sexual and Reproductive Health Series, October 2006.
2. UNDP, UNFPA, WHO, World Bank, Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. Levonorgestrel for emergency contraception. Fact Sheet October 2005. www.who.int/reproductive-health.
3. Ellertson C. History and efficacy of emergency contraception: beyond Coca-Cola. *Fam Plann Perspect* 1996;28:44-8.
4. Parkes AS, Bellerby CW. Studies on the internal secretions of the ovary. II. The effects of injection of the oestrus producing hormone during pregnancy. *J Physiol* 1926;62:145-55.
5. Parkes AS, Dodds EC, Noble RL. Interruption of early pregnancy by means of orally active estrogens. *Br Med J* 1938;2:557-9.
6. Smith MG. On the interruption of pregnancy in the rat by the injection of ovarian follicular extract. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 1926;39:203-14.
7. Morris JM, Waganen G. Compounds interfering with ovum implantation and development. III. The role of estrogens. *Am J Obstet Gynecol* 1966;6:804-15.
8. Yuzpe AA, Thurlow HJ, Ramzy I, et al. Post coital contraception: a pilot study. *J Reprod Med* 1974;13:53-61.

9. World Health Organization. Task Force on Postovulatory Methods of Fertility Regulation. Randomized controlled trial of levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined contraceptives for emergency contraception. *Lancet* 1998; 352: 428-33.
10. Kovacs L, Seregely G, Szilagyi J. Investigation of the pregnancy preventive effect of postcoital d-norgestrel under special experimental conditions. *Honvedorvos* 1979;3-4:289-93.
11. Moggia A, Beauquis A, Ferrari F, et al. The use of progestogens as poscoital contraceptives. *J Reprod Med* 1974;13:58-61.
12. Ho PC, Kwan MSW. A prospective randomized comparison of levonorgestrel with the Yuzpe regimen in post-coital contraception. *Hum Reprod* 1993;8:389-92.
13. Von Hertzen H, Piaggio G, Ding J, et al. Low dose mifepristone and two regimens of levonorgestrel for emergency contraception: a WHO multicentre randomized trial. *Lancet* 2002;360:1803-10.
14. Glasier A. Emergency postcoital contraception. *N Engl J Med* 1997;337:1058-64.
15. Glasier AF, Cameron ST, Fine PM, et al. Ulipristal acetate versus levonorgestrel for emergency contraception: a randomized non-inferiority trial and meta-analysis. *Lancet* 2010;375:555-62.
16. Trussell J, Stewart F. The effectiveness of postcoital hormonal contraception. *Fam Plann Perspect* 1992;24:262-4.

17. García-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, et al. The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol* 2002;82:333-41.
18. Piaggio G, von Hertzen H, Grimes DA, et al. On behalf of the Task Force on Postovulatory Methods of Fertility Regulation. Timing of emergency contraception with levonorgestrel or the Yuzpe regimen. *Lancet* 1999;353:721.
19. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *N Engl J Med* 1995;333:1517-21.
20. Novikova N, Weisberg E, Stanczyk FZ, et al. Effectiveness of levonorgestrel emergency contraception given before or after ovulation- a pilot study. *Contraception* 2007;75:112-8.
21. Noé G, Croxatto HB, Salvatierra AM, et al. Contraceptive efficacy of emergency contraception with levonorgestrel given before and after ovulation. *Contraception* 2010;81:414-20.
22. Durand M, Larrea F, Schiavon R. Mecanismos de acción de la anticoncepción hormonal de emergencia: efectos del levonorgestrel anteriores y posteriores a la fecundación. *Salud Pública Méx* 2009;51:255-61.

23. Durand M, Cravioto MC, Raymond EG, et al. On the mechanism of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception* 2001;64:227-34.
24. Croxatto HB, Brache V, Pavez M, et al. Pituitary-ovarian function following the standard levonorgestrel emergency contraceptive dose or a single 0.75-mg dose given on the days preceding ovulation. *Contraception* 2004;70:442-50.
25. Suárez VJ, Zavala R, Ureta JM, et al. Efecto del levonorgestrel como anticonceptivo oral de emergencia en la ovulación, el endometrio y los espermatozoides. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2010;27:222-30.
26. Lalitkumar PGL, Lalitkumar S, Meng CX, et al. Mifepristone, but not levonorgestrel, inhibits human blastocyst attachment to an in vitro endometrial three-dimensional cell culture model. *Hum Reprod* 2007;22:3031-7.
27. Durand M, Seppälä M, Cravioto MC, et al. Late follicular phase administration of levonorgestrel as an emergency contraceptive changes the secretory pattern of glycodeilin in serum and endometrium during the luteal phase of the menstrual cycle. *Contraception* 2005;71:451-7.
28. Seppälä M, Bohn H, Tatarinov Y. Glycodeilins. *Tumor Biol* 1998;19:213-20.
29. Koistinen H, Koistinen R, Dell A, et al. Glycodeilin from seminal plasma is a differentially glycosylated form of contraceptive glycodeilin-A. *Mol Hum Reprod* 1996;2:759-65.

30. Kamarainen M, Riittinen L, Seppälä M, et al. Progesterone-associated endometrial protein, a constitutive marker of human erythroid precursors. *Blood* 1994;84:467-73.
31. Seppala M, Taylor RN, Koistinen H, et al. Glycodelin: a major lipocalin protein the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev.* 2002;23:401-30.
32. Durand M, Koistinen R, Chirinos M, et al. Hormonal evaluation and midcycle detection of intrauterine glycodelin in women treated with levonorgestrel as in emergency contraception. *Contraception* 2010;82:526-33.
33. Oehninger S, Coddington C, Hodgen G, et al. Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril* 1995;63:377-83.
34. Chiu PCN, Tsang HY, Chung MK et al. Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and capacitation of spermatozoa. *J Biol Chem* 2005;280:25580-9.
35. Chiu PCN, Koistinen R, Koistinen H et al. Zona binding inhibitory factor-1 from human follicular fluid is an isoform of glycodelin. *Biol Reprod* 2003;69:365-72.
36. Seppälä M, Koistinen H, Koistinen R, et al. Glycosylation related actions of glycodelin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations. *Hum Reprod Update* 2007;13:275-87.

37. Julkunen M, Koistinen R, Sjoberg J, et al. Secretory endometrium synthesizes placental protein 14. *Endocrinology* 1986;118:1782-6.
38. Waites GT, Wood PL, Walker RA, et al. Immunohistological localization of human secretory pregnancy-associated endometrial alpha-2 globulin (alpha-2 PEG) during the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 1988;82:665-72.
39. Vaisse C, Atger M, Potier B, et al. Human placental protein 14 gene: sequence and characterization of a short duplication. *DNA Cell Biol* 1990;9:401-13.
40. Van Cong N, Vaisse C, Gross MS, et al. The human placental protein 14 (PP14) gene is localized on chromosome 9q34. *Hum Genet* 1991;86:515-8.
41. Julkunen M, Koistinen R, Suikkari AM, et al. Identification by hybridization histochemistry of human endometrial cells expressing mRNAs encoding a uterine β -lactoglobulin homologue and insulin-like growth factor-binding protein-1. *Mol Endocrinol* 1990;4:700-7.
42. Li TC, Ling E, Dalton C, et al. Concentration of endometrial protein PP14 in uterine flushings throughout the menstrual cycle in normal, fertile women. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:460-4.
43. Batzer FR. Ultrasonic indices of ovulation. *J Reprod Med* 1986;31(suppl):764-9.
44. Miller PB, Soules MR. The usefulness of a urinary LH kit for ovulation prediction during menstrual cycles of normal women. *Obstet Gynecol* 1996;87:13-7.

45. Kainz C, Reinhaller A, Schneider B, et al. Development and influence of an endogenous serum luteinizing hormone surge after ovulation induction in stimulated cycles. *Gynecol Endocrinol* 1994;8:227-32.
46. Robker RL, Akison LK, Russell DL. Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression. *Nucl Recept Signal* 2009;7:e012.
47. Li Q, Jimenez-Krassel F, Bettgowda A, Ireland JJ, et al. Evidence that the preovulatory rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle. *J Endocrinol* 2007;192:473-83.
48. Hibbert ML, Stouffer RL, Wolf DP, et al. Midcycle administration of a progesterone synthesis inhibitor prevents ovulation in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1897-901.
49. Stouffer RL, Xu F, Duffy DM. Molecular control of ovulation and luteinization in the primate follicle. *Front Biosci* 2007;12:297-307.
50. Verpoest VMJA, Cahill DJ, Harlow CR, et al. Relationship between midcycle luteinizing hormone surge quality and oocyte fertilization. *Fertil Steril* 2000;73:75-7.
51. Andric N, Ascoli M. Mutations of the lutropin/choriogonadotropin receptor that do not activate the phosphoinositide cascade allow hCG to induce aromatase expression in immature rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2008;285:62-72.

52. Yang S, Fang Z, Gurates B, et al. Stromal PRs mediate induction of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in human endometrial epithelium: a paracrine mechanism of inactivation of E₂. *Mol Endocrinol* 2001;15:2093-105.
53. Croxatto HB, Fuentealba B, Brache V, et al. Effects of the Yuzpe regimen, given during the follicular phase, on ovarian function. *Contraception* 2002;65:121-8.
54. Seppälä M, Ronnberg L, Karonen SL, et al. Micronized oral progesterone increases the circulating level of endometrial secretory PP14/ β -lactoglobulin homologue. *Hum Reprod* 1987;2:453-5.
55. Mandelin E, Koistinen H, Koistinen R, et al. Levonorgestrel-releasing intrauterine device-wearing women express contraceptive glycodelin A in endometrium during midcycle: another contraceptive mechanism? *Hum Reprod* 1997;12:2671-5.
56. Mandelin E, Koistinen H, Koistinen R, et al. Endometrial expression of glycodelin in women with levonorgestrel-releasing subdermal implants. *Fertil Steril* 2001;76:474-8.
57. Chirinos M, Durand M, González-González ME, et al. Efectos de la administración periovulatoria de LNG sobre la expresión de proteínas endometriales que afectan la fertilización: Un nuevo mecanismo de acción de la anticoncepción de emergencia. Encuentro Académico del Fondo Sectorial de Investigación en Salud. Boletín Informativo de la Comisión Coordinadora

de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad, Mayo 9, 2011.

58. Chirinos M, Durand M, González-González ME, et al. Efectos de la administración preovulatoria de levonorgestrel a dosis anticonceptivas de emergencia sobre la secreción de Glicodelina endometrial y sus efectos sobre la función espermática. Memorias del I Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, Acapulco, Gro. Suplemento Noviembre, 2010. Trabajo No. 2, pp 41.
59. Chiu PCN, Chung M-K, Koistinen R, et al. Cumulus oophorus-associated glycodelin-C displaces sperm-bound glycodelin-A and -F and stimulates spermatozoa-zona pellucid binding. *J Biol Chem* 2007;282:5378-88.

8. ANEXOS

Trabajos publicados relacionados con el tema de tesis:

1. Durand M, Seppälä M, Cravioto MC, Koistinen H, González-Macedo J, and Larrea F. Late follicular phase administration of levonorgestrel as an emergency contraceptive changes the secretory pattern of glycodeclin-A in serum and endometrium during the luteal phase of the menstrual cycle. *Contraception* 2005;71:451-7. (Este trabajo proporcionó el fundamento para el proyecto presentado para el ingreso al doctorado).
2. Durand M, Larrea F, Schiavon R. Mecanismos de acción de la anticoncepción hormonal de emergencia: efectos del levonorgestrel anteriores y posteriores a la fecundación. *Salud Pública Méx* 2009;51:255-61.
3. Durand M, Koistinen R, Chirinos M, Rodríguez JL, Zambrano E, Seppälä M, and Larrea F. Hormonal evaluation and midcycle detection of intrauterine glycodeclin in women treated with levonorgestrel as in emergency contraception. *Contraception* 2010;82(6):526-33.

Trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales relacionados con el tema de tesis:

1. Durand M, Cravioto MC, Castell-Rodríguez A, Larrea F. Expresión endometrial de genes y proteínas reguladas por progesterona posterior a la administración de levonorgestrel a dosis de anticoncepción de emergencia. X Encuentro Nacional de Investigadores. Coordinación General de los

- Institutos Nacionales de Salud. Programa Científico y Resúmenes de Trabajos del X Encuentro Nacional de Investigadores, Trabajo 3, pp8. Acapulco, Gro. Octubre, 2005.
2. Durand M, Rodríguez JL, Chirinos M, Cravioto MC, Larrea F. Mecanismo de acción de la anticoncepción de emergencia: Efectos del levonorgestrel sobre la secreción de glicodelina. XLVI Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, Trabajo 55, pp 77 de la Revista de Endocrinología y Nutrición. Veracruz, Ver. Octubre, 2006.
 3. Durand M, Rodríguez JL, Chirinos M, Cravioto MC, Seppala M, Larrea F. Efectos de la administración de levonorgestrel sobre la secreción de glicodelina, una proteína endometrial con actividad antifertilizante. XX Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH). Trabajo CL.11, pp 56 de la Revista Medicina Buenos Aires Vol.67 Supl.1. Buenos Aires, Argentina. Abril, 2007. Mención al mejor trabajo de la Reunión en el Área Biomédica.
 4. Chirinos M, Durand M, Rodríguez JL, González González ME, Larrea F. Mecanismo de acción de la anticoncepción de emergencia: efectos sobre la movilidad espermática. XX Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH). Trabajo CL.10, pp 56 de la Revista Medicina Buenos Aires Vol.67 Supl.1. Buenos Aires, Argentina. Abril, 2007.

5. Chirinos M, Durand M, Rodríguez JL, González-González ME, Larrea F. Mechanisms of action of emergency contraception: effects on sperm motility. Gordon Research Conferences on Fertilization and Activation of Development. Presentación de Poster, Sesión 1. Universidad de Pennsylvania, USA, Julio, 2007.
6. Durand M, Chirinos M, Cano F, Rodríguez JL, Cravioto MC, Larrea F. El levonorgestrel induce la secreción de glicodelina en el tracto reproductivo de la mujer durante la fase ovulatoria. Congreso Nacional Anual de la Asociación de Médicos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Suplemento de La Revista de Investigación Clínica. Taxco Guerrero, México. Sesión Plenaria II, Octubre, 2008.
7. Durand M, Koistinen R, Chirinos M, Cano F, Cravioto MC, Seppälä M, Larrea F. Levonorgestrel induces premature intra-uterine glycodeilin secretion during the fertile window. Second Congress of the Asia-Pacific Council on Contraception (APCOC). Presentación de Cartel, Macau, China, Diciembre, 2008. Libro de resúmenes Trabajo 10, pp A-22.
8. Cano FJ, Chirinos M, Durand M, González-González ME, Cravioto MC, Larrea F. Efectos de la anticoncepción de emergencia sobre la función espermática. XXI Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH). Sao Paulo, Brasil, Abril 21-24, 2009.

9. Chirinos M, Durand M, González-González ME, Cano FJ, Rodríguez JL, Seppälä M, Larrea F. Mechanisms of action of emergency contraception: effects on sperm function. *Frontiers in Reproduction (FIR)*, Twelfth Annual Symposium. Woods Hole MA, USA, 11-13 Junio, 2009.
10. Durand M, Koistinen R, Chirinos M, Seppälä M, Larrea F. El levonorgestrel induce secreción de glicodelina en el tracto reproductivo de la mujer durante la fase ovulatoria del ciclo menstrual. XLIX Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, Trabajo 77, pp 68 de la Revista de Endocrinología y Nutrición. Monterrey, NL. Noviembre, 2009.
11. Durand M, Koistinen R, Chirinos M, Rodríguez JL, Zambrano E, Seppälä M, Larrea F. Mecanismos de acción de la anticoncepción de emergencia: Evaluación hormonal y patrón de secreción intrauterina de glicodelina durante la fase ovulatoria del ciclo en mujeres tratadas con levonorgestrel a dosis anticonceptivas de emergencia. Libro de resúmenes del Encuentro Académico del Fondo Sectorial de Investigación en Salud. México, D.F., Agosto, 2010. (Publicado en el Boletín Informativo de la Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad, Marzo 21, 2011).
12. Chirinos M, Durand M, González-González ME, Larrea F. Efectos de la administración periovulatoria de LNG sobre la expresión de proteínas endometriales que afectan la fertilización: Un nuevo mecanismo de acción

de la anticoncepción de emergencia. Libro de resúmenes del Encuentro Académico del Fondo Sectorial de Investigación en Salud. México, D.F., Agosto, 2010. (Publicado en el Boletín Informativo de la Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad, Mayo 9, 2011.

13. Chirinos M, Durand M, González-González ME, Larrea F. Efectos de la administración preovulatoria de levonorgestrel a dosis anticonceptivas de emergencia sobre la secreción de glicodelina endometrial y sus efectos sobre la función espermática. L Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, Trabajo 2, pp 41, Suplemento de la Revista de Endocrinología y Nutrición. Acapulco, Gro. Noviembre, 2010.

Tesis dirigida durante el periodo del doctorado relacionada al tema de tesis.

Tesis: Hallazgos ultrasonográficos del ciclo menstrual durante un ciclo control y uno tratado con anticoncepción de emergencia.

Alumno: Rosaura Eugenia Fuentes Corona.

Sede: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Radiología e Imagen.

Institución: División de Estudios de Posgrado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Grado obtenido: Médico Especialista en Radiología e Imagen, Generación 2005-2008.

Premios y distinciones otorgados durante el periodo del doctorado.

1. Mención al mejor trabajo presentado en el Área Biomédica de la XX Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH). Buenos Aires, Argentina. Abril, 2007.
2. Premio Dr. Alfonso Rivera otorgado por la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología durante la Reunión anual celebrada en Noviembre, 2010.
3. Obtención de la distinción de Investigador Nacional Nivel I durante el periodo de Enero 1, 2011 a Diciembre 31, 2013.
4. Nombramiento como Profesora Adjunta del Curso de Especialización en Biología de la Reproducción Humana con Sede en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, otorgado por el Consejo Técnico de la Facultad de Medicina, División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México, Mayo 24, 2011.
5. Proyecto aprobado para financiamiento en la Convocatoria 2011-01 del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT (No. 161834).