



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI



**“COMPARACIÓN DE LOS MARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN
LAS MUJERES MEXICANAS USUARIAS DE PARCHE E IMPLANTE
ANTICONCEPTIVOS”**

**Tesis para obtener el grado de
Médico especialista en Patología Clínica**

PRESENTA

Dr. Juan Carlos Sánchez Serrano

Director de tesis:

Dr. Abraham Salvador Majluf Cruz

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
I. INTRODUCCIÓN	6
JUSTIFICACIÓN	17
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
OBJETIVO GENERAL	19
HIPÓTESIS	19
II. MATERIAL Y MÉTODOS	20
A. Universo de trabajo	20
B. Tipo de estudio	20
C. Descripción de las variables	20
D. Descripción operacional de las variables	20
E. Selección de muestra	20
E1. Tamaño	20
E2. Grupo de estudio	21
E3. Criterios de inclusión	21
E4. Criterios de no inclusión	21
E5. Criterios de exclusión	22
F. Procedimiento	22
G. Ensayos de laboratorio	23
H. Análisis estadístico	24
III. RESULTADOS	25
IV. DISCUSIÓN	27
V. CONCLUSIONES	30
VI. CONSIDERACIONES ÉTICAS	31
VII. BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AO	Anticoagulantes orales
AT	Antitrombina
CAMS	Moléculas de adhesión de células solubles
E-	Endotelial
EE	Etinilgestradol
ELAM-1	Molécula de adhesión leucocito endotelial
ETV	Enfermedad tromboembólica venosa
FcR	Receptores Fc
FDA	Administración de drogas y alimentos
HGR	Hospital General Regional
IA	Implante anticonceptivo
IAM	Infarto agudo al miocardio
IC	Infarto cerebral
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
L-	Leucocitaria
NGMN	Norelgestromina
P-	Plaquetaria
PA	Parche anticonceptivo
PAF	Factor activador de plaquetas
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
TEP	Tromboembolia pulmonar
TF	Factor tisular
Tm	Trombomodulina
tPA	Activador tisular del plasminógeno
TVP	Trombosis venosa profunda
UIM	Unidad de investigación médica
UMF	Unidad médica familiar
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
vWF	Factor de Von Willebrand

RESUMEN

El endotelio es una monocapa de células que cubre los vasos sanguíneos en el cuerpo, tiene un papel principal en la regulación de la presión sanguínea y está involucrado directamente e indirectamente en los mecanismos de la coagulación, fibrinólisis, proliferación celular, adhesión plaquetaria y leucocitaria. Cuando el endotelio es disfuncional, se conduce a vasoconstricción, trombosis, sobrerregulación de moléculas de adhesión de células solubles (CAMs), adherencia leucocitaria, secreción aumentada de citoquinas y quimiocinas. La disfunción endotelial, es considerada como un precursor para la aterogénesis que se asocia con un alto riesgo de eventos aterotrombóticos y eventualmente produce complicaciones que dan como resultado eventos cardiovasculares.

La asociación entre trombosis y los anticonceptivos orales fue notada por primera vez en los 60's. Desde entonces se conoce su asociación con las trombosis arteriales y venosas, mismas que representan la primera causa directa de muerte en todo el mundo.

Conforme la investigación y tecnología han mejorado en el ámbito médico, se han creado diferentes alternativas de anticoncepción, y aunque ya están bien documentados los efectos trombóticos con el uso de anticonceptivos orales, aún falta evidencia específica con las nuevas alternativas de anticoncepción hormonal. Por lo tanto decidimos estudiar en mujeres mexicanas usuarias de parche o implante anticonceptivo el comportamiento de los marcadores de disfunción endotelial (E-selectina, VCAM-1, vWF y PAI-1) para conocer mediante su expresión cuantitativa los efectos positivos y/o negativos de dichos anticonceptivos hormonales en la población femenina en México.

MÉTODOS: Se procesaron 50 muestras de usuarias de terapia hormonal anticonceptiva, 25 con parche anticonceptivo y 25 con implante anticonceptivo. Las muestras se recolectaron de mujeres mexicanas derechohabientes del IMSS, Hospital General Regional No. 1, Carlos Mc Gregor Sánchez Navarro, se determinaron PAI-1, vWF, VCAM-1 y E-selectina por ELISA. Se utilizó una t-pareada o Wilcoxon para establecer diferencias en los parámetros analizados antes y después del uso del anticonceptivo. **RESULTADOS.** En las usuarias de parche anticonceptivo, observamos una disminución significativa de los niveles plasmáticos de vWF ($p=0.02$) y E-selectina ($p=0.022$) a los 4 meses con el método hormonal. No observamos diferencia significativa en los niveles de PAI-1 y VCAM. En cuanto a las usuarias de Implante anticonceptivo, no observamos diferencia significativa para ninguna de las variables en estudio. **CONCLUSIONES** No hubo asociación con trombosis en la expresión de marcadores de disfunción endotelial con terapia hormonal anticonceptiva.

INTRODUCCIÓN

El endotelio es una monocapa de células que cubre todos los vasos sanguíneos en el organismo. Provee una interface entre la sangre circulante y el músculo liso subyacente. El endotelio tiene un papel principal en la regulación de la presión sanguínea y de la circulación mediante la continua regulación del tono vascular (1). Esto se logra por la producción y liberación balanceada y oportuna de los factores de relajación endoteliales, ya sea, óxido nítrico, prostaciclina, o factor endotelial derivado hiperpolarizado, así como autacoides contráctiles derivados del endotelio, tales como, endotelina-1, tromboxano A₂, angiotensina II, o anión superóxido (2). Además, el endotelio involucra muchas otras funciones, incluyendo la coagulación sanguínea, fibrinólisis, proliferación celular, adhesión plaquetaria y leucocitaria.

La activación endotelial es una respuesta inmunológica e inflamatoria que promueve la expresión de novo de las moléculas de adhesión leucocitaria, la secreción de citosinas pro-inflamatorias, la elaboración de quimiocinas, la inducción de novo de moléculas procoagulantes, y la elicitación de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T (3-7).

Los monocitos y los linfocitos aparecen en la vecindad de las células endoteliales activadas y alojan los receptores Fc (FcR), exponiéndose en la membrana basal. Se extravasan mediante la interacción de selectinas e integrinas y se activan por el ligamiento de FcR a los depósitos de complejos inmunes (8-9).

La activación endotelial representa una alteración endotelial reversible como rearrreglos morfológicos, inducción de nuevas funciones pero sin pérdida de la integridad endotelial. El fenotipo de activación endotelial puede revertirse a un

fenotipo quiescente o no activo. No obstante el proceso de activación celular si no fuera controlado progresaría a apoptosis endotelial, en contraste; la apoptosis representa una lesión endotelial irreversible, fragmentación del endotelio y separación de las células endoteliales de la íntima (3, 10-13).

La disfunción endotelial puede manifestarse como un desequilibrio entre los factores de relajación y contracción, mediadores anticoagulantes y procoagulantes, sustancias que promueven o inhiben el crecimiento, etc., involucra la disrupción de su función vasoactiva en la regulación de la perfusión tisular, además juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la presión sanguínea elevada (14). Podemos definir la disfunción endotelial como una discapacidad en alguna de las funciones normales de las células endoteliales conduciendo a vasoconstricción, trombosis, sobrerregulación de moléculas de adhesión de células solubles (CAMs), secreción aumentada de citoquinas y quimiocinas, y adherencia leucocitaria, entre otros. La disfunción endotelial es considerada como un precursor para la aterogénesis, y esta también asociada con un alto riesgo de eventos aterotrombóticos y por consiguiente, sería la conexión entre los factores de riesgo y la aterosclerosis. Así, la restauración de la función normal del endotelio es una meta terapéutica altamente deseable (15-17).

El proceso de activación endotelial que origina la disfunción endotelial y lesión endotelial evidentemente involucra una serie de eventos inmediatos y retardados. La disfunción endotelial con lesión celular irreversible puede ser producida por una activación celular persistente o crónica no controlada. La activación celular crónica puede expresar niveles críticos de moléculas de adhesión endotelial,

vasodilatadores, citosinas, quimiocinas, vasculitis, trombosis y/o necrosis endotelial y otras lesiones de pared endotelial (18-20).

Un proceso crónico y el aumento del daño a las paredes arteriales eventualmente producen complicaciones que dan como resultado eventos cardiovasculares. La estimulación nociva prolongada daña la integridad vascular a través del tiempo que modifica el equilibrio endotelial hacia la lesión y falla progresiva de los mecanismos reparadores. Se ha demostrado que en los adolescentes obesos los marcadores de disfunción endotelial como la proteína C reactiva y CAMs se asocian con estados tempranos de aterosclerosis. Por lo que estos factores sugieren fuertemente que la disfunción endotelial es una de las anormalidades fisiopatológicas seminales en la aterosclerosis y su detección pueden ser usados como marcadores tempranos de la enfermedad aterotrombótica (15).

Las moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las selectinas, están compuestas por 3 proteínas llamadas de acuerdo a sus fuentes. E- (endotelial), P- (Plaquetaria), L- (Leucocitaria) (21).

La E- selectina, molécula que involucra nuestro estudio, se conoce también como CD62E, ELAM-1 (molécula de adhesión leucocito-endotelial). Se expresa en la superficie de las células endoteliales activadas, in vivo refleja las alteraciones de la función endotelial (5,22). Se considera un marcador específico de la activación y disfunción endotelial. Se han observado niveles altos de E-selectina en pacientes que tuvieron un evento tromboembólico, este incremento puede indicar cambios en el fenotipo endotelial y en la inflamación (23-26).

La molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) es una molécula que participa en la relación y coordinación de eventos de adhesión entre los leucocitos

y el endotelio activado. Promueve una firme adhesión para la subsecuente migración leucocitaria a través del endotelio. Los niveles aumentados de VCAM-1 e ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1) reflejan que el endotelio está activado (27). No obstante, son también expresadas en células dendríticas, linfocitos y macrófagos, pudiendo ser liberadas cuando éstas son activadas. Por consiguiente los títulos elevados de estas moléculas solubles pueden reflejar activación endotelial o activación de otras células efectoras inmunes (28-29).

La familia de los factores endoteliales que promueven la trombosis o fibrinólisis incluye a la trombomodulina (Tm), activador tisular del plasminógeno (tPA), heparán sulfato, antitrombina (AT) y moléculas pro-coagulantes como la trombina, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), factor de von Willebrand (vWF), factor tisular (TF) y factor activador de plaquetas (PAF) (4,5).

La actividad anticoagulante (antitrombótica) y procoagulante (protrombótica) están en equilibrio en el endotelio quiescente. En la activación endotelial, el equilibrio entre pro-coagulantes y anticoagulantes se favorece a los primeros. La pérdida de moléculas anticoagulantes y la síntesis de moléculas procoagulantes en la activación endotelial incrementan el riesgo de trombosis (5,30).

En la activación endotelial tipo I se pierden moléculas anticoagulantes (Heparán sulfato, Tm, tPA, etc.), mientras que, en la activación endotelial tipo II hay síntesis de novo de moléculas procoagulantes [PAI-1, vWF, PAF, etc.] (3,30).

La actividad del sistema fibrinolítico depende de la formación de plasmina a partir de plasminógeno por efecto de t-PA, que a su vez es inhibida por PAI-1. La activación endotelial disminuye la expresión de tPA e incrementa la de PAI-1 por lo que favorece el incremento del riesgo de trombosis. Así, los niveles elevados de

PAI-1 se consideran como un bio-marcador de activación endotelial (3). Además, se ha demostrado que los niveles aumentados de PAI-1 están fuertemente asociados con dislipidemia, hipertensión, peso corporal, hiperglucemia y la hiperinsulinemia (15,31).

El vWF es una glicoproteína sintetizada por el endotelio y los megacariocitos, tiene una larga estructura multimérica constituida por más de 80 subunidades de 250 kDa cada una. Juega un papel indispensable en la adhesión plaquetaria a las paredes dañadas del endotelio, de este modo inicia la formación de coágulos y/o trombos. Se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade en el endotelio y en los gránulos de las plaquetas. El vWF almacenado se secreta en el plasma después de la activación endotelial o plaquetaria (26-31).

El vWF incrementado se presenta en la activación y/o lesión endotelial (26,39) y puede participar en el desarrollo de eventos aterotrombóticos (40). De hecho, los niveles altos de vWF se han asociado con un incremento de riesgo para enfermedad cardiovascular, enfermedad cerebrovascular isquémico e Infarto al miocardio (35, 38).

Se han detectado células endoteliales circulantes en condiciones fisiológicas o patológicas que podrían considerarse como marcadores de activación, daño y/o disfunción endotelial. Dichas células expresan marcadores de activación endotelial como la E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, además moléculas procoagulantes como TF y vWF (25, 41-43).

Trombosis. La trombosis es una obstrucción local del flujo de la sangre en algún vaso sanguíneo, arterial o venoso, y que provoca que los tejidos y células irrigados por ese vaso sufran. Si el insulto se prolonga, se produce una lesión celular

irreversible que puede afectar a cualquier órgano o región del cuerpo. Dependiendo de factores hemodinámicos, el trombo se forma por proporciones variables de fibrina y plaquetas y otros elementos celulares como glóbulos rojos y blancos.

Las consecuencias clínicas de una trombosis incluyen desde múltiples y diversas complicaciones agudas o crónicas que pueden dejar secuelas graves y discapacitantes hasta la muerte del individuo. Las complicaciones de la trombosis se originan también por el consumo de elementos hemostáticos o por el desprendimiento y embolización del material trombótico (45). En el caso de un émbolo venoso, éste puede viajar sin obstáculos por la circulación venosa hasta generar una tromboembolia pulmonar (TEP). Por esto es que el término actual para la trombosis venosa es enfermedad tromboembólica venosa (ETV), ya que toda trombosis venosa profunda (TVP) de la circulación venosa sistémica puede provocar TEP. Casi siempre, toda TEP es secundaria a una TVP.

La causa de la tendencia a sufrir una trombosis, fenómeno también llamado trombofilia, se puede identificar sólo en algunos pacientes (45,46). Trombofilia es toda situación en la que está latente la posibilidad de que se formen trombos arteriales o venosos (47,48). El término se usó por vez primera en 1937 para designar una enfermedad asociada con trombosis venosa, considerándose como un antónimo de la hemofilia (49).

Virchow postuló tres situaciones que predisponen a la ETV aunque hoy sabemos que esto también explica la trombosis arterial: daño endotelial, cambios en las características del flujo sanguíneo y alteraciones procoagulantes en la sangre como las que inducen los anticonceptivos hormonales. La alteración de alguno de

sus componentes o su desequilibrio provoca la aparición de un estado protrombótico (50). Dentro de la triada, el componente de los factores sanguíneos permite un estado trombofílico si se desequilibra la actividad de los mecanismos procoagulantes y anticoagulantes naturales. Así, la trombosis es consecuencia de una activación desbordada de la hemostasia que sobrepasa los mecanismos de regulación. Las deficiencias moderadas o leves de las proteínas anticoagulantes pueden producir una trombosis.

La lesión endotelial activa la hemostasia por diversas interrelaciones complejas entre el flujo sanguíneo, la pared vascular y el sistema de coagulación. La alteración de estos mecanismos o su desequilibrio, provoca la aparición de una trombofilia (50). Como ya se mencionó, el flujo sanguíneo es uno de los principales mecanismos anticoagulantes del organismo. El movimiento continuo de sangre evita la acumulación de factores hemostáticos y plaquetas activados en un sitio específico. Además, es necesario para mantener la fuerza de rozamiento del endotelio arterial o venoso, un factor clave para mantener la funcionalidad endotelial adecuadamente. La estasis sanguínea, especialmente la venosa, debida a cualquier circunstancia, es uno de los mecanismos fisiopatológicos que más fácilmente explican la aparición de una trombosis.

Los factores hemodinámicos determinan las características clásicas de los trombos arteriales o venosos. En las arterias, la sangre circula a una gran velocidad y sometida a una presión muy alta. Los trombos arteriales se forman sobre todo en vasos que tienen una placa ateromatosa o que están expuestas a una zona de turbulencia importante (como suele suceder en las bifurcaciones arteriales). Debido a este entorno hemodinámico, el trombo arterial se forma

principalmente de plaquetas con una discreta malla de fibrina lo que le da el aspecto típico de trombo blanco (47). Por el contrario, el trombo venoso se genera en vasos en los que la velocidad y presión de la sangre son muy bajas. En las piernas, la ETV se inicia en torno a las válvulas venosas en las que existen turbulencias de la sangre. Si disminuye la velocidad del flujo se generan cambios en el sistema de coagulación como activación plaquetaria y de la fase fluida con la consecuente caída de los anticoagulantes naturales y de la fibrinólisis. Durante los traumatismos o en otro tipo de lesión de los tejidos, se liberan sustancias tromboplásticas y activación de la fase fluida y de las plaquetas. Por lo tanto, de los componentes de la triada, el daño vascular no es tan importante mientras que la estasis venosa y la hipercoagulabilidad son cruciales. Esto determina que en estos trombos la malla de fibrina, abundante y fuerte, sea el componente más importante englobando una gran cantidad de eritrocitos y muy pocas plaquetas.

Los determinantes del flujo sanguíneo en la circulación venosa hacen que la ETV ocurra preferentemente en las venas de los miembros inferiores. La inmovilización por cualquier causa está presente en la mayoría de los casos. Los pacientes con mayor riesgo de ETV tienen lesiones vasculares grandes como traumatismos abdominales o de las piernas, son sometidos a cirugías extensas o tienen una limitación motora importante. Otros factores son la historia personal o familiar de ETV, venas varicosas, edad avanzada, obesidad, cáncer, inmovilización prolongada, sexo femenino, embarazo, grupo sanguíneo O, uso de anticonceptivos hormonales, colocación de catéteres venosos centrales, insuficiencia cardíaca e insuficiencia venosa periférica (51-54). Todas estas situaciones son trombofilias adquiridas, sin embargo, con cualquiera de ellas y en

cualquier momento puede coexistir una trombofilia primaria lo que irremediablemente eleva el riesgo trombótico del individuo.

Parche anticonceptivo. El PA fue aceptado por la FDA (Drug Food Administration) en diciembre de 2001 e introducido al mercado en junio de 2002, está de etinilestradiol (EE) 0.6mg y norelgestromina (NGMN) 6.0mg. Su mecanismo de acción es inhibir la ovulación (55). La tasa de embarazo es relativamente baja, (1.24 por cada 100 usuarias/ año (IC 95% 0.19-2.33) (61). Su eficacia se ve reducida en mujeres >90Kg de peso corporal (56). El tratamiento consiste en utilizar un PA durante 7 días antes de ser remplazado (56). Cada ciclo del tratamiento comprende el uso de tres PA, cada uno libera 20ug de EE y 150ug de NGMN /24h a la circulación sistémica (57), y un cuarto parche se encuentra libre de hormonas. Después del uso de cada parche, la concentración sérica de EE y NGMN oscila de 25-75pg/ml y de 0.6-1.2ng/ml respectivamente (58,59). El PA puede colocarse en el abdomen, glúteos, antebrazos y el torso (con la excepción de los senos) (60).

Los efectos adversos del PA han sido estudiados desde su introducción al mercado, de manera general, se acepta que el PA tiene una tolerabilidad y efectos no deseados similares a los AO (62). La usuarias de PA presentan hipersensibilidad en el sitio de aplicación, endurecimiento de los senos (en los primeros dos ciclos), y dismenorrea (71). Las náuseas, labilidad emocional y la cefalea son síntomas menos frecuentes (72). Un porcentaje bajo de mujeres refirió hemorragia y/o manchado ocasional al utilizar el PA (73). Por otro lado, el PA induce alteraciones de los niveles de lípidos plasmáticos de manera similar a lo observado con los anticoagulantes orales (AO). Es decir, el PA incrementa la

concentración de colesterol total, HDL colesterol y triglicéridos (63,64), pero también se ha observado una disminución en la concentración de la glucosa y cambios en las pruebas de función hepática (64).

El PA tiene efectos en el sistema de la coagulación (65-67), de los cuales destaca el incremento en la incidencia de resistencia a la proteína C activada, lo que refleja una relación directa con el incremento en el riesgo de ETV (68,69). La incidencia de ETV en usuarias de PA es de 52.8 /100,000 mujeres/ año (IC 95% 35.8-74.9) (68).

Implante anticonceptivo. Los implantes anticonceptivos han sido aprobados en más de 60 países en el mundo. Están compuestos de diferentes progestágenos y biopolímeros. Se insertan sub-dérmicamente y de manera preferente en el brazo. El implante anticonceptivo (IA) compuesto de etonogestrel (ENG) fue aprobado por la FDA en 2006. Cada IA contiene 68 mg de ENG, el metabolito biológicamente activo del desogestrel (74). El ENG inhibe la ovulación, su efecto se alcanza cuando sus niveles séricos superan los 90pg/ml (55,74). Se coloca en los primeros 5 días del ciclo menstrual. La tasa de liberación del fármaco es de 40µg/ día (76). A las ocho horas de su inserción, los niveles séricos de ENG incrementan hasta una media de 265pg/mL, alcanzándose la concentración máxima a las 96 horas (77). Transcurrido un año de su uso, los niveles séricos disminuyen a 196 pg/mL (77,78) y declinan paulatinamente durante los siguientes años.

La tasa de embarazos es de 0.27, 0.30 y 0.38/ 100 mujeres / año, a los dos años y a los tres años respectivamente (79).

Sus efectos sobre el metabolismo y el sistema de la coagulación parecieran no ser perjudiciales (80-85). La cefalea y disnea se presenta con frecuencia (86), mientras que un porcentaje bajo de mujeres (1 - 9%) sufre de nerviosismo y/o depresión (86). Las náuseas, endurecimiento de los senos, dolor pélvico, pérdida de la libido y fatiga son síntomas raros entre las usuarias (86).

El incremento de peso, también es frecuente en las usuarias del implante subdérmico (4-22%), con reportes de 0.4 a 1.5 Kg por año (92).

La información sobre efectos adversos del IA en el sistema de la coagulación es limitada y con frecuencia los cambios observados carecen de relevancia clínica. El implante subdérmico, disminuye la concentración de los factores VII, X, el fragmento 1+2 de la protrombina y los complejos trombina-antitrombina, e incrementa la concentración de PAI-I (90). Además, la agregación plaquetaria inducida con epinefrina y colágeno disminuye (89). Resultados similares se observaron en las usuarias del dispositivo intrauterino liberador de LNG (91).

JUSTIFICACIÓN

La asociación entre trombosis y los anticonceptivos orales que contienen estrógenos y progestinas fue descrita por primera vez en los 60's (93). Desde entonces se conoce su asociación con las trombosis arteriales y venosas, mismas que representan la primera causa directa de muerte en todo el mundo. La enfermedad tromboembólica venosa constituye una de las mayores causas de morbimortalidad a nivel mundial, el alto riesgo de padecer TVP o TEP a pesar de los avances en la profilaxis, diagnóstico y manejo de ésta entidad, se ha tornado alarmante. Debido a las diferentes guías, criterios diagnósticos, desconocimiento e inexperiencia del personal de salud, este padecimiento ha sido infra-diagnosticado y por ende; no se cuenta con datos exactos de su incidencia y prevalencia. Por otra parte, el Infarto agudo al miocardio (IAM) y el infarto cerebral (IC) representan dos de las tres primeras causas de muerte en el mundo, sin contar los casos de enfermedad arterial periférica. El impacto económico, familiar, social y de la calidad de vida debido a la discapacidad (insuficiencia cardíaca, demencia, hipertensión pulmonar secundaria, síndrome posttrombótico, entre otras), hacen necesario el estudio e identificación de los posibles factores de riesgo.

Toda situación que condiciona a un individuo a una trombosis se conoce como trombofilia (94). Las trombofilias secundarias (inducidas por cirugía, embarazo, tabaquismo, obesidad, diabetes mellitus, inmovilización y anticonceptivos hormonales), son extraordinariamente frecuentes en todas las sociedades humanas. En este caso, como factor de riesgo para trombofilia secundaria, el uso parche e implante anticonceptivos, serán las variables a estudiar en grupos de mujeres mexicanas que inician el tratamiento anticonceptivo. Ya que la aparición e

intensidad de las trombofilias dependen de las características genéticas de cada población, es crucial conocer cada una para establecer sus riesgos protrombóticos potenciales. En México desconocemos el impacto de la mayor parte de estas trombofilias sobre la población.

Carecemos de evidencias acerca de la frecuencia y tipo de alteraciones protrombóticas que afectan a la mujer mexicana. En nuestro país, en 2010, vivían poco más de 112 millones de habitantes, de los cuales 57 481 307 eran mujeres (51.16 % de la población) (88). De acuerdo a estos datos existían casi 22 millones de mujeres usuarias potenciales de tratamiento anticonceptivo. Independientemente de la vía de administración, los efectos de los diferentes estrógenos y progestágenos son muy similares sobre el sistema de coagulación y casi no existen diferencias entre los de 2a y 3a generación (70,94,95).

En base a todo lo anterior, el presente estudio intentará evidenciar por primera vez si existen diferencias en la expresión de los marcadores de disfunción endotelial en mujeres mexicanas que usan parche o implante anticonceptivo. Este conocimiento permitiría establecer si estos anticonceptivos, tienen un efecto importante sobre la inducción de trombofilia a nivel del sistema de coagulación, específicamente en el endotelio, además, si se requiere algún tipo de prueba de escrutinio previa al inicio de parche o implante anticonceptivos para disminuir el riesgo trombótico en esta población específica.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias en la expresión de los marcadores de disfunción endotelial en mujeres mexicanas que inician anticoncepción con parche o implante anticonceptivos?

OBJETIVO GENERAL

Conocer si existen diferencias en la expresión de los marcadores de disfunción endotelial en mujeres mexicanas que usan parche o implante anticonceptivo.

HIPÓTESIS

Existen diferencias en la expresión de los marcadores de disfunción endotelial en mujeres mexicanas que usan parche o implante anticonceptivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo.

Mujeres mexicanas derechohabientes del IMSS que iniciaron tratamiento hormonal anticonceptivo.

B. Tipo de estudio.

Estudio prospectivo, longitudinal y aleatorizado.

C. Descripción de variables.

C.1. Dependiente. Disfunción endotelial.

C.2. Independientes. Uso del parche o implante anticonceptivo.

D. Descripción operacional de las variables.

D.1. Disfunción endotelial. Estado en el cual el endotelio cambia su fenotipo anticoagulante por otro pro-coagulante. En el caso de este proyecto, la disfunción del endotelio estará caracterizada por un incremento en la expresión de las proteínas VCAM-1, E-selectina, vWF y PAI-1 a los 4 meses de iniciada la terapia hormonal. Evaluado en una escala cuantitativa: ng/mL.

D.2. Uso de parche o implante anticonceptivo. Uso voluntario de parche o implante anticonceptivo por un lapso de 4 meses. Evaluado en una escala cualitativa nominal: si, no.

E. Selección de la muestra.

E.1. Tamaño.

El tamaño de la muestra se determinó utilizando una fórmula para estimación de una proporción. Consideramos los rangos de alteraciones en las proteínas inflamatorias y del sistema de coagulación descritas en otras poblaciones, (4 a 10%), en base a los resultados de algunos de los estudios previos que examinaron

el efecto de los anticonceptivos hormonales. De acuerdo con estos datos, para una frecuencia promedio de 7% e intervalos de 4 a 10%, se requieren 25 muestras (+10% para cubrir las pérdidas) de usuarias de anticonceptivos hormonales para tener un poder adecuado de 80% ($1-\beta = 0.8$) y una α de 0.05.

E.2. Grupo de estudio.

E.2.1. Grupo problema. Mujeres que iniciaron voluntariamente terapia a base de parche o implante anticonceptivo. Los medicamentos analizados fueron aquéllos con los que actualmente cuenta el IMSS: a. Parche anticonceptivo: 0.03 mg etinilestradiol y 0.6 mg norelgestromina; b. Implante anticonceptivo: etonogestrel 68 mg.

E.3. Criterios de inclusión.

Mujeres mexicanas de entre 18 y 35 años que iniciaron voluntariamente terapia con parche o implante anticonceptivo.

Si ya habían recibido terapia hormonal, ésta se suspendió al menos 3 meses antes del ingreso al estudio.

Si la posible usuaria tenía al menos 3 meses post-parto y no estaba lactando, también se incluyó.

E.4. Criterios de no inclusión.

Mujeres que recibieron más de un tipo de medicamento hormonal o que ingirieron este tipo de medicamentos por alguna otra razón médica.

Con antecedentes familiares de alteraciones hemofílicas; con historia personal de trombosis o que requirieron tratamiento antitrombótico de cualquier tipo.

Hipertensión arterial descontrolada, enfermedad aterotrombótica conocida, migraña grave, cáncer mamario, diabetes, hemorragia uterina anormal, insuficiencia hepática o renal, enfermedad autoinmune.

Embarazo o deseo de embarazo en los 4 meses siguientes.

E.5. Criterios de exclusión.

Se excluyeron a las mujeres que no completaron los 4 meses con el anticonceptivo hormonal y a las usuarias que se embarazaron durante el transcurso del estudio.

F. Procedimiento.

Las usuarias de los hormonales se reclutaron de Unidades de Medicina Familiar del IMSS en la zona de influencia del HGR Carlos MacGrégor Sánchez Navarro en el Distrito Federal. *Una vez que aceptaron o decidieron iniciar el tratamiento con anticonceptivos hormonales (por invitación, consejo, sugerencia o información por parte del personal de la UMF), se les invitó a ser canalizadas a la UIM en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis en el HGR Carlos MacGrégor Sánchez Navarro donde se les propuso participar en el estudio.* Una vez en la UIM, todas aquellas pacientes que aceptaron la invitación, fueron informadas acerca de la naturaleza del estudio y firmaron una carta de consentimiento informado. Inmediatamente después, fueron sometidas a una venopunción antes de iniciar la terapia hormonal. Una vez que las pacientes tomaron interrumpidamente estos medicamentos por 4 meses, pasaron a la segunda fase y se sometieron a una nueva venopunción.

Requerimos en cada venopunción un total de 7.7 mL de sangre colectada en tubos al vacío en 1 tubo sin anticoagulante y 1 más con citrato de sodio. Las

muestras fueron inmediatamente centrifugadas a 2000 g por 15 minutos y se procedió a la separación respectiva de sueros y plasma pobre en plaquetas mediante una pipeta Pasteur desechable. Las muestras se almacenaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL a -70 °C hasta su procesamiento. Los cambios observados en los valores encontrados a los cuatro meses de recibir la terapia en comparación con los valores iniciales en cada prueba nos permitieron establecer las conclusiones.

G. Ensayos de laboratorio. Realizamos las siguientes determinaciones:

Concentración de los marcadores de activación endotelial. Esta evaluación se realizó mediante pruebas basadas en una técnica de ELISA (ASSERACROM® VWF:Ag, STAGO). Brevemente, un soporte de plástico recubierto de anticuerpos de conejo anti-vWF humano fijó el VWF existente en el plasma problema. El vWF fijado se reveló con anticuerpos de conejo anti-vWF humano marcados con peroxidasa. La cantidad de peroxidasa unida se midió por su actividad sobre el sustrato tretametilbenzidina (TMB). Tras detener la reacción con un ácido fuerte, se midió la absorbancia de 450 nm.

PAI-1 (ASSERACHROM® PAI-1, STAGO). Un soporte de plástico recubierto de anticuerpos monoclonales de ratón anti-PAI-1 humano fijó el PAI-1 existente en el plasma problema. El PAI-1 fijado se reveló con anticuerpos monoclonales de ratón anti-PAI-1 humano marcados con peroxidasa. La cantidad de peroxidasa unida se midió por su actividad sobre el sustrato ortofenilendiamina (OPD). Tras detener la reacción con un ácido fuerte, se midió a una absorbancia de 495 nm.

E-selectina (ELAM-1 INVITROGEN™ Human). La E-selectina del plasma se unió a anticuerpos monoclonales murinos anti-sE-selectina de los pocillos, se agregó

un segundo anticuerpo monoclonal conjugado con HRP que mediante un sustrato (tetrametilbencidina) evidenció la presencia de E- selectina. Se utilizó una solución de paro y se midió la concentración a una absorbancia de 450 nm.

VCAM-1(INVITROGEN™ Human sVCAM-1) del plasma se unió a anticuerpos monoclonales anti-sVCAM-1 de los pocillos, se agregó un segundo anticuerpo monoclonal conjugado con biotina, posteriormente se agregó el complejo estreptavidina-peroxidasa y peróxido de hidrógeno para evidenciar la presencia de sVCAM-1 Se utilizó una solución de paro y se midió la concentración a una absorbancia específica.

H. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se emplearon pruebas paramétricas y no paramétricas para la descripción de las características generales del grupo de trabajo. Se utilizó una t-pareada o Wilconxon para establecer diferencias en los parámetros analizados antes y después del uso del anticonceptivo. En análisis entre los grupos se hizo mediante la prueba t de Student. Los resultados fueron significativos si $p < 0.05$.

RESULTADOS

De agosto de 2012 a enero de 2013 recolectamos las muestras de 58 mujeres mexicanas. Treinta y uno usaron PA y 27 IA. Ocho usuarias no completaron el estudio, a 2 se les retiró el método y 6 no se presentaron a la segunda toma de muestra. Por lo tanto analizamos las muestras de 50 mujeres, 25 para cada grupo. La edad promedio de las usuarias fue de 24 y 28 años respectivamente, tuvieron cifras de tensión arterial normales, sin evidencia de dislipidemia, diabetes, daño hepático y renal (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Características clínicas de la usuarias de anticonceptivos hormonales (n=50).

	PA (n=25)			IA (n=25)		
	Basal	4 meses	P	Basal	4 meses	p
Edad (años)	23.9 (18-32)	23.9 (18-32)	NA	28.0 (18-35)	28.0 (18-35)	NA
Peso (Kg)	59.3 (42-90)	60.9 (47-88)	0.058	57.5 (36-91)	60.0 (39-101)	0.056
Talla (m)	1.6 (1.5-1.7)	1.6 (1.5-1.7)	NA	1.52 (1.38-1.64)	1.52 (1.38-1.64)	NA
IMC (Kg/m²)	24.6 (19.2-39)	25.3 (21.5-38.1)	0.062	24.7 (16.0-38.5)	25.8 (17.3-40.4)	0.062
PaS (mmHg)	108 (90-120)	107 (100-120)	0.588	107 (90-120)	107 (90-120)	0.98
PaD (mmHg)	71 (60-80)	70 (60-80)	0.695	68 (60-80)	69 (68-80)	0.678

Los resultados se presentan como la media (rango). IMC: índice de masa corporal; PaS: presión arterial sistólica; PaD: presión arterial diastólica.

Tabla 2. Evaluación de la función metabólica, hepática y renal.

Variable	PA		P	IA		P
	Basal	4 meses		Basal	4 meses	
Glucosa (mg/dL)	89.5 (65.0-113.0)	92.2 (78.0-106.0)	0.289	91.3 (80.0-142.0)	85.4 (66.0-106.0)	0.034
Urea (mg/dL)	19.2 (6.0-36.4)	20.4 (12.8-30.0)	0.362	21.8 (13.0-32.0)	20.7 (12.0-32.0)	0.405
Creatinina (mg/dL)	0.55 (0.4-0.82)	0.59 (0.5-0.82)	0.071	0.59 (0.41-0.77)	0.60 (0.48-0.81)	0.179
A. úrico (mg/dL)	4.3 (2.3-6.6)	4.1 (3.0-6.5)	0.299	4.5 (2.6-6.5)	4.2 (2.9-6.5)	0.418
Tgl (mg/dL)	132.3 (49.0-373.0)	149.7 (79.0-233.0)	0.174	136.9 (63.0-265.0)	104.1 (34.0-300.0)	0.002
Colesterol (mg/dL)	171.9 (141.0-236.0)	179.7 (135.0-239.0)	0.201	163.7 (108.0-217.0)	144.6 (85.0-225.0)	0.001
TGO (U/dL)	22.4 (15.0-43.0)	22.5 (15.0-60.0)	0.974	25.2 (10.0-61.0)	22.3 (11.0-32.0)	0.167
TGP (U/dL)	19.6 (8.0-49.0)	17.6 (9.0-41.0)	0.321	24.9 (10.0-81.0)	21.5 (8.0-46.0)	0.081
FA (U/dL)	68.0 (35.0-112.0)	60.4 (35.0-88.0)	0.025	80.2 (56.0-213.0)	75.8 (48.0-163.0)	0.093
LDH (U/dL)	129.8(24.5)	120.8 (22.5)	0.053	144.4(105.0-190.0)	154.5 (112.0-201.0)	0.005
GGT (U/dL)	18.4 (6.0)	17.1 (8.4)	0.259	21.7 (5.0-86.0)	26.9 (7.0-80.0)	0.009
PCR (mg/dL)	0.28 (0.2)	0.51 (0.3)	0.013	0.26 (0.5)	0.25 (0.3)	0.837

Efecto de la terapia hormonal anticonceptiva en los marcadores de disfunción endotelial.

En las usuarias de PA, observamos una disminución significativa de los niveles plasmáticos de vWF ($p=0.02$) y E-selectina ($p=0.022$) a los 4 meses con el método hormonal. No observamos diferencia significativa en los niveles de PAI-1 y VCAM (Tabla 3).

En cuanto a las usuarias de IA, no observamos diferencia significativa para ninguna de las variables en estudio (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de los marcadores de disfunción endotelial en las mujeres mexicanas en terapia hormonal anticonceptiva.

	PA (n=25)			IA (n=25)		
	Basal	4 meses	P	Basal	4 meses	P
PAI-1 (ng/ml)	29 (6-459)	20 (4-430)	0.729	48 (-27-123)	34 (-53- 122)	0.159
vWF (U/dL)	103 (23-182)	90 (36-145)	0.02	76 (45-184)	70(-7-182)	0.622
VCAM-1 ng/ml	478 (373-637)	456 (381-625)	0.321	429 (349-687)	432 (399-649)	0.756
E-selectina ng/ml	8.9 (8-9)	7 (1-13)	0.022	9 (9.39-9.72)	8 (3-13)	0.296

Los resultados de las variables paramétricas se expresan como la media (IC 95%) y la mediana (percentil 2.5 –percentil 97.5) respectivamente.

DISCUSIÓN

El estudio de los efectos colaterales de los anticonceptivos hormonales tuvo su origen con la aparición de los AO hace más de 50 años. A finales del siglo pasado los AO se utilizaban por millones de mujeres en el mundo. No obstante, con la llegada de nuevos métodos hormonales la popularidad por los AO en el mundo disminuyó. En gran medida, los efectos secundarios de los AO dieron origen al diseño de nuevos métodos hormonales. Actualmente, las usuarias pueden elegir entre otros métodos hormonales tales como el PA, anillo vaginal, el dispositivo intrauterino medicado o el IA.

En México, el PA e IA se utilizan en la práctica clínica; sin embargo no hay información científica que demuestre la seguridad clínica de ambos medicamentos. Por este motivo decidí conocer si el PA e IA inducían cambios en los marcadores de disfunción endotelial.

Durante seis meses de estudio se muestrearon a 58 voluntarias mexicanas interesadas en integrarse a un programa de planificación familiar. El grupo de

mujeres que usaron el PA estuvo integrado por estudiantes de bachillerato, universidad, profesionistas y en menor proporción por amas de casa. Por el contrario casi en su totalidad las usuarias de IA se dedicaban al cuidado del hogar. A pesar de estas diferencias sociodemográficas, las características clínicas fueron similares entre los dos grupos de estudio a excepción de la edad ya que las usuarias de PA eran de menor edad.

No observamos diferencias al comparar los resultados de las pruebas de laboratorio entre los grupos de mujeres que uso el PA y el de IA. En el grupo de IA solo se observó un resultado significativo en los niveles séricos de FA por efecto del método hormonal, aunque el incremento carece de importancia clínica. Por el contrario las usuarias de IA disminuyeron sus niveles séricos de glucosa, triglicéridos, colesterol y GGT. Nuevamente los resultados carecieron de relevancia clínica y contrario a lo que uno pudiera esperarse los cambios parecieran ser benéficos para la salud de las usuarias mexicanas.

Antes de iniciar con el estudio de los efectos de ambos métodos anticonceptivos sobre el endotelio, decidimos evaluar la concentración de la PCR de alta sensibilidad. La PCR una proteína ampliamente evaluada en la práctica clínica. Después de cuatro meses de la terapia hormonal los niveles de PCR incrementaron significativamente en el grupo de PA pero no para el de IA. Aunque el incremento fue cercano al 100%, los niveles de PCR se mantuvieron dentro de valores normales de referencia. En estudios previos se había observado un incremento de 220% en la PCR a los dos meses de utilizar el PA. La diferencia entre nuestros resultados y los antes descritos nos hace pensar hipotéticamente que, el uso del PA está relacionado con un proceso altamente pro-inflamatorio al

inicio de la terapia hormonal el cual se hace menos evidente mientras más prolongada sea el uso del método hormonal.

De acuerdo con lo anterior, la lógica era esperar que los niveles séricos de los marcadores solubles de disfunción endotelial tuvieran un comportamiento similar a lo observado con la PCR, al menos para el grupo de mujeres con PA.

En la actualidad existe suficiente evidencia que sustenta que los anticonceptivos hormonales inducen cambios en los componentes del sistema de la coagulación. No obstante, las alteraciones en los niveles de los factores pro-coagulantes y la caída de los anticoagulantes naturales no explican por qué los anticonceptivos inducen trombosis. Posteriormente se describió que los anticonceptivos hormonales también inducían cambios en el sistema de la fibrinólisis pero estos correspondían a un estado de activación fibrinolítica probablemente como respuesta a la trombofilia presente en las usuarias de los anticonceptivos.

El estudio del endotelio y los anticonceptivos hormonales no orales es un tema poco estudiado. Como se ha mencionado anteriormente, el endotelio es el componente esencial del sistema de la coagulación y su disfunción pudiera explicar los problemas de trombosis en las usuarias de anticonceptivos, independientemente de los cambios en la concentración de los factores pro-coagulantes, anticoagulantes naturales y de la fibrinólisis.

Con base en nuestros resultados, a los cuatro meses de la terapia hormonal, el PA pero no el IA, modificó la expresión de dos marcadores de disfunción endotelial. Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, el PA disminuyó significativamente los niveles séricos de vWF y E-selectina. Aunque estos cambios carecen de relevancia clínica son de gran importancia debido a que estereotípicamente se ha

pensado que los estrógenos tienen efectos benéficos en los pacientes portadores de la enfermedad de von Willebrand y que la E-selectina incrementa su expresión solo en situaciones donde el endotelio está activado. La explicación lógica de lo anterior es que el vWF incrementa su concentración en respuesta al incremento de la concentración de estrógenos, sin embargo nuestros resultados muestran lo contrario. Con respecto a la disminución de E-selectina, no hay una explicación clara pero lo que sí es evidente es que los cambios observados no representan riesgo para la salud de las usuarias.

Ante este panorama surge la necesidad de realizar más estudios que intenten demostrar por qué los anticonceptivos inducen trombosis. Nuestro estudio es el primero en demostrar en América Latina que el uso del PA e IA no se encuentra asociado con cambios en la expresión de los marcadores de disfunción endotelial.

CONCLUSIONES

La disfunción endotelial se define como una discapacidad en alguna de las funciones normales de las células endoteliales conduciendo a vasoconstricción, trombosis, sobrerregulación de moléculas de adhesión de células solubles (CAMs), secreción aumentada de citoquinas y quimiocinas, y adherencia leucocitaria, entre otros. Se ha evidenciado con el paso del tiempo la asociación de la terapia anticonceptiva hormonal y la trombosis, sin embargo aún no se conoce con certeza el mecanismo específico como causa.

Mediante estudios de laboratorio (ELISA) tratamos de identificar cambios en la expresión de marcadores de disfunción endotelial como responsables de trombosis, sin embargo, no encontramos asociación. Por otra parte, en las

mujeres mexicanas usuarias de PA disminuyó significativamente los niveles séricos de vWF y E-selectina. Esto contradice a estudios previos donde el uso estrógenos incrementa los niveles de vWF.

Habrá que continuar con esta línea de investigación en población mexicana para conocer más sobre los mecanismos específicos relacionados.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este fue un estudio de riesgo mayor al mínimo por incluir un procedimiento (la toma de muestras de sangre) que habitualmente no se efectuaba en las mujeres que inician o se encuentran bajo tratamiento con anticonceptivos hormonales. Este estudio forma parte de una línea de investigación que estudia los efectos adversos de los anticonceptivos hormonales. Los beneficios del estudio, por supuesto, son grandes ya que permitirían conocer más acerca de los fenómenos proinflamatorios y/o protrombóticos, y hacer un acercamiento a la posibilidad de evitar fenómenos trombóticos discapacitantes o letales en estas mujeres en el futuro. Para asegurar la confidencialidad de la información, sólo el investigador responsable tuvo los datos completos de los resultados obtenidos de las muestras de cada una de las usuarias. Esto fue factible lograrlo ya que existió un cegamiento doble en todos los pasos del análisis de este estudio y porque nunca se manejaron nombres en las muestras, sólo códigos de números. Por último, en ningún momento, el investigador responsable hizo público el nombre de la mujer de la cual proviene la muestra problema a menos que ésta haya sido una solicitud de la usuaria.

Para las usuarias de anticonceptivos hormonales, la invitación para participar en el estudio y la solicitud de la firma de la carta de consentimiento informado se hizo

por el investigador principal en el momento luego de que la candidata fue elegida y enviada a la UIM en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis.

Todas las participantes recibieron información amplia y suficiente acerca de la investigación. Todas sin excepción firmaron su carta de consentimiento informado. La solicitud de ingreso al estudio se hizo por el médico familiar que atendía a la usuaria potencial del anticonceptivo hormonal.

El proyecto fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS. Se siguieron las leyes y normas tanto nacionales como internacionales para investigación clínica y aplicada en humanos: Ley de General de Salud, artículos 20, 100, 103 y pertinentes; declaración de Helsinki revisada, código de Nuremberg.

BIBLIOGRAFÍA

1. Furchgoot RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-6.
2. Miroslav Radenkovic, Marko Stojanovic, et al., "Therapeutic approach in the Improvement of endothelial dysfunction: The current State of the art", *Biomed Research International*, vol. 2013, Article ID 252158, 12 pages, 2013.
3. Ballermann, B. J. (1998). Endothelial cell activation. *Kidney Int* 53, 1810–26.
4. Cockwell, P., Tse, W. Y., and Savage, C. O. (1997). Activation of endothelial cells in thrombosis and vasculitis. *Scand J Rheumatol* 26, 145–50.
5. Cotran, R. S. (1987). New roles for the endothelium in inflammation and immunity. *Am J Pathol* 129, 407–13.
6. Hunt, B. J., and Jurd, K. M. (1998). Endothelial cell activation. A central pathophysiological process. *BMJ* 316, 1328–29.
7. Pober, J. S. (1999). Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol Res* 19, 225–32.
8. Kevil, C., and Bullard, D. (1999). Roles of leukocyte/endothelial cell adhesion molecules in the pathogenesis of vasculitis. *Am J Med* 106, 677–687.
9. Willms-Kretschmer, K., Flax, M. H., and Cotran, R. S. (1967). The fine structure of the vascular response in hapten-specific delayed hypersensitivity and contact dermatitis. *Lab Invest* 17, 334–49.

10. Pober, J. S., and Cotran, R. S. (1990b). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70, 427–51.
11. Cotran, R. S. (1989). Endothelial Cells. In *Kelly's Textbook of Rheumatology* (S. Ruddy, E.D. Harris Jr., and C.B. Sledge, eds.), Vol. 1, pp. 389–415. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
12. Bach, F. H., Hancock, W. W., and Ferran, C. (1997). Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol Today* 18, 483–86.
13. Blann, A. D. (2000). Endothelial cell activation, injury, damage and dysfunction: separate entities or mutual terms? *Blood Coagul Fibrinolysis* 11, 623–30.
14. Hedner, T., Hansson, L., and Himmelmann, A. (2000). Endothelial dysfunction— a challenge for hypertension research. *Blood Press* 9, 2–3.
15. Eneida Camarillo-Romero, Ma Victoria Dominguez-Garcia, Araceli Amaya-Chavez, Maria del Socorro Camarillo-Romero, Juan Talavera-Piña, Gerardo Huitron-Bravo, and Abraham Majluf-Cruz “Effects of a physical activity program on Markers of endothelial dysfunction, oxidative stress, and metabolic status in adolescents with metabolic syndrome”, *Endocrinology*, vol. 2012, Article ID 970629, 8 pages, 2012.
16. I. A. M. van den Oever, H. G. Raterman, M. T. Nurmohamed and S. Simsek “Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus”, *Mediators of inflammation*, vol. 2010, Article ID 792393, 15 pages, 2010.

17. Joseph A. Vita, Jhon F. Keaney, Jr "Hormone replacement therapy and endothelial function. The exception that proves the rule?" *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*,2001; 21:1867-69.
18. Pober, J. S. (1988). Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Physiology and pathology. Am J Pathol* 133, 426–33.
19. De Meyer, G. R. and Herman, A. G. (1997). Vascular endothelial dysfunction. *Progr Cardiovasc Dis* 39, 325–42.
20. Szmitko, P. E., Wang, C. H., Weisel, R. D., de Almeida, J. R., Anderson, T. J., and Verma, S. (2003). New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 108, 1917–23.
21. Gonzalez-Amaro, R., and Sanchez-Madrid, F. (1999). Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit Rev Immunol* 19, 389–429.
22. Cotran, R. S., Gimbrone, M. A., Jr., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L., and Pober, J. S. (1986). Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo. *J Exp Med* 164, 661–66.
23. Calles-Escandon J, Cipolla M. Biabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev.* 2001; 22; 36-52.
24. Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, et al. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res.* 2009; 335: 165-889.
25. Kerns, W., Schwartz, L., Blanchard, K., Burchiel, S., Essayan, D., Fung, E., Johnson, R., Snyder, P., Loudon, C., MacGregor, J., Miller, F., Nagarkartti, P., Robertson, D., Snyder, P., Thomas, H., Ward, A., and Zhang. J. (2005).

- Drug-induced vascular injury—a quest for biomarkers. *Toxicol Appl Pharmacol* 203, 62–87.
26. Tesfamariam, B. and DeFelice, A. F. (2007). Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders. *Vascul Pharmacol* 46, 229–37.
27. Ara, J., Mirapeix, E., Arrizabalaga, P., Rodriguez, R., Ascaso, C., Abellana, R., Font, J., and Darnell, A. (2001). Circulating soluble adhesion molecules in ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 16, 276–85.
28. Carlos, T. M. and Harlan, J. M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068–101.
29. Goonasekera, C. D., Shah, V., Rees, D. D., and Dillon, M. J. (2000). Vascular endothelial cell activation associated with increased plasma asymmetric dimethyl arginine in children and young adults with hypertension: a basis for atheroma? *Blood Press* 9, 16–21.
30. Bach, F. H., Robson, S. C., Ferran, C., Winkler, H., Millan, M. T., Stuhlmeier, K. M., Vanhove, B., Blakely, M. L., van der Werf, W.J., Hofer, E., de Martin, R., and Hancock, W.W. (1994). Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection. *Immunol Rev* 141, 5–30.
31. Ali A. Rizvi “Inflammation markers as mediators of vasculo-endothelial dysfunction and atherosclerosis in the metabolic syndrome and type 2 diabetes” *Chin Med J* 2007; 120 (21): 1918-1924.
32. Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, Van Mourik JA, et al. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006, 26 (5): 1002-1007

33. Schmutz M, Rand ML, Freedman J. Platelets and Von Willebrand factor. *Transfus Apher Sci.* 2003, 28(3): 269-77.
34. Helena M. Anderson, Bob Siegerink, Brenda M. Luken, et al. High VWF, low ADAMTS13, and oral contraceptives increase the risk of ischemic stroke and myocardial infarction in young women. *Blood.* 2012, volume 119, number 6, 1555-60.
35. Bongers TN, de Maat MP, Van Goor ML, et al. High von Willebrand factor levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability. *Stroke.* 2006; 37 (11): 2672-77.
36. Van Schie MC, DEM MP, Dippel DW, et al. Von Willebrand factor propeptide and the occurrence of a first ischemic stroke. *J Thromb Haemost.* 2010; 8 (6): 1424-26
37. Chion CK, Doggen CJ, Crawley JT, Lane DA, et al. ADAMTS 13 and Von Willebrand factor and the risk of myocardial infarction in men. *Blood.* 2007; 109 (5): 1988-2000.
38. Tanis B, Algra A, van der Graaf Y, Helmerhorst F, Rosendaal F. Procoagulant factors and the risk of myocardial infarction in young women. *Eur J Haematol.* 2006; 77 (1): 67-73.
39. Jurd, K. M., Stephens, C. J., Black, M. M., and Hunt, B. J. (1996). Endothelial cell activation in cutaneous vasculitis. *Clin Exp Dermatol* 21, 28–32.
40. Svenungsson E, Cederholm A, Jensen-Urstad K, et al. Endothelial function and markers of endothelial activation in relation to cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2008, 37: 352-59.

41. Al-Massarani, G., Vacher-Coponat, H., Paul, P., Widemann, A., Arnaud, L., Loundou, A. Robert, S., Berland, Y., Dignat-George, F., and Camoin- Jau, L. (2008). Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. *Am J Transplant* 8, 2360–67.
42. Sabatier, F., Camoin-Jau, L., Anfosso, F., Sampol, J., and Dignat-George, F. (2009). Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med* 13, 454–71.
43. Strijbos, M. H., Landburg, P. P., Nur, E., Teerlink, T., Leebeek, F. W. G., Rijneveld, A. W., Biemond, B. J., Sleijfer, S., Gratama, J. W., Dutis, A. J., and Schnog, J-J.A. (2009). Circulating endothelial cells: A potential parameter of organ damage in sickle cell anemia? *Blood Cell Mol Dis* 43, 63–67.
44. Chen, S. H., Murphy, D. A., Lassoued, W., Thurston, G., Feldman, M. D., and Lee, W. M. (2008). Activated STAT3 is a mediator and biomarker of VEGF endothelial activation. *Cancer Biol Ther* 7, 1994–2003.
45. Walker Isobel D, Greaves M, Preston FE. Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2001;13:512-528.
46. Martínez-Murillo C, Quintana-González S, Ambriz-Fernández R, Hernández Paula M. El problema trombótico. *Hematología* 2000;1:17-20.
47. Shafer A. The hipercoagulable states. *Ann Intern Med* 1985;102:814-828.
48. Angles E. Overview on fibrinolysis: Plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chem Physc Lipids* 1994;67/68:353-362.

49. Nygaard K, Brown G. Essential thrombophilia. Report of five cases. *Arch Intern Med* 1937;59:82-106.
50. Rocha Hernando E. Estados hipercoagulables. *Blood* 1997;42:452.
51. Gensini GF, Prisco D, Falciani M, Comeglio M, Colella A. Identification of candidates for prevention of venous thromboembolism. *Sem Thromb Hemost* 1997;23:55-67.
52. Bergqvist D, Lindblad B. A 30-year survey of pulmonary embolism verified at autopsy: An analysis of 1274 surgical patients. *Br J Surg* 1985;72:105-108.
53. Clagett GP, Reish JS. Prevention of venous thromboembolism in general surgical patients. *Ann Surg* 1988;208:227-240.
54. Anderson FA, Wheeler B, Goldberg RJ, Hosmer DW, Forcier A. The prevalence of risk factors for venous thromboembolism among hospital patients. *Arch Intern Med* 1992;152:1660-1664.
55. Dittrich R, Parker L, Rosen JB, et al. Transdermal contraception: evaluation of three transdermal norelgestromin/ethinyl estradiol doses in a randomized, multicentre, dose-response study. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:15-20.
56. Janssen-Cilag International NV. Evra transdermal patch. Summary of Product Characteristics. Available at <http://www.janssen-cilag.co.uk/product/pdf/spc/00121.pdf>.
57. Abrams LS, Skee D, Natarajan J, et al. Pharmacokinetic overview of Ortho Evra™/Evra™. *Fertil Steril* 2002;77:S3-S12.
58. Abrams LS, Skee DM, Wong FA, Anderson NJ, Leese PT. Pharmacokinetics of norelgestromin and ethinyl estradiol from two consecutive contraceptive patches. *J Clin Pharmacol*. 2001;41:1232-7.

59. Abrams LS, Skee DM, Natarajan J, Wong FA, Leese PT, Creasy GW, Shangold MM. Pharmacokinetics of norelgestromin and ethinyl estradiol delivered by a contraceptive patch (Ortho Evra/Evra) under conditions of heat, humidity, and exercise. *J Clin Pharmacol.* 2001;41:1301-92.
60. Abrams LS, Skee D, Natarajan J, et al. Pharmacokinetics of a contraceptive patch (Evra™/Ortho Evra™) containing norelgestromin and ethinyl estradiol at four application sites. *J Clin Pharmacol* 2001;53:141–146.
61. Audet MC, Moreau M, Koltun WD, et al. Evaluation of contraceptive efficacy and cycle control of a transdermal contraceptive patch vs an oral contraceptive. *JAMA* 2001;285:2347–2355.
62. Radowicki S, Skórzewska K, Szlendak K. Safety evaluation of a transdermal contraceptive system with an oral contraceptive. *Ginekol Pol.* 2005;76:884-9.
63. Creasy GW, Fisher AC, Hall N, Shangold GA. Transdermal contraceptive patch delivering norelgestromin and ethinyl estradiol. Effects on the lipid profile. *J Reprod Med.* 2003;48:179-86.
64. Kiriwat O, Petyim S. The effects of transdermal contraception on lipid profiles, carbohydrate metabolism and coagulogram in Thai women. *Gynecol Endocrinol.* 2010 May;26(5):361-5.
65. Johnson JV, Lowell J, Badger GJ, Rosing J, Tchaikovski S, Cushman M. Effects of oral and transdermal hormonal contraception on vascular risk markers: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol.* 2008;111:278-84.

66. Fleischer K, van Vliet HA, Rosendaal FR, Rosing J, Tchaikovski S, Helmerhorst FM. Effects of the contraceptive patch, the vaginal ring and an oral contraceptive on APC resistance and SHBG: a cross-over study. *Thromb Res.* 2009;123:429-35.
67. Jensen JT, Burke AE, Barnhart KT, Tillotson C, Messerle-Forbes M, Peters D. Effects of switching from oral to transdermal or transvaginal contraception on markers of thrombosis. *Contraception.* 2008;78:451-8.
68. Jick S, Kaye JA, Li L, Jick H. Further results on the risk of nonfatal venous thromboembolism in users of the contraceptive transdermal patch compared to users of oral contraceptives containing norgestimate and 35 microg of ethinyl estradiol. *Contraception.* 2007;76:4-7.
69. [No authors listed]. Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone. *Contraception. Lancet* 1995;346:1582-8.
70. Jick SS, Kaye JA, Russmann S, Jick H. Risk of nonfatal venous thromboembolism in women using a contraceptive transdermal patch and oral contraceptives containing norgestimate and 35 microg of ethinyl estradiol. *Contraception.* 2006;73:223-8.
71. Sibai BM, Odland V, Meador ML, Shangold GA, Fisher AC, Creasy GW. A comparative and pooled analysis of the safety and tolerability of the contraceptive patch (Ortho Evra/Evra). *Fertil Steril.* 2002;77:S19-26.

72. Smallwood GH, Meador ML, Lenihan JP, Shangold GA, Fisher AC, Creasy GW; ORTHO EVRA/EVRA 002 Study Group. Efficacy and safety of a transdermal contraceptive system. *Obstet Gynecol.* 2001;98:799-805.
73. Harel Z, Riggs S, Vaz R, Flanagan P, Dunn K, Harel D. Adolescents' experience with the combined estrogen and progestin transdermal contraceptive method Ortho Evra. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2005;18:85-90.
74. Croxatto HB. Mechanisms that explain the contraceptive action of progestin implants for women. *Contraception.* 2002;65:21–27.
75. Diaz S, Pavez M, Moo-Young AJ, Bardin CW, Croxatto HB. Clinical trial with 3-keto-desogestrel subdermal implants. *Contraception.* 1991;44:393–408.
76. Davies GC, Feng LX, Newton JR, Van Beek A, Coelingh-Bennink HJ. Release characteristics, ovarian activity and menstrual bleeding pattern with a single contraceptive implant releasing 3-ketodesogestrel. *Contraception.* 1993;47:251–261.
77. Makarainen L, van Beek A, Tuomivaara L, Asplund B, Coelingh Bennink H. Ovarian function during the use of a single contraceptive implant: Implanon compared with Norplant. *Fertil Steril.* 1998;69:714–721.
78. Croxatto HB, Makarainen L. The pharmacodynamics and efficacy of Implanon. An overview of the data. *Contraception.* 1998;58:91S–97S.
79. Darney P, Patel A, Rosen K, Shapiro LS, Kaunitz AM. Safety and efficacy of a single-rod etonogestrel implant (Implanon): results from 11 international clinical trials. *Fertil Steril.* 2009;91:1646-53.

80. Vieira CS, Ferriani RA, Garcia AA, Gomes MK, Azevedo GD, Silva de Sá MF. Transitory reduction of platelet aggregation with the use of etonogestrel implant in healthy women. *Thromb Haemost.* 2005;94:682-3.
81. Egberg N, van Beek A, Gunnervik C, Hulkko S, Hirvonen E, Larsson-Cohn U, Bennink HC. Effects on the hemostatic system and liver function in relation to Implanon and Norplant. A prospective randomized clinical trial. *Contraception.* 1998;58:93-8.
82. Funk S, Miller MM, Mishell DR Jr, et al. Safety and efficacy of Implanon, a single-rod implantable contraceptive containing etonogestrel. *Contraception.* 2005;71:319–326.
83. Biswas A, Viegas OA, Roy AC. Effect of Implanon and Norplant subdermal contraceptive implants on serum lipids – a randomized comparative study. *Contraception.* 2003;68:189–193.
84. Merki-Feld GS, Imthurn B, Seifert B. Effects of the progestagen-only contraceptive implant Implanon on cardiovascular risk factors. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68:355–360.
85. Biswas A, Biswas S, Viegas OA. Effect of etonogestrel subdermal contraceptive implant (Implanon) on liver function tests – a randomized comparative study with Norplant implants. *Contraception.* 2004;70:379–382.
86. Brache, V., Faundes, A., Alvarez, F, Cochon, L. Non-menstrual adverse events during use of implantable contraceptives for women: data from clinical trials. *Contraception.* 2002;65:63-74.

87. World Health Organization. Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Report of a WHO Scientific group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1998;877:1-89.
88. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. <http://dgcnesyp.inegi.gob.mx>.
89. Vieira CS, Ferriani RA, Garcia AA, Gomes MK, Azevedo GD, Silva de Sá MF. Transitory reduction of platelet aggregation with the use of etonogestrel implant in healthy women. *Thromb Haemost*. 2005 Sep;94(3):682-3.
90. Egberg N, van Beek A, Gunnervik C, Hulkko S, Hirvonen E, Larsson-Cohn U, Bennink HC. Effects on the hemostatic system and liver function in relation to Implanon and Norplant. A prospective randomized clinical trial. *Contraception*. 1998 Aug;58(2):93-8.
91. Van, Tchaikovski SN, Rosendaal FR, Rosing J, Helmerhorst FM. The effect of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on the resistance to activated protein C (APC). *Thromb Haemost*. 2009 Apr;101(4):691-5.
92. Olav Meirik, Ian S. Fraser and Catherine d'Arcangues. Implantable contraceptives for women. *Human Reproduction Update*, 2003, vol. 9 (1): 49-59.
93. Cameron C. Trenor, III, MD, Richard J. Chung, MD, Alan D. Michelson, et al. Hormonal Contraception and Thrombotic Risk: A Multidisciplinary Approach. *Pediatrics*, 2011, vol. 127 (2).
94. Tchaikovski SN, van Vliet HAAM, Thomassen CLGD, Bertina RM, Rosendaal FR, Sandset PM, Helmerhorst FM, Tans G, Rosing J. Effect of

oral contraceptives on thrombin generation measured via calibrated automated thrombography. *Thromb Haemost* 2007;98:1350-1356.

95. Hernández VL, Téllez MJ y Hicks GJJ. Efecto metabólico de los anticonceptivos orales. *Ginecología y Obstetricia* 2000;68:64-69.