

Mecanismo de acción del levonorgestrel administrado como anticonceptivo de emergencia en la mona *Cebus apella*.

María Elena Ortíz. Unidad de Reproducción y Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Revista Controversias en Ginecología y Obstetricia. Vol. 13, Nro. 74 - 75, Dic-Enero 2004-2005, Colombia

La anticoncepción de emergencia comprende métodos anticonceptivos que las mujeres pueden utilizar después de un coito no protegido, con el fin de evitar un embarazo no deseado. Algunos sostienen que evita el embarazo porque interfiere con la implantación, pero esto nunca ha sido demostrado.

Investigaciones recientes en la rata revelaron que, en esta especie, Levonorgestrel (LNG) no interfiere con la implantación del embrión (1). Otras investigaciones realizadas en la mujer y en la rata revelaron que los anticonceptivos hormonales de emergencia interfieren con el proceso ovulatorio y que este mecanismo podría dar cuenta del efecto anticonceptivo de estos productos. (2, 3).

Con el fin de aportar mas información a este tema, desarrollamos un estudio utilizando *Cebus apella* como modelo animal y LNG como anticonceptivo de emergencia.

Como anticonceptivo de emergencia, el LNG está disponible en píldoras combinadas que contienen 100 µg de EE + 500µg de Levonorgestrel; y en píldoras de progestina sola que contienen 750 µg de LNG.

En este estudio, se propuso determinar, si en la mona *Cebus apella*, la administración postcoital de LNG afecta la implantación del embrión en el útero o si administrado antes de la ovulación, interfiere con el proceso ovulatorio.

Elegimos al mono *Cebus* porque está a nuestro alcance, porque su sistema reproductivo es semejante al de la mujer y porque en estos animales se pueden hacer los procedimientos del estudio sin alterar su ciclo menstrual.

El ciclo menstrual de la mona muestra la misma secuencia de eventos que el ciclo menstrual de la mujer. En la mona, el ciclo menstrual comienza con la menstruación y el crecimiento del folículo que va a ovular (Fig 1). Cinco a ocho días después de iniciado el ciclo, el folículo dominante, alcanza un diámetro de 8 – 9mm y se produce la ovulación que se reconoce a través de la ecografía por una disminución de su diámetro y por un cambio en la densidad de la imagen debido a que se transforma en cuerpo lúteo. Por otra parte, las oscilaciones de las hormonas ováricas en la sangre, también son semejantes a las de la mujer. A medida que crece el folículo aumenta el estradiol alcanzando el máximo nivel, uno o dos días antes de la ovulación. Entre 5 y 7 días después que se forma el cuerpo lúteo se observan las concentraciones máximas de progesterona. Otra ventaja de estos animales es que el examen diario de sus células vaginales, permite reconocer los eventos descritos. Una diferencia con la mujer, es que la mona tiene una marcada preferencia para aparearse cuando está a punto de ovular. Esto es muy importante en

cuanto todos los coitos ocurren en el período fértil. Ello garantiza una situación experimental en la cual el anticonceptivo de emergencia siempre se administra después de un coito que ha ocurrido en el período fértil. Esta situación no es posible lograrla en nuestra especie por razones éticas y logísticas. Por estas razones el estudio que se describe a continuación, es de trascendental importancia.

1er Objetivo: Para determinar si la administración postcoital de LNG afecta la implantación del embrión en el útero, se administró una o dos dosis de 0.75mg de LNG por vía oral o por inyección sub-cutánea, durante las primeras 24 horas después del coito, en 24 ciclos menstruales de 12 monas. Para la administración oral se usaron pastillas de Postinor – 2 (Grünenthal Chilena Ltda) disueltas en 5mL de leche con cereales o 5mL de jugo de frutas y para la inyección sub-cutánea se usó LNG (Leiras, Leiras Oy Turku, Finlandia) disuelto en 0.5mL de una mezcla de Benzil-Benzoato y aceite de maíz. En los ciclos controles, se administró leche con cereales o jugo de frutas o bien se inyectó 0.5 mL de la mezcla de Benzil-Benzoato con aceite sin LNG. Un estudio independiente realizado en 4 monas demostró que ambas formas de administración producen niveles plasmáticos de LNG comparables y en ambos casos estos son varias veces más altos que los observados en la mujer.

La proporción de embarazos observada en los ciclos tratados con LNG se comparó con la proporción de embarazos en ciclos tratados con vehículo en los mismos animales. Cada animal contribuyó con 2 ciclos controles y dos tratados con LNG, según una distribución hecha al azar. En total hubo 24 ciclos controles y 24 ciclos tratados con LNG (Tabla 1). Todos los ciclos fueron monitorizados con frotis vaginales diarios para reconocer el período periovulatorio y confirmar la cópula y por ultrasonografía para estimar el intervalo entre la cópula y la ovulación y confirmar la gestación.

Para lograr el apareamiento, cada mona fue trasladada a la jaula de un macho compatible durante el período periovulatorio y la cópula fue confirmada por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal. Ese día se retiró a la hembra de la jaula del macho, se hizo un examen ecográfico de los ovarios para verificar la condición y el tamaño del folículo dominante, y se administró el tratamiento correspondiente. El monitoreo posterior de las hembras se hizo con frotis vaginales para reconocer la menstruación. A las monas que no menstruaron antes del día 12 de la fase lútea se las examinó con el ecógrafo para confirmar o descartar la presencia del saco gestacional. Las hembras preñadas fueron examinadas nuevamente el día 15, para confirmar la expansión del saco gestacional, en cuyo caso, la gestación fue interrumpida administrando una antiprogesterina (RU 486) (Fig 2) Estos animales volvieron al estudio después de un ciclo de descanso. En 19/24 ciclos controles y en 22/24 ciclos tratados con LNG, la cópula y por lo tanto el tratamiento precedieron a la ovulación por no más de dos días y en ningún caso el tratamiento coincidió con un folículo dominante < 5mm. La gestación se produjo en 13/24 ciclos controles y en 13/24 ciclos tratados con LNG (Tablas 1 y 2). Esto demuestra fehacientemente que en la mona Cebus, la administración postcoital de LNG no afecta el número de embriones que se implantan.

Conclusión: Las monas copularon cuando la ovulación era inminente. En estas condiciones, la administración postcoital de LNG no alteró el número de embriones que se implantaron.

2º Objetivo: Para determinar si el LNG altera el proceso ovulatorio, se examinó el desarrollo del folículo dominante, para establecer si ocurre y cuando ocurre la ovulación en ciclos tratados con LNG o vehículo.

El LNG o el solvente se administraron por inyección subcutánea en dos dosis separadas por 12 horas. Los ciclos fueron monitorizados con frotis vaginales y ultrasonografía. El tratamiento se administró en fase folicular temprana coincidiendo con un folículo menor (<) de 5mm o en fase folicular tardía coincidiendo con un folículo mayor (>) de 5mm. En los ciclos controles, se inyectó 0.5mL del solvente sin LNG coincidiendo con folículos < de 5mm. En los ciclos tratados, se inyectaron dos dosis de 0.75mg de LNG c/u, coincidiendo con folículos < de 5mm de diámetro o coincidiendo con folículos > 5mm de diámetro (Fig 3).

Se usaron 6 monas, cada una contribuyó con un ciclo control y con cuatro ciclos tratados, dos ciclos fueron tratados con LNG coincidiendo con folículos pequeños y otros dos coincidiendo con folículos grandes. Siempre se dejó un ciclo de descanso entre dos ciclos tratados (Tabla 3). La ovulación ocurrió en todos los ciclos controles y en todos los ciclos tratados con LNG coincidiendo con folículos grandes, sin embargo, cuando el LNG se administró coincidiendo con folículos pequeños, la ovulación se suprimió en 4/12 ciclos y se postergó en los ocho restantes (Tabla 4). La Figura 4 ilustra las características que permitieron identificar a los 4 ciclos en los cuales la ovulación se suprimió y a figura 5 ilustra la mayor duración de la fase folicular de los 8 ciclos en los cuales la ovulación se postergó.

Conclusiones: El LNG inhibió o postergó la ovulación cuando el tratamiento coincidió con folículos < 5mm de diámetro, pero no modificó el momento de la ovulación cuando el folículo era > 5mm.

Conclusión general: Se demuestra por primera vez en un primate que LNG, administrado como anticonceptivo de emergencia, interfiere con el proceso ovulatorio, y no interfiere con la implantación del embrión en el útero.

Referencias:

- 1) Müller A.L., Lladós C.M., Croxatto H.B. Postcoital treatment with levonorgestrel does not disrupt postfertilization events in the rat. *Contraception*, 67: 415-419 (2003).
- 2) Durand M, Cravioto M, Raymond EG et al. On the mechanism of action of shortterm levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception*, 64:227-234 (2001).
- 3) Croxatto H.B., Fuentealba B., Brache V., Salvatierra A.M., Alvarez F., Massai R., Cochon L., Faundes A. Effects of the Yuzpe regimen, given during the follicular phase, on ovarian function. *Contraception*, 65: 121-128 (2002).

Leyendas de las Figuras:

Figura 1: Características del ciclo menstrual en la mona *Cebus apella*. Se muestra la relación entre el desarrollo del folículo dominante (barras grises), las oscilaciones hormonales de estradiol E2 (línea roja) y progesterona P4 (línea azul) y los cambios de la citología vaginal (barra horizontal dibujada al pie del gráfico). Nótese la disminución del diámetro del folículo y el cambio de la citología vaginal, el día de la ovulación. El desarrollo del folículo dominante se

determina por ecografía, las oscilaciones hormonales se determinan midiendo por radioinmunoanálisis (RIA), la concentración de las hormonas en muestras de sangre y la citología vaginal tomando muestras de células vaginales que se tiñen y se observan al microscopio. Todos estos exámenes se hacen diariamente.

Figura 2: Cronograma de las intervenciones experimentales para determinar si la administración postcoital de LNG afecta la implantación del embrión en el útero, en la mona *Cebus apella*. Cuando se inicia el período periovulatorio, se introduce a la hembra en la jaula del macho. Cuando se encuentra espermatozoides en la vagina, se retira a la hembra, se le hace una ecografía y se le administra el tratamiento (inyección subcutánea o píldora). Si la hembra no menstrúa se hacen dos ecografías más y si se confirma la preñez, se administra RU 486 para interrumpir el embarazo.

Figura 3: Diseño para administrar el tratamiento coincidente con folículos menores (<) o mayores (>) de 5mm de diámetro en la mona *Cebus*.

Figura 4: Dos gráficos que muestran la relación entre el desarrollo del folículo dominante (barras grises), las oscilaciones hormonales de estradiol (línea roja) y de progesterona (línea azul) y los cambios de la citología vaginal (barra horizontal dibujada al pie del gráfico). Ambos gráficos ilustran los resultados obtenidos en el ciclo control y en un ciclo tratado con LNG coincidente con un folículo menor (<) de 5mm en una misma hembra. El desarrollo del folículo dominante se determina por ecografía, las oscilaciones hormonales se determinan midiendo, por RIA la concentración de las hormonas en muestras de sangre y la citología vaginal tomando muestras de células vaginales que se tiñen y se observan al microscopio. Nótese las diferencias entre ambos gráficos. En el ciclo control se aprecia el aumento progresivo del folículo dominante en el mismo período en que aumentan el estradiol plasmático y las células eosinofílicas en el frotis vaginal. Después de la ovulación se observa el aumento de la progesterona que alcanza los niveles mas altos entre los días 5 y 7 de la fase lutea. En el ciclo tratado vemos que el folículo dominante creció muy poco. Tampoco aumentó la concentración de estradiol ni se observaron células eosinofílicas en el frotis vaginal. En ningún día se observó una disminución del diámetro folicular indicativa de ovulación, sin embargo la progesterona mostró un aumento que indica la luteinización del folículo. Al 13avo día se produjo la menstruación y se inició un nuevo ciclo.

Los ciclos que mostraron estas características en mayor o menor grado fueron clasificados como anovulatorios.

Figura 5: Gráfico que muestra la duración de la fase folicular de los ciclos ovulatorios en el grupo control (barra verde), y en los tratados con LNG coincidente con folículos menores (<) de 5mm (barra roja) o mayores (>) de 5mm (barra azul). La mayor duración de la fase folicular en el grupo tratado con LNG coincidente con folículos menores de 5mm se debe a la postergación de la ovulación en ese grupo.