

**Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Licenciatura de Médico Cirujano
Departamento de Titulación**



“Efecto de la exposición *in vitro* de medroxiprogesterona en la producción de IL-10, TNF-alfa y proliferación celular de leucocitos mononucleares aislados de sangre periférica de mujeres sanas de 18 a 25 años”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

Presenta:

M.P.S.S. Fany Guadalupe Ochoa Arriaga

Directores de Tesis:

Ph.D. Irazú Contreras García

Ph.D. José Antonio Estrada Guadarrama

Revisores de Tesis:

Ph.D. Keila Isaac Olivé

D.C.S. Liliana Aranda Lara

Toluca, Estado de México. 2019

Título

“Efecto de la exposición *in vitro* de medroxiprogesterona en la producción de IL-10, TNF-alfa y proliferación celular de leucocitos mononucleares aislados de sangre periférica de mujeres sanas de 18 a 25 años”

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	4
3.1 Anticoncepción	4
3.2 Progesterona	4
3.2.1 Medroxiprogesterona	6
3.3 El sistema inmunológico y la progesterona	8
3.4 Citocinas	9
3.4.1 IL-10	9
3.4.2 TNF-alfa	10
3.5 Proliferación celular	11
3.5.1 Progesterona en el ciclo celular	11
3.5.2 Anticoncepción y el ciclo celular	12
4. Planteamiento del problema	13
5. Justificación	14
6. Hipótesis	15
7. Objetivos	16
8. Metodología	17
8.1 Tipo de Estudio	17
8.2 Universo de estudio	17
8.3 Muestra	17
8.4 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	17
8.5 Operacionalización de las variables	18
8.6 Diseño experimental	19
8.7 Toma de muestra	19
8.8 Aislamiento y cultivo de leucocitos mononucleares	19
8.9 Técnica de ELISA	20
8.10 Citometría de Flujo	21
8.11 Diseño de Análisis	21
9. Implicaciones éticas	22
10. Organización	22
11. Presupuesto y financiamiento	22
12. Resultados	23
12.1 Población Muestra	23
12.2 Cuantificación de la concentración de citocinas	23
12.3 Proliferación celular	27
13. Discusión	33
14. Conclusiones y perspectiva a futuro	36
15. Bibliografía	37
16. Anexos	40
Anexo 1 Historia Clínica	40
Anexo 2 Consentimiento informado	44
Anexo 3 Aprobación del comité de ética en investigación	46

1. Resumen

El uso de anticonceptivos hormonales está relacionado con distintos cambios metabólicos, clínicos e inmunológicos. El presente estudio tuvo como objetivo principal analizar el efecto de la exposición de análogos de progesterona contenidos en métodos anticonceptivos hormonales sobre la producción de citocinas en leucocitos, así como las variaciones en la proliferación celular tras la exposición a medroxiprogesterona, un análogo de progesterona de uso anticonceptivo.

Para este fin, se estudiaron muestras de sangre de 20 mujeres sanas de 18 a 25 años de edad. Se realizó una historia clínica completa, incluyendo antecedente gineco-obstétricos para realizar la selección de candidatas y se tomó una muestra sanguínea de 10 mL por punción venosa para aislar los leucocitos mononucleares. Las células fueron cultivadas por 24 horas para posteriormente ser expuestas durante 3 o 24 horas a medroxiprogesterona a concentraciones de 2.5 mg/mL, 5 mg/mL o 10 mg/mL, simulando las concentraciones promedio de la hormona que se encuentran en sangre durante su administración *in vivo*. Las concentraciones de las citocinas TNF-alfa e IL-10 se cuantificaron en sobrenadante del cultivo celular por medio de la técnica de ELISA y se analizó la proliferación celular por citometría de flujo.

Los resultados mostraron que las concentraciones de TNF-alfa tendieron a disminuir en relación al tiempo de exposición a la hormona, y en el caso de IL-10, las cantidades detectadas fueron mínimas y sin un patrón específico. En cuanto a la proliferación celular no se observaron cambios en la proliferación celular, pero si un posible aumento de las células en proceso de apoptosis. Lo que nos pudiera indicar un posible efecto del fármaco sobre las células del sistema inmunológico.

2. Introducción

Las normas actuales de nuestro país se centran en proporcionar acceso libre y adecuado a métodos anticonceptivos a todas las personas sexualmente activas. Este acceso permite poder llegar a mejores condiciones de bienestar individual, familiar y social, así como mantener estándares internacionales dentro de lo estipulado para planificación familiar por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS se enfoca en la necesidad de lograr el acceso y la calidad de la salud sexual y reproductiva, a fin de satisfacer las necesidades de las diversas poblaciones, en particular las más vulnerables. En nuestro país, según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), son las mujeres adolescentes, de las cuales 77 de cada 1,000 tienen un embarazo no planeado¹.

Dentro de la población mexicana, hay poco menos de 33.4 millones de mujeres en edad fértil, que representan al 53.9% de la población femenina total, las cuales son el blanco de estos programas². Como parte del programa nacional de planificación familiar establecido en el Diario Oficial de la Federación, se encuentran disponibles diversos métodos anticonceptivos para su aplicación y distribución de forma gratuita y educada. Además, dentro del mercado se encuentran todos los métodos anticonceptivos de venta libre e indiscriminada. Esto ha asegurado un acceso de cualquiera de estos métodos al 76.5% a mujeres sexualmente activas³.

Debido a su vasta e indiscriminada distribución, los efectos de los anticonceptivos más comunes en el cuerpo de las usuarias han sido estudiados ampliamente, encontrándose relaciones patológicas en particular con los estrógenos. Sin embargo, la investigación sobre los más recientes o los menos usados no se ha extendido hasta poder comprender de forma completa sus efectos fuera de lo esperado.

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto de la exposición de medroxiprogesterona, un análogo de progesterona usado como anticonceptivo hormonal, sobre la producción en leucocitos de las dos principales citocinas en su categoría, IL-10 como la citocina antiinflamatoria y TNF-alfa como proinflamatoria, así como sobre la proliferación de estas células.

Para esto, se aislaron células mononucleares de sangre periférica de mujeres de entre 18 y 25 años, las cuales fueron cultivadas para ser divididas en dos grupos y expuestas durante 3 y 24 horas, respectivamente, al fármaco a concentraciones de 2.5 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL, posteriormente, se separó el sobrenadante del cultivo celular y las células. Con el sobrenadante se cuantificaron las citocinas ya mencionadas mediante la técnica de ELISA, esperando aumento de la concentración de la citocina anti-inflamatoria y disminución de la concentración de la citocina pro-inflamatoria. A su vez, con las células recolectadas se estudio la proliferación celular posterior a la estimulación, esperando una disminución en esta.

Siendo la homeostasis del sistema inmunológico algo tan esencial para la interacción adecuada del cuerpo con su medio ambiente, la importancia de este estudio radica no sólo en un más profundo entendimiento del papel que juegan las citocinas y sus productores en el resto de los sistemas, sino en una comprensión adecuada de los posibles riesgos a los que se expone la población femenina al decidir utilizar estos métodos, así como en motivar el desarrollo de nuevas alternativas para la anticoncepción tanto femenina como masculina.

3. Marco teórico

3.1 Anticoncepción

La planificación familiar a través del uso de métodos anticonceptivos ha sido uno de los grandes avances del siglo XX y es fundamental para la salud pública. La anticoncepción se define como cualquier práctica, método o dispositivo usado para prevenir el embarazo en mujeres sexualmente activas, los cuales han sido diseñados para actuar previniendo la fecundación o la implantación del óvulo fecundado en el útero.

Históricamente, los métodos anticonceptivos han evolucionado desde hace miles de años, desde el consumo de mercurio por mujeres chinas o los amuletos de pata de comadreja europeos, a la abstinencia o calendario de fertilidad, llegando hasta el condón de látex y los métodos farmacológicos actuales⁴.

En México, de acuerdo a la Encuesta Nacional de la Dinámica Demográfica (ENADID 2014), el mayor número de embarazos ocurren en edades tempranas, entre los 20 y 24 años de edad, siendo Chiapas el estado de mayor fecundidad. Además, México es el país con la tasa más alta de embarazos en adolescentes dentro de los países pertenecientes a la OCDE⁵, por lo que se han hecho esfuerzos para incluir la anticoncepción dentro de las regulaciones gubernamentales, inicialmente por el aumento poblacional y posteriormente para mejorar salud materna e infantil. Por ende, el artículo cuarto de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos describe a la planificación familiar como el derecho de toda persona a decidir, de manera libre, responsable e informada, sobre el número y el espaciamiento de sus hijos. Además, la Norma Oficial Mexicana 005 (NOM 005-SSA2-1993, de los Servicios de Planificación Familiar) se describe el procedimiento para la selección adecuada, prescripción y aplicación de los métodos anticonceptivos, con la meta de acceder a mejores condiciones de bienestar individual, familiar y social⁶.

El 76.5% de la población sexualmente activa del grupo etario entre los 20 y 49 años de edad, usa algún método anticonceptivo, mientras que en la población de mayor riesgo, las adolescentes entre 15 y 19 años, sólo el 59% usa algún método anticonceptivo⁷.

Los métodos anticonceptivos usados en nuestro país en la actualidad comprenden los de barrera, como el condón masculino y el femenino, los farmacológicos y el dispositivo intrauterino de cobre. Dentro de los métodos farmacológicos encontramos los basados en estrógenos y progestágenos⁸.

3.2 Progesterona

La progesterona es un progestágeno, hormona sintetizada en el ovario, testículos, placenta y glándulas suprarrenales. Químicamente, su estructura ($C_{21}H_{30}O_2$)

comprende 4 hidrocarburos cíclicos interconectados, con grupos funcionales de cetona y oxigenados, así como 2 sustituyentes metilo, y tiene un peso molecular de 314.46 g/mol.⁹

Se sintetiza a partir del colesterol, el cual sufre una oxidación doble para producir 20,22-hidroxicolesterol, posteriormente oxidándose y produciendo la pregnenolona, el precursor principal de la progesterona. La progesterona es a su vez el precursor de la aldosterona, cortisol y la androstenediona, la cual puede a su vez, ser convertida en testosterona y estrona (Figura 1).

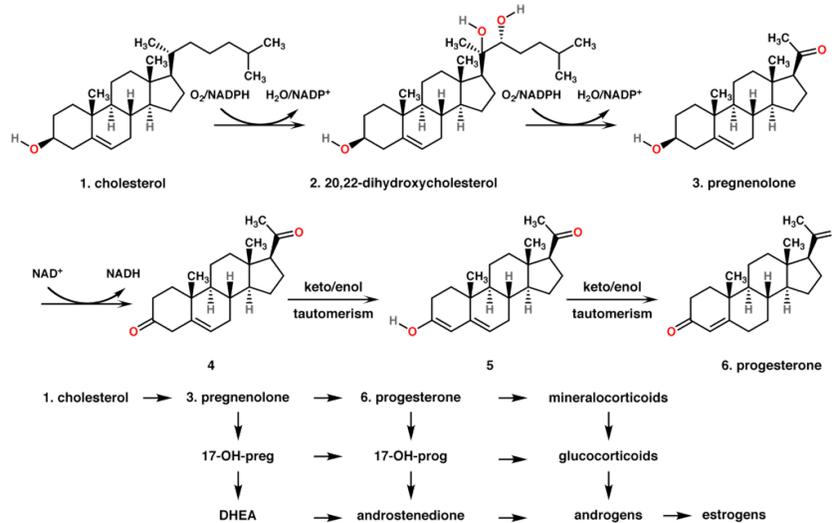


Figura 1: Proceso de síntesis de la progesterona (Tomado de Dewick P. 2002).

Comúnmente conocida como la hormona del embarazo, la progesterona tiene diversos efectos, incluyendo: estimular la actividad de la lipasa, favorecer depósito de grasa, aumentar la concentración de insulina, favorece el almacén de glucógeno y la cetogénesis, altera la función de los centros respiratorios, compite con la aldosterona por el receptor de mineralocorticoides en el túbulo renal se encarga del desarrollo alveolobulillar de la mama, de la secreción de hormona luteinizante y provoca cambios secretores en el endometrio, entre otras funciones. Farmacológicamente, a través de los progestágenos sintéticos, se usa principalmente para tratamiento de sustitución y de anticoncepción hormonal, en la forma de amenorrea y anovulación prolongada, así como del retraso de parto prematuro⁹.

Su mecanismo de acción inicia al ingresar a las células que expresan receptores de progesterona en el núcleo o citoplasma, como el epitelio mamario, el endometrio o los queratinocitos, y unirse, activando posteriormente la transcripción genética. La vida media de la progesterona en plasma es de 5 minutos, almacenándose en tejido graso, con metabolismo completo a través del hígado, el cual la degrada hasta pregnandiol, que se conjuga con ácido glucorónico y se excreta por la orina.

Los progestágenos sintéticos, los cuales son de importancia anticonceptiva, incluyen los compuestos de 21 carbonos, como la medroxiprogesterona, los cuales están más estrechamente relacionados a su precursor⁹. Este análogo de la progesterona se encuentra disponible en comprimidos orales o en forma de inyección intramuscular.

3.2.1 Medroxiprogesterona

Este análogo de la progesterona es comercializado como acetato de medroxiprogesterona, también conocido como acetato de 17- α -hidroxi-6- α -metilprogesterona, y comúnmente abreviado como MPA. Es una progestina esteroidea con mayor potencia química que su precursor¹⁰.

Se usa como anticonceptivo y para tratar la amenorrea secundaria, sangrado uterino anormal, dolor asociado con endometriosis, carcinomas de células renales y endometriales, parafilia en hombres, formas dependientes de GnRH de pubertad precoz, así como para prevenir cambios endometriales asociados con los estrógenos¹⁰.

Se difunde libremente en las células diana del tracto reproductor femenino, la glándula mamaria, el hipotálamo y la hipófisis y se une al receptor de progesterona y al receptor alfa de estrógeno. Una vez ahí, reduce la frecuencia de liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo, las cuales a su vez, previenen la maduración folicular y ovulación y resulta en adelgazamiento endometrial, además atenúa el aumento de la hormona luteneizante (LH) preovulatoria¹⁰.

Posterior a su aplicación, la concentración sérica se incrementaron durante aproximadamente 3 semanas, hasta alcanzar las concentraciones plasmáticas máximas de 1 a 7 ng/mL. La unión a proteínas plasmáticas es en promedio del 86% y se realiza principalmente con la albúmina sérica. Su vida media en el organismo es de 50 días por vía parenteral y 30 días por vía oral, con biodisponibilidad inmediata del 99%¹¹.

Este análogo es extensamente metabolizado en el hígado por las enzimas P450. Su metabolismo es principalmente en el anillo A o por reducción de las cadenas laterales. La pérdida del grupo acetilo, la hidroxilación en las posiciones 2, 6, y 21, o una combinación de estas posiciones, que da como resultado más de 10 metabolitos. Sus concentraciones disminuyen exponencialmente hasta que se vuelven indetectables (<100 pg/mL) entre los 120 a 200 días luego de la inyección¹¹.

Se encuentran disponible internacionalmente como preparado oral, en tabletas de 2.5 mg, 5 mg, 10 mg y 100 mg, generalmente en conjunto con algún estrógeno conjugado en menor gramaje. También existe la forma inyectable por vía intramuscular, en 150 mg/mL, ocasionalmente con algún estrógeno conjugado.

En México se encuentra disponible como suspensión inyectable de 150 mg/mL (DEPO-PROVERA®), tableta de 10 mg y 5 mg (PROVERA®), como suspensión inyectable de acetato de medroxiprogesterona con estradiol 5mg/25mg/5mL (CYCLOFEMINA®) y tabletas de estrógenos conjugados y acetato de medroxiprogesterona (PREMELLE®) con concentración de 62.5 mg/2.5 mg para terapia de reemplazo hormonal¹².

Como parte del cuadro básico y catálogo de medicamentos del Sector Salud, sólo se encuentra como grageas combinadas con estrógenos conjugados para terapia de reemplazo hormonal¹². Las contraindicaciones para su uso incluyen embarazo conocido o sospechado o como una prueba de diagnóstico para embarazo, tromboflebitis activa o historia actual o pasada de trastornos tromboembólicos; enfermedad cerebro vascular, neoplasia maligna de mama conocida o sospechada, hipersensibilidad conocida al acetato de medroxiprogesterona o cualquiera de sus otros ingredientes, enfermedad hepática o sangrado vaginal no diagnosticado¹¹.

Porcentualmente, los efectos secundarios presentados en más del 5% de las pacientes durante ensayos clínicos incluyen dolor de cabeza (16.5%), dolor o malestar abdominal (11.2%), aumento de peso de más de 5 kg a los 24 meses (37.7%), nerviosismo (10.8%), vértigo (5.6%), disminución de la libido (5.5%), sangrado (57.3% a los 12 meses, 32.1 % a los 24 meses) y amenorrea (55% a los 12 meses, 68 % a los 24 meses). Los presentados entre el 1 y 5% de pacientes durante ensayos clínicos incluyen astenia o fatiga (4.2%), dolor de espalda (2.2%), dismenorrea (1.7%), sensación de calor (1.0%), náuseas (3.3%), distensión (2.3%), edema (2.2%), calambres en las piernas (3.7%), artralgia (1.0%), depresión (1.5%), insomnio (1.0%), acné (1.2%), alopecia (1.1%), erupciones (1.1%), leucorrea (2.9%), dolor de mama (2.8%) y vaginitis (1.2 %) ¹².

Algunos efectos secundarios presentados posterior a la comercialización del acetato de medroxiprogesterona, no en combinación con estrógenos, incluyen: dolor de tórax, reacciones alérgicas, fiebre, dolor en el sitio de inyección, escalofríos, hinchazón axilar, síncope, taquicardia, tromboflebitis, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, venas varicosas, cambios en el apetito, alteraciones gastrointestinales, ictericia, sed excesiva, sangrado rectal, anemia, discrasias sanguíneas, osteoporosis, parálisis, parálisis facial, parestesia, somnolencia, disnea y asma, ronquera, hirsutismo, sudoración excesiva y mal olor corporal, piel seca, esclerodermia, cáncer cervical, cáncer de mama, ausencia de retorno de la fertilidad, embarazo inesperado, inhibición de la lactancia, cambios en el tamaño de los senos, bultos en los senos o sangrado de los pezones, galactorrea, melasma, cloasma, aumento de la libido, hiperplasia uterina, infecciones genitourinarias, quistes vaginales y dispareunia¹².

La probabilidad de un aumento de riesgo relativo a padecer algún tipo de cáncer posterior al uso de métodos anticonceptivos hormonales es alta. En el caso de acetato de medroxiprogesterona, la OMS reporta un riesgo relativo aumentado de 2.19% de cáncer de mama en mujeres cuya primera exposición a la droga fue dentro

de los 4 años previos y que tenían menos de 35 años de edad. Sin embargo, el riesgo relativo general de las que alguna vez la usaron fue solamente 1.2%¹³.

El Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos reporta una tasa de incidencia anual promedio en cáncer de mama de 26.7 por cada 100,000 casos, para mujeres de todas las razas, pero de edad de 30 a 34 años. Un riesgo relativo de 2.19%, aumenta el riesgo posible de 26.7 a 58.5 casos por cada 100,000 mujeres. El riesgo atribuible, por lo tanto, es 31.8 por cada 100,000 mujeres por año¹³.

Además, un aumento de riesgo relativo de cáncer invasor de células escamosas del cuello uterino se ha asociado con su uso en las mujeres que fueron expuestas por primera vez antes de la edad de los 35 años (riesgo relativo de 1.22 a 1.28 casos por cada 100,000). La tasa global de cáncer invasor de células escamosas del cuello uterino en las mujeres que nunca usaron acetato de medroxiprogesterona se estimó en 1.11 casos por cada 100,000¹³.

3.3 El sistema inmunológico y la progesterona

Se reconoce ampliamente que los cambios en los niveles de esteroides ováricos modulan la gravedad de las enfermedades autoinmunes y la función inmunológica en mujeres adultas jóvenes. Además, se conoce el rol crítico que juega la progesterona en el sistema endócrino, y aunque se sabe que está involucrada en otros sistemas, no se conoce en toda su extensión¹⁴. Se han identificado varios mecanismos potenciales, incluyendo la alteración de la actividad de Th1 y Treg, sin embargo los blancos específicos no se han identificado, ya que la progesterona puede señalar a través de distintos receptores, los cuales han sido estudiados principalmente por su capacidad de supresión de liberación de citocinas¹⁵.

En el caso del sistema inmunológico, el embarazo nos permite observar en qué procesos forma parte importante esta hormona cuando está en cantidades aumentadas, ya que de forma regular, su influencia no es particularmente identificable entre los numerosos factores que intervienen en una respuesta inmunológica. Las respuestas inmunes humorales aumentan durante el embarazo, mientras que las respuestas inmunitarias mediadas por células y la gravedad de los trastornos autoinmunes mediados por células tienden a ser regulados a la baja¹⁶. Se conoce que la progesterona es parte importante del proceso de embarazo al asegurar el mantenimiento del embarazo, en parte regulando la respuesta inflamatoria, inhibiendo la citotoxicidad de las células NK, las cuales pueden dañar el trofoblasto, regulando la producción de citocinas, y estimulando la tolerancia del sistema inmunológico al producto¹⁷.

Durante la menopausia, el estado contrario al ya discutido, las mujeres muestran cantidad disminuida de linfocitos T, directamente relacionado a la desaparición de hormonas ováricas; sin embargo, esta disminución no empeora la respuesta inmunológica¹⁸. En cuanto a la progesterona en particular, no hay información suficiente que diferencie entre los efectos causados por la falta de progesterona

contra la falta de estrógenos, ya que fisiológicamente actúan al unísono. Además, las concentraciones elevadas de progesterona en la sangre causan un curso más grave y una persistencia más prolongada de las bacterias en las enfermedades infecciosas¹⁹.

3.4 Citocinas

Las citocinas son proteínas pequeñas, de menos de 30 KDa, que pueden encontrarse unidas a membrana o libres, secretadas por células, principalmente del sistema inmunológico, como las células T, células dendríticas y macrófagos, entre otras, para interactuar con otras células y con su medio. Su producción se inicia en la transcripción, la cual es altamente regulada por diversos factores, incluyendo el tipo de célula secretora y los estímulos celulares específicos, para posteriormente ser sintetizadas en el retículo endoplásmico, y enviadas al aparato de Golgi, en donde son glicosiladas y empaquetadas para poder ser secretadas por la célula²⁰.

La señalización puede ser autócrina, endócrina o parácrina, siendo esta última la más común. El término citocina es amplio y engloba las diferentes variedades que se han observado a lo largo del tiempo, incluyendo las linfocinas, mastocinas y quimiocinas, estas últimas pertenecen a la familia de los quimiotrayentes, cuya función es atraer células a regiones donde su función es necesaria²¹.

Al ser las principales proteínas secretadas por las células inmunológicas, tienen muchos efectos biológicos, incluyendo la modulación de la diferenciación del linaje hematopoyético, la activación de linfocitos y fagocitos, el balance entre las respuestas mediadas por células y la producción de anticuerpos. Pueden además actuar como mediadores de la inflamación y regular la intensidad y duración de la respuesta inmune, entre muchas otras importantes funciones que determinan la respuesta inmunológica, la evolución de una patología, el rechazo de un órgano trasplantado, la eficacia de las vacunas, etc²¹.

Las citocinas caracterizadas hasta este punto pertenecen a uno de seis grupos, basándose en receptores membranales específicos: la familia de la interleucina 1 (IL-1), la familia de la hematopoyetina (citocina clase I), la familia del interferón (citocina clase II), la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), la familia de la interleucina 17 (IL-17) y la familia de las quimiocinas²².

3.4.1 IL-10

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria, la cual es producida por diversas células, incluyendo macrófagos activados y linfocitos T. Su función principal es inhibir las funciones de linfocitos Th1, Th2, B, células NK, macrófagos y células dendríticas, las cuales son necesarias para la óptima defensa del sistema inmunológico contra patógenos, pero que pueden causar daño a tejidos si se activan sin control²³. Sin embargo, también muestra propiedades inmunoestimuladoras, especialmente en células B y T CD8+ activadas. Su capacidad para inducir la diferenciación de un

subconjunto de células T reguladoras y la importancia de la IL-10 para la función *in vivo* de las células T reguladoras apoya la evidencia de que esta citocina es crucial en el control de las respuestas inmunes, siendo particularmente importante el momento en el que se produce la citocina para asegurar una respuesta inmune adecuada pero con resolución segura de la infección, al disminuir la producción de citocinas pro-inflamatorias antes de que se cause daño a los tejidos²⁴.

Su relación con la progesterona a nivel fisiológico no está descrita, al no ser un factor influyente inmediato. Sin embargo, su relación con estados fisiológicos alterados, como el embarazo, y como respuesta a infecciones sistémicas o estados inflamatorios crónicos sí ha sido documentada. Hay evidencia que el tratamiento con progesterona en complicaciones de esclerosis múltiple en modelos murinos puede ayudar a reducir la severidad de la enfermedad y el daño axonal, al notar que aumenta la concentración de IL-10 y disminuye la de otras citocinas proinflamatorias²⁵.

En cuanto a su rol en el embarazo, en el que la progesterona se encuentra naturalmente elevada, los niveles de esta citocina se elevan de igual forma, ayudando a mantener el embarazo y disminuyendo al momento del parto, encontrándose el alza principalmente en embarazos que concluyen en parto pretérmino, y en particular en aquellos causados por infección, siendo este no la causa, sino la consecuencia del estado inflamatorio elevado²⁶. Regularmente la IL-10 inhibe el parto pretérmino usando diversos mecanismos, incluyendo el desarrollo de linfocitos T, células dendríticas tolerogénicas, activación de JAK1/STAT3, regulación de COX2 e inhibición de parto pretérmino causado por lipopolisacáridos²⁷.

En lo referente a su papel con los métodos anticonceptivos, su efecto parece depender de la línea celular estudiada, ya que en células epiteliales ectocervicales tratadas para simular infección, la administración de medroxiprogesterona causó aumento de citocinas proinflamatorias y disminución de IL-10, dependiendo de la dosis administrada *in vitro*²⁸.

3.4.2 TNF-alfa

El TNF-alfa es una citocina proinflamatoria secretada principalmente por macrófagos, células NK y linfocitos, causando activación de la respuesta inmune en casos de daño celular o infecciones. Además, forma parte del proceso de angiogénesis, cicatrización, disminuye la señalización insulínica y aumenta la lipólisis²⁹.

Las hormonas sexuales femeninas juegan un papel importante en la variación de la prevalencia de enfermedades autoinmunes, siendo mayor en mujeres. Principalmente, los estrógenos estimulan un estado proinflamatorio, permitiendo el aumento de estas citocinas. Sin embargo, la progesterona provoca la disminución en la producción de TNF-alfa y de mRNA de TNF-alfa, siendo esto importante para

regular la respuesta inflamatoria en tejidos proximales a la producción de progesterona³⁰.

Durante el embarazo, ya mencionado como un estado fisiológico de elevación de la hormona, el papel que juega esta citocina depende del momento del embarazo, teniendo que mantener un balance particular para que el embarazo se lleve a cabo sin eventualidades. Los niveles en plasma de la citocina y de su receptor soluble se elevan hasta llegar al segundo trimestre, durante la proliferación placentaria, disminuyendo posteriormente³¹. La administración de progesterona en casos de amenaza de aborto aumenta las cantidades solubles de los receptores de TNF-alfa, causando reversión del estado de riesgo. Sin embargo, cantidades elevadas de TNF-alfa en comparación con IL-10 se encuentran en estados patológicos de riesgo, como preeclampsia y eclampsia, causando un estado inflamatorio similar a lo ocurrido en infección sistémica³².

La administración de altas dosis de medroxiprogesterona en pacientes con neutropenia inducida por quimioterapia demostró que aumenta ligeramente la producción de TNF-alfa, así como la neutropenia³³. Sin embargo, su administración posterior a trauma disminuyó significativamente la cantidad de TNF-alfa, ofreciendo nuevos prospectos de tratamiento³⁴.

3.5 Proliferación celular

La proliferación celular se define como el comportamiento cíclico de las células en el que pasan a través de las cuatro fases del ciclo celular, y el número de células que están activas³⁵. El ciclo se puede dividir en dos etapas distintas: interfase y la fase M. La fase M incluye todos los pasos involucrados en la división celular mitótica, mientras la interfase se divide en etapas G1, S y G2. Cuando las células se encuentran en la etapa S o de síntesis, es cuando se denominan proliferantes y las que se encuentran en fase G0 se llaman células quiescentes³⁶. Para poder encontrar las células proliferantes, se puede analizar cuáles de ellas se encuentran en fase de síntesis por medio de la medición de la cantidad de ADN en las mismas mediante citometría de flujo.

3.5.1 Progesterona en el ciclo celular

El control de la proliferación celular es un balance entre los efectos de distintas moléculas regulatorias que en el ambiente de la célula proveen con señales que estimulan o inhiben la replicación celular³⁷. En modelos animales, la progesterona actúa como agente diferenciador celular, para preparar al útero para el embarazo, y en humanos, el estroma uterino prolifera bajo la progesterona, en preparación para la implantación del blastocistos y eventual transformación del estroma en la placenta³⁸.

En el caso de células mamarias cancerígenas, parece que esta hormona estimula la proliferación, pudiendo detenerse el proceso al bloquear los receptores de la

hormona³⁹. Además, la suplementación con progesterona en mujeres postmenopáusicas ha demostrado ser una de las posibles causas de aumento de tasa de cáncer mamario, al estimular la proliferación de tejido mamario y la expansión no proliferativa de células sanas o transformadas, con evidencia de que la acción de la hormona en tejidos depende del tipo de célula, la cantidad y el ciclo celular, siendo particularmente sensible el tejido endometrial^{40,41}.

3.5.2 Anticoncepción y el ciclo celular

En el caso de las progestinas, se ha estudiado su uso en tratamiento para cáncer de endometrio, al disminuir la proliferación celular⁴²; sin embargo, la mayoría de los estudios apuntan a que en general aumentan la proliferación celular, en particular de células cancerígenas. Se ha encontrado un aumento inicial en la proliferación al administrar medroxiprogesterona a un cultivo celular, con la subsecuente disminución a las 72 horas posteriores⁴³. Sin embargo, su efecto en la proliferación de células en tejidos no asociados con estimulación hormonal no ha sido ampliamente estudiado, con vaga evidencia de que la exposición a medroxiprogesterona disminuye la proliferación celular y por ende, la secreción de reguladores de la respuesta humoral contra patógenos invasores, de particular interés en pacientes infectados con VIH⁴⁴.

4. Planteamiento del problema

De acuerdo a la ENADID 2014, en México, de la población sexualmente activa, el 76.5% de estas usa algún método anticonceptivo, comprendiendo el 12.5% los basados en hormonas y entre la población de mayor riesgo, las adolescentes de entre 15 y 19 años sólo en 59% usan algún método anticonceptivo⁷. De acuerdo a la ENSANUT 2012, el 32.2% de las mujeres inician su vida sexual activa entre los 15 y 19 años, y de estas el 6.1% utiliza un método hormonal como anticonceptivo de primera vez, aumentando el porcentaje con un 4.1% que utilizan la pastilla anticonceptiva de emergencia⁴⁵.

El acetato de medroxiprogesterona (MPA) se usa como anticonceptivo y para tratar la amenorrea secundaria, sangrado uterino anormal, dolor asociado con endometriosis, carcinomas de células renales y endometriales, parafilia en hombres, formas dependientes de GnRH de pubertad precoz, así como para prevenir cambios endometriales asociados con los estrógenos. Este análogo se encuentra disponible en presentaciones de inyección intramuscular bimensual y en preparados orales.

Las interacciones de los anticonceptivos de progesterona con el sistema inmunológico no se han estudiado de forma particular, aunque si se ha estudiado que la progesterona producida por el cuerpo humano afecta el ciclo celular y la respuesta inmunológica, al regular la secreción de ciertas citocinas y receptores de ciclinas, involucradas en el ciclo celular⁴⁶.

Las relaciones de los anticonceptivos hormonales con patología de interés para la salud pública han estado centradas en los métodos a base de estrógenos. En estos se ha encontrado una relación directa con la aparición de cáncer de ovario, mama y útero, causando una inclinación de uso hacia los basados en progesterona, aunque no hayan sido estudiados extensamente en cuanto a estimulación del ciclo celular o en su relación con la homeostasis del sistema inmunológico, por lo que surge la pregunta:

¿Cuál es el efecto de la exposición a acetato de medroxiprogesterona *in vitro* sobre la producción de citocinas y la proliferación de células mononucleares de sangre periférica de mujeres jóvenes?

5. Justificación

- En México, el 76.5% de las mujeres en edad fértil sexualmente activas son usuarias de métodos anticonceptivos y pese a que se han relacionado con diversas patologías, los basados en progesterona no se han estudiado ampliamente, al considerarse inocuos.
- Expandir el conocimiento que se tienen del papel que juega el uso de métodos anticonceptivos hormonales en el sistema inmunológico, así como la relación que podría tener fisiológicamente el sistema endócrino en este, es de vital importancia para comprender adecuadamente el posible impacto del uso de estos compuestos sobre la salud humana.
- La alteración de la homeostasis del sistema inmunológico, tanto en la producción de citocinas como en la proliferación celular, puede traer consecuencias importantes para la salud, por lo cual es necesaria una mejor comprensión de los posibles riesgos a los que se expone la población femenina al hacer uso de estos fármacos.

6. Hipótesis

Hipótesis alterna:

La exposición de células mononucleares aisladas de sangre periférica a acetato de medroxiprogesterona *in vitro*, aumentará la producción de IL-10 y disminuirá la de TNF-alfa, provocando una reducción en la proliferación celular.

Hipótesis nula:

La exposición de células mononucleares aisladas de sangre periférica a acetato de medroxiprogesterona *in vitro*, disminuirá la producción de IL-10 y aumentará la de TNF-alfa, provocando un aumento en la proliferación celular.

7. Objetivos

General:

Determinar el efecto de la exposición de células mononucleares de sangre periférica a acetato de medroxiprogesterona *in vitro*, sobre la producción de citocinas y la proliferación celular.

Específicos:

- A. Determinar la concentración de las citocinas IL-10 y TNF-alfa en sobrenadantes de cultivos de células mononucleares aisladas de sangre periférica de mujeres jóvenes, posterior a la exposición en varios periodos de tiempo y a diferentes concentraciones de acetato de medroxiprogesterona, por medio de la técnica de ELISA.
- B. Evaluar si existen variaciones en la proliferación de las células mononucleares después de la exposición a acetato de medroxiprogesterona, mediante el método de incorporación de yoduro de propidio, analizado por citometría de flujo.

8. Metodología

8.1 Tipo de estudio

Experimental y comparativo

8.2 Universo de estudio

Células mononucleares de sangre periférica de mujeres sanas de entre 18 y 25 años de edad de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

8.3 Muestra

Método de muestreo: No probabilístico, a conveniencia por ser un estudio piloto.
Tamaño de muestra: 20 mujeres.

8.4 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios inclusión: Mujeres sanas de entre 18 y 25 años de edad que aceptaron participar, a las cuales se les realizó una historia clínica completa y que firmaron el consentimiento informado.

Criterios de exclusión: Mujeres con antecedentes de cáncer de mama, útero, ovario, endometrio, etc., diabetes mellitus, eventos trombóticos previos, hemofilia, hipertensión, sangrado uterino anormal, enfermedades autoinmunes, enfermedades renales o hepáticas, migrañas severas, enfermedades autoinmunes, enfermedad tiroidea, enfermedad hormonal previa o alguna otra enfermedad que al momento de la interrogación se considerara que podría interferir con el estudio. Mujeres que estuvieran usando métodos anticonceptivos hormonales o que lo hubieran hecho en los últimos 4 meses, mujeres que consumieran alcohol o fumaran regularmente. Mujeres que estuvieran amamantando, que tomaran algún medicamento con regularidad, que estuvieran embarazadas o que sospecharan estar embarazadas.

Criterios de eliminación: Mujeres que ya no desearan participar en el estudio al momento de la toma de muestra, que no firmaron el consentimiento informado, que se encontraran enfermas al momento de la toma de muestra, mujeres cuya muestra no fue posible obtener o no fuera suficiente, se contaminara o se obtuviera en condiciones no adecuadas.

8.5 Operacionalización de las variables

Variable	Descripción conceptual	Definición operativa	Tipo	Unidad de medida
Medroxiprogesterona	Análogo de la progesterona que se usa principalmente como anticonceptivo y cuyo efecto en el sistema inmunológico no ha sido estudiado ampliamente.	Administración de acetato de medroxiprogesterona a las células en cultivo por 3 o 24 horas y a concentraciones de 2.5, 5.0 o 10 mg/mL.	Cuantitativa continua.	Horas mg/mL
TNF-alfa	Citocina proinflamatoria que causa activación de respuesta inmune mediada por huésped en caso de trauma o infecciones.	Concentración de TNF-alfa cuantificada en el sobrenadante del cultivo celular mediante la técnica de ELISA.	Cuantitativa continua.	pg/mL
IL-10	Citocina antiinflamatoria que asegura una respuesta inmune adecuada pero con resolución segura de la infección.	Concentración de IL-10 cuantificada en el sobrenadante del cultivo celular mediante la técnica de ELISA.	Cuantitativa continua.	pg/mL
Proliferación Celular	Comportamiento cíclico de las células en el que pasan a través de las cuatro fases de el ciclo celular para división celular.	Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de yoduro de propidio en las células expuestas a la hormona, por citometría de flujo.	Cuantitativa continua.	Unidades arbitrarias

8.6 Diseño experimental

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Se recolectaron datos de cada participante en forma de una historia clínica modificada (Anexo 1), que incluyó las siguientes secciones: ficha de identificación (Nombre, edad, fecha de nacimiento, tipo de sangre), antecedentes familiares patológicos (familiares directos que hayan padecido o padezcan cáncer de mama, útero, ovario, endometrio, que tengan historia de uso de anticonceptivos hormonales) antecedentes personales patológicos (anamnesis de todo lo antes mencionado), antecedentes gineco-obstétricos (fecha de menarca, uso de anticonceptivos orales, fecha de última regla, características del periodo menstrual, embarazos, abortos), y variables clínicas (IMC, presión arterial, estado general). Los datos personales se mantuvieron privados y cada mujer firmó un formato de consentimiento que permitió usar sus datos de forma anónima para estudios estadísticos y experimentales. Posterior a la recolección de los datos, estos se analizaron y vaciaron en tablas preliminares, para tenerlos en cuenta al momento del análisis final de los datos.

8.7 Toma de muestra

Se recolectaron 10 mL de sangre periférica por participante en un tubo con heparina. Las participantes tenían un ayuno de 8 a 12 horas. Previo a la toma de muestra, se explicó el proceso y los posibles efectos secundarios, y se pidió que se firmara el consentimiento informado (Anexo 2). La toma de muestra se realizó en una zona bien iluminada, con la paciente cómodamente sentada, descansando el brazo en donde se realizó la venopunción sobre un cojín. Se colocó una liga y se localizó la vena cubital. Se realizó asepsia del área con un algodón con alcohol al 70%, con movimiento circulares del centro a la periferia. Posterior al secado, se realizó la venopunción, con extracción de 10 mL de sangre, retirando la liga previo a retirar la aguja, y se hizo presión sobre la zona de punción hasta realizar hemostasia.

8.8 Aislamiento y cultivo de leucocitos mononucleares

Los leucocitos fueron aislados por un método de gradiente de densidad y centrifugación. Los 10 mL de sangre se prepararon con Fycoll-Histopaque (1.07 g/dL) en proporción 2:1, centrifugándose por 30 minutos a 1,500 rpm, sin freno. Se separaron las células con pipeta Pasteur en un tubo de 10 mL y se aforó a 10 mL con PBS, con posterior centrifugación por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL medio de cultivo completo (AIM-V, 10% suero fetal bovino, L-glutamina y 1% antibióticos).

Los leucocitos obtenidos se contaron en cámara de Neubauer, para poder sembrar 1×10^6 células en placas de cultivo de 24 pozos, con medio de cultivo

AIM-V completo. Las células se dejaron 24 horas en cultivo, antes de la exposición al fármaco.

Se administró medroxiprogesterona a los cultivos en cantidades de 2.5 mg/mL, 5 mg/mL o 10 mg/mL, con un pocillo sin estímulo como control, basándonos en las concentraciones promedio que se encuentran en sangre, los cuales suelen tener una vida media general de 36 ± 12 horas y tener una biodisponibilidad promedio de 99% de lo administrado.

Las células se incubaron durante 3 o 24 horas, siguiendo el tiempo promedio en que se detecta el pico inicial del fármaco y el pico máximo, además de así asegurar exposición al fármaco. Posteriormente, las células se desprendieron del pozo y se recolectó el contenido de cada pocillo en tubos de 1.5 mL, centrifugando a 2,000 rpm, por 15 minutos, para retirar el sobrenadante y etiquetarlo para congelación y posterior cuantificación de citocinas por la técnica ELISA.

El botón celular se resuspendió en 500 μ L de etanol frío al 50%. El tubo se etiquetó y se congeló para la posterior visualización del ADN por medio de la incorporación de yoduro de propidio por citometría de flujo.

8.9 Técnica de ELISA

Para la cuantificación de IL-10 y TNF-alfa por ELISA, se emplearon los kits comerciales ELISA MAX Standard Sets de BioLegend, con número de catálogo 430201 de TNF-alfa y 430601 de IL-10, los cuales están basados en el principio de inmunoensayo competitivo que nos permite detectar y cuantificar, mediante el uso de complejos inmunes, péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas.

La ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) es una técnica que detecta y cuantifica péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas. El principio básico es usar una enzima para detectar la unión de un antígeno con un anticuerpo. La enzima convierte un sustrato incoloro (cromógeno) en un producto coloreado, que indica la presencia de esta unión.

El procedimiento consistió en colocar 100 μ L de anticuerpo de captura en la placa para ELISA e incubarlo toda la noche con agitación suave. Al siguiente día, se preparó la curva estándar en cada placa (a partir de la mayor concentración de TNF-alfa: 8 ng/200 mL e IL-10: 25 ng/200 mL). Se lavó la placa 4 veces con al menos 300 μ L de solución salina de fosfatos (PBS) por pocillo y se secó, golpeando firmemente la placa boca abajo sobre papel absorbente. Todos los lavados posteriores se realizaron de la misma forma. Para bloquear, se agregaron 200 μ L de diluyente de ensayo por pozo. Se selló la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, con agitación suave. Toda incubación posterior con agitación se realizó de manera similar.

Después del bloqueo, se agregaron 100 μL de cada muestra y de la curva estándar y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, en agitación suave. Se lavó la placa 4 veces con PBS y se adicionaron 100 μL de anticuerpo de detección, dejándose incubar 2 horas a temperatura ambiente. Se repitió el lavado 4 veces; se colocaron 100 μL de solución de detección y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se volvió a lavar 5 veces (1 minuto por lavado) y se adicionaron 100 μL del sustrato de TMB, incubándose 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 50 μL de la solución de paro (HCl 0.3M) y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

8.10 Citometría de Flujo

La citometría de flujo tiene la capacidad de medir las características ópticas y de fluorescencia de una célula o partícula cuando pasan a través de una fuente de luz. Para diferenciar las células se usan tinciones o anticuerpos, los cuales permiten observar el tamaño, granularidad y fluorescencia.

Se realizó la tinción con yoduro de propidio, un fluorocromo que se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos tanto de ADN como de ARN, para la estimación de la proliferación celular con respecto a la cantidad de ADN. Para esto, se utilizaron las células previamente preservadas en congelación.

Se inició efectuando 2 lavados con 1 mL de PBS, centrifugando por 10 minutos para retirar el alcohol. Las células se resuspendieron en 250 μL de PBS y se añadieron 6.15 μL de RNAsa, agitando suavemente por 5 minutos, para que el fluorocromo no lo tiña y no se obtenga un falso positivo. Posteriormente, se añadieron 15 μL de yoduro de propidio, dejando actuar por media hora, protegiendo de la luz. Finalmente, se realizó la lectura en el citómetro de flujo BD Accuri C6, seleccionando una zona con un mínimo de 10,000 eventos y excluyendo células muertas.

8.11 Diseño de Análisis

Análisis Estadístico: Se llevó a cabo una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Dado a que los datos no presentaron una distribución normal, el análisis estadístico se llevó a cabo con una prueba de Kruskal-Wallis para hacer la comparación entre todos los grupos y una prueba de Mann-Whitney para comparar con el grupo control. Los datos se presentan en mediana y rango intercuartil (Q_{75} - Q_{25}). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como valores estadísticamente significativos. Para la elaboración de las gráficas, se utilizó el programa GraphpadPrism 7.0 y se agregaron algunas imágenes obtenidas del programa BD AccuriC6 en donde se procesan los resultados del citómetro de flujo.

9. Implicaciones éticas

Para el desarrollo y aplicación de esta investigación se actuó y basó conforme a lo establecido en los principios éticos de la XVIII Asamblea Médica Mundial de Helsinki en el año 1964; siendo de vital importancia la explicación y llenado de la hoja de consentimiento informado a los participantes.

1. La investigación busca el conocimiento para la mejora de la salud.
2. Se llevó a cabo de manera metodológica con técnicas estandarizadas para evitar repeticiones innecesarias del experimento.
3. La selección de los participantes fue conforme a los requerimientos de la investigación, sin dar pie a prejuicios o discriminación-
4. El riesgo para las participantes fue mínimo, siendo tomadas las muestras de acuerdo a protocolos estrictos en cuanto a técnicas e higiene.
5. Las participantes fueron informadas acerca de la investigación para dar su consentimiento voluntario por escrito antes de convertirse en participantes de la investigación.
6. Las participantes tuvieron el derecho de mantener protegida su privacidad, la opción de dejar, en cualquier momento y por cualquier razón, la investigación y tener un monitoreo de su bienestar.
7. Se contó con el aval del comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (Anexo 3).

10. Organización

Tesista

M.P.S.S. Fany Guadalupe Ochoa Arriaga

Directores de tesis

Irazú Contreras García, Ph.D.

José Antonio Estrada Guadarrama, Ph.D.

11. Presupuesto y financiamiento

Este proyecto contó con financiamiento parcial por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT), mediante el programa Jóvenes en la Investigación y Desarrollo Tecnológico en 2015.

12. Resultados

12.1 Población muestra

Se realizó una historia clínica completa a las 24 mujeres que decidieron participar en el estudio, con la subsecuente eliminación y/o exclusión de 4 mujeres con base en los criterios establecidos. La edad promedio resultó en 20.6 ± 1.4 años y con un índice de masa corporal (IMC) promedio de 22 ± 2.4 kg/m². El total de las mujeres que participaron en el proyecto eran estudiantes, solteras y sin antecedentes personales o familiares de importancia clínica.

12.2 Cuantificación de la concentración de citocinas

Para cuantificar las concentraciones de las citocinas TNF-alfa e IL-10 por medio de ELISA, las células aisladas fueron expuestas por 3 horas o 24 horas a concentraciones de 0 mg/mL, como control, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL o 10 mg/mL de medroxiprogesterona, las cuales simulaban las concentraciones promedio que se encuentran en sangre de la hormona durante su administración *in vivo*.

Los valores de las medianas de las concentraciones de TNF-alfa, muestran una tendencia a la disminución en las concentraciones de la citocina cuando aumenta el tiempo de exposición al fármaco y la concentración de este. El resumen de los datos se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 2A.

3 Horas	0 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	24 Horas	0 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
Q25	50.15	42.35	45.88	42.35	Q25	47.94	45.44	43.68	43.53
Mediana (pg/mL)	115	73.83	75.59	78.53	Mediana (pg/mL)	106.2	75.89	57.06	70
Q75	231.3	205.1	203.7	203.5	Q75	173.8	151.2	163.4	124

Tabla 1: Concentraciones de TNF-alfa (pg/mL) en sobrenadante de cultivo celular. Cuantificación mediante la técnica de ELISA en sobrenadante celular de células mononucleares aisladas de sangre periférica y expuestas durante 3 o 24 horas con distintas concentraciones de medroxiprogesterona (mg/mL). Los datos son mostrados en mediana y rango intercuartil (Q₇₅-Q₂₅). n=20.

En cuanto a la IL-10, las cantidades detectadas fueron muy pequeñas o indetectables a las 3 horas de exposición (Tabla 2 y Figura 2B), sin embargo, se observa una tendencia a la disminución de la concentración de la citocina con respecto a las células que no fueron estimuladas a las 24 horas de exposición.

3 Horas	0 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	24 Horas	0 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
Q25	0	0	0	0	Q25	0.1625	0	0	0.59
Mediana (pg/mL)	0.77	0	0	0	Mediana (pg/mL)	9.205	5.53	6.555	7.58
Q75	4.27	1.25	4.02	5.71	Q75	27.52	26.47	23.36	74.71

Tabla 2: Concentraciones de IL-10 (pg/mL) en sobrenadante de cultivo celular. Cuantificación mediante la técnica de ELISA en sobrenadante celular de células mononucleares aisladas de sangre periférica y expuestas durante 3 o 24 horas con distintas concentraciones de medroxiprogesterona (mg/mL). Los datos son mostrados en mediana y rango intercuartil (Q₇₅-Q₂₅). n=20.

Se realizó también una comparación entre los grupos con la misma cantidad de hormona administrada pero diferente tiempo de exposición a esta, encontrando en la concentración de TNF-alfa una diferencia de 8.8 pg/mL sin estimulación, de 16.77 pg/mL con 2.5 mg/mL, de 18.53 pg/mL con 5 mg/mL, y de 6.53 pg/mL con 10 mg/mL (Figura 2C). Mientras en IL-10, se observó una diferencia en la concentración a la alza entre las 3 y 24 horas, de 8.43 pg/mL sin estimulación, mientras que con la estimulación a diferentes concentraciones del fármaco se observó un incremento del 100% en la concentración de la citocina a las 24 horas, ya que los valores de las concentraciones a 3 horas fueron muy bajos o indetectables (Figura 2D).

Figura 2: Concentraciones de TNF-alfa e IL-10 producidas por leucocitos expuestos a medroxiprogesterona. Las citocinas fueron cuantificadas por la técnica de ELISA en sobrenadante de cultivo celular de leucocitos mononucleares aislados de sangre periférica de mujeres sanas de 18 a 25 años de edad y expuestas por 3 y 24 horas a diferentes concentraciones de medroxiprogesterona (0, 2.5, 5 y 10 mg/mL). **A)** Concentraciones de TNF-alfa (pg/mL) a 3 horas (izquierda) y a 24 horas (derecha). **B)** Concentraciones de IL-10 (pg/mL) a 3 horas (izquierda) y a 24 horas (derecha) **C)** y **D)** Comparación entre concentraciones encontradas de TNF-alfa e IL-10 en los grupos con diferente tiempo de exposición pero misma concentración de la hormona. Los datos están representados en medianas con rango intercuartil 3-1 (Q₇₅-Q₂₅). n=20, *p<0.05, 24 horas comparado con 3 horas.

12.3 Proliferación celular

Por medio de citometría de flujo se buscó el porcentaje de células teñidas con yoduro de propidio expuestas por 3 o 24 horas a concentraciones de 0 mg/mL, como control, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL o 10 mg/mL de medroxiprogesterona, las cuales simulaban las concentraciones promedio que se encuentran en sangre de la hormona durante su administración *in vivo*.

Para su análisis, se determinó la población celular viva de acuerdo a la granularidad y el tamaño, para posteriormente determinar el porcentaje de esas células que emitieron fluorescencia al captar el yoduro de propidio, observándose estas en el cuadrante superior derecho del gráfico de puntos, con un grupo en la parte inferior derecha de células con las mismas características de tamaño y granularidad, pero que no captaron yoduro de propidio o que lo perdieron durante el proceso (Figura 3A).

Los resultados del porcentaje de las células vivas con tinción y sin tinción se muestran en las tablas 3 y 4. Para el caso de las células vivas con tinción de yoduro de propidio, se observó poco cambio en el porcentaje celular a diferentes tiempos y diferentes concentraciones, sin embargo, se puede apreciar una tendencia a la disminución en la población positiva para yoduro de propidio al aumentar la dosis administrada de medroxiprogesterona y el tiempo de exposición a la misma (Figura 3B, Tabla 3).

3 Horas	0 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	24 Horas	0 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
Q25	92.13	89.9	86.74	88.56	Q25	89.02	87.4	90.13	90.8
Mediana %	97.07	94.49	94.79	96.9	Mediana %	97.57	96.39	96.41	94.99
Q75	99.04	99.09	98.28	98.96	Q75	98.15	98.71	97.54	97.39

Tabla 3: Porcentajes celulares (%) a las 3 o 24 horas con distintas concentraciones de medroxiprogesterona (mg/dL) en el cuadrante superior derecho (vivas con tinción de yoduro de propidio). Los datos son mostrados en mediana y rango intercuartil (Q₇₅-Q₂₅). n=17.

Los resultados del cuadrante inferior derecho, vivas pero sin captar yoduro de propidio se muestran en la tabla 4 y Figura 3C. Se observó un incremento en el porcentaje de células vivas sin tinción, dependiente del tiempo de exposición y concentración del fármaco.

3 Horas	0 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	24 Horas	0 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
Q25	0.96	0.915	1.725	1.045	Q25	1.855	1.295	2.465	2.61
Mediana %	2.93	5.51	5.21	3.1	Mediana %	2.43	3.61	3.59	5.01
Q75	7.87	10.1	13.27	11.44	Q75	10.98	12.61	9.87	9.205

Tabla 4: Porcentajes celulares (%) a las 3 o 24 horas con distintas concentraciones de medroxiprogesterona (mg/dL) en el cuadrante inferior derecho (vivas sin tinción de yoduro de propidio). Los datos son mostrados en mediana y rango intercuartil (Q₇₅-Q₂₅). n=17.

Además se determinó la intensidad media de fluorescencia, como representada en los histogramas. Los datos de esta medición se resumen en la tabla 5, donde se muestra, una tendencia a la disminución sin ser estadísticamente significativo a las 3 horas de exposición al fármaco. En las células expuestas durante 24 horas se encontró una ligera tendencia a aumentar, en particular al ser estimuladas con 5 mg/mL, sin ser estadísticamente significativo (Figura 3D, Tabla 5).

3 Horas	0 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	24 Horas	0 mg/mL	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
Q25	475039	487872	468408	465589	Q25	463744	459413	471995	463596
Mediana IMF	496969	497995	490167	483049	Mediana IMF	473621	476562	491950	487148
Q75	509497	507677	502588	499495	Q75	494609	498308	504900	498096

Tabla 5: Intensidad media de fluorescencia (IMF) expresada en unidades arbitrarias (UA) a las 3 o 24 horas con distintas concentraciones de medroxiprogesterona (mg/dL). Los datos son mostrados en mediana y rango intercuartil (Q₇₅-Q₂₅). n=17.

También se realizó la comparación entre los grupos con misma cantidad de hormona administrada pero diferente tiempo de exposición a esta, encontrando en el cuadrante superior derecho diferencias a la alza de 0.5% para el grupo sin estímulo, 1.9% con 2.5 mg/mL, 1.62% con 5 mg/mL, y disminución de 1.91% con 10 mg/mL (Figura 4A). En el cuadrante inferior derecho, se encontró disminución en el porcentaje a las 24 horas, siendo de 0.5% para el grupo sin estímulo, 1.9% con 2.5 mg/mL, 1.62% con 5 mg/mL, y aumento de 1.91% con 10 mg/mL, siendo esencialmente lo mismo que en el cuadrante superior derecho (Figura 4B).

La última comparación realizada fue de la intensidad media de fluorescencia encontrada, con aumento de 23,248 UA en el grupo sin estímulo y 21,433 UA con 2.5 mg/mL, pero con disminución de la fluorescencia de 1,783 UA con 5 mg/mL y 4,099 UA con 10 mg/mL (Figura 4C)

Figura 3.

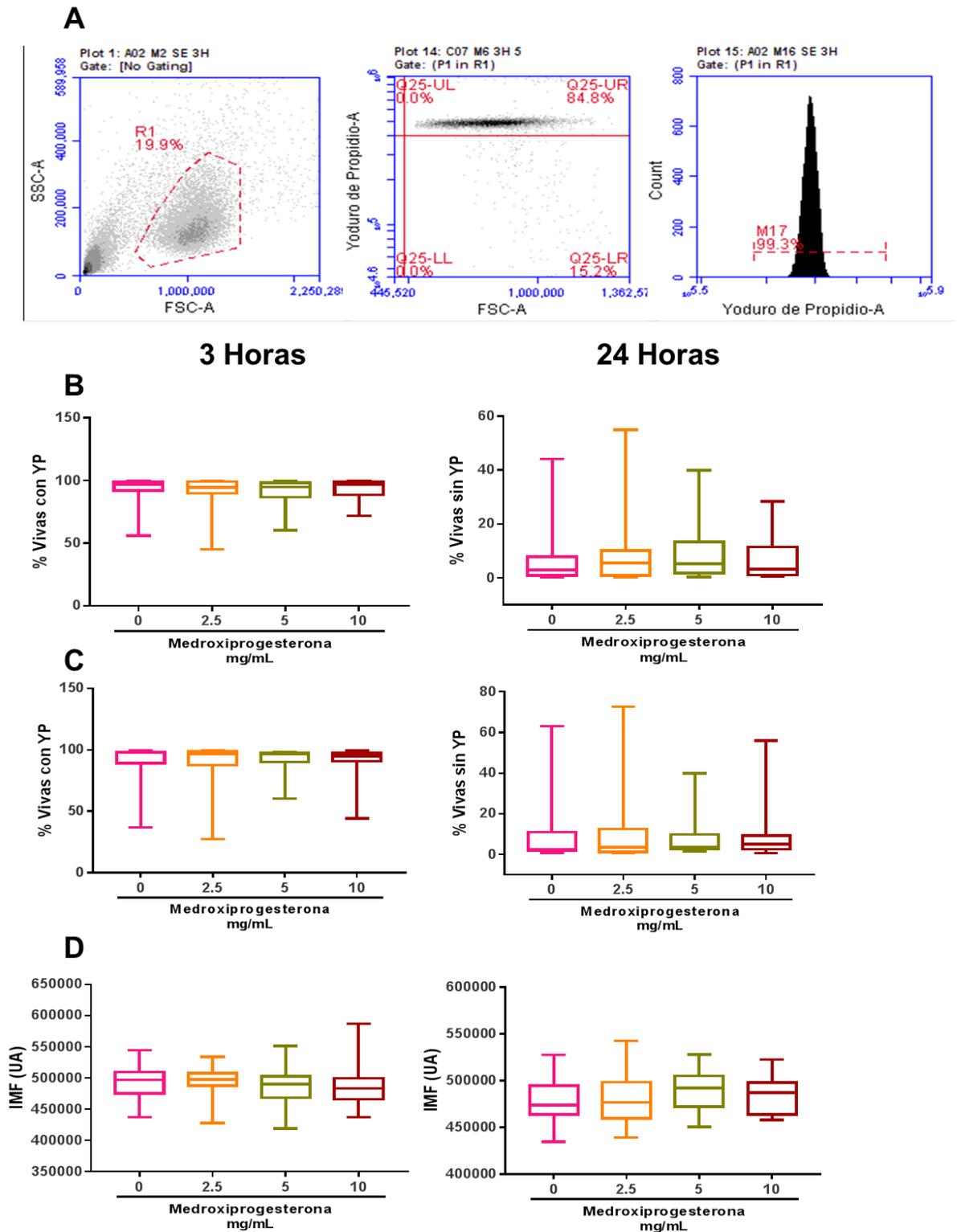


Figura 3: Proliferación celular de leucocitos expuestos a medroxiprogesterona. Proliferación celular de leucocitos mononucleares aislados de sangre periférica de mujeres sanas de 18 a 25 años de edad y expuestos por 3 y 24 horas a diferentes concentraciones de medroxiprogesterona (0, 2.5, 5 y 10 mg/mL). **A)** Diagrama de puntos representativo de población celular viable seleccionada de acuerdo al tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de las células (Izquierda); diagrama de puntos (en medio) de la población de células viables seleccionadas teñidas con yoduro de propidio y viables sin tinción; histograma (derecha) de células positivas a yoduro de propidio. **B)** % de células vivas con tinción de yoduro de propidio a 3 (izquierda) y 24 horas (derecha). **C)** % de células vivas sin tinción de yoduro de propidio a 3 (izquierda) y 24 horas (derecha). **D)** Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de yoduro de propidio de las células con tinción. Los datos están representados en medianas con rango intercuartil 3-1 (Q_{75} - Q_{25}). n=17. YP (yoduro de propidio).

Figura 4.

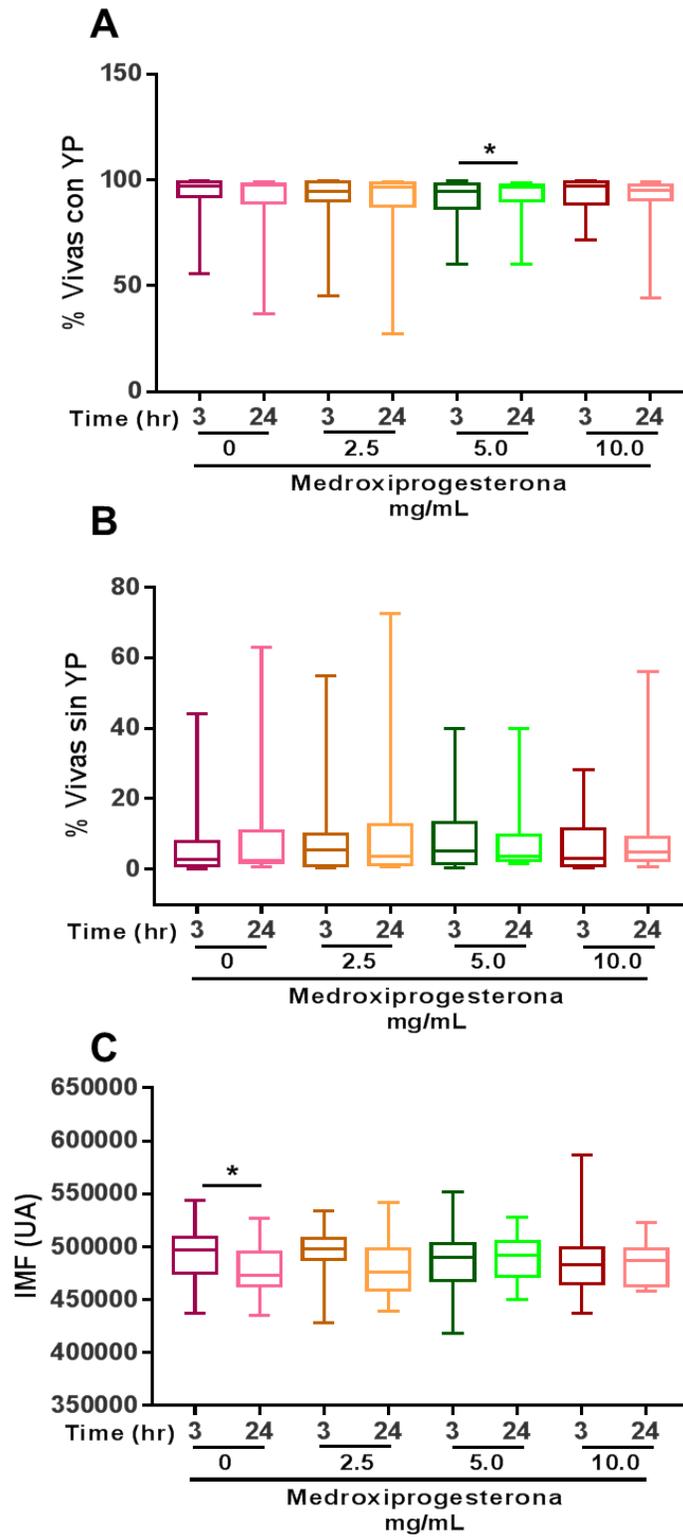


Figura 4: Comparación de células en ciclo celular a 3 y 24 horas de exposición a medroxiprogesterona. Comparación en la proliferación celular de leucocitos mononucleares aislados de sangre periférica de mujeres sanas de 18 a 25 años de edad y expuestos por 3 y 24 horas a diferentes concentraciones de medroxiprogesterona (0, 2.5, 5 y 10 mg/mL). **A)** Comparación de células vivas con yoduro de propidio a 3 y 24 horas. **B)** Comparación de células vivas sin yoduro de propidio a 3 y 24 horas. **C)** Comparación de la intensidad media (IMF) de fluorescencia de las células vivas con yoduro de propidio. Los datos están representados en medianas con rango intercuartil 3-1 (Q_{75} - Q_{25}). n=17. *p<0.05, 24 horas comparado con 3 horas. YP (yoduro de propidio).

13. Discusión

Como ya fue mencionado, en México, el 76.5% de la población sexualmente activa del grupo etario entre los 20 y 49 años de edad, usa algún método anticonceptivo y de este porcentaje, el 6.1% utiliza un método hormonal como anticonceptivo de primera vez. Entre los anticonceptivos usados se incluyen los basados en medroxiprogesterona el cual se encuentra disponible en presentaciones de inyección intramuscular bimensual y en preparados orales⁷.

Las interacciones de los anticonceptivos de progesterona con el sistema inmunológico no se han estudiado de forma particular; sin embargo, se sabe que las células mononucleares del sistema inmunológico presentan receptores hormonales, lo que les permite ser influenciadas por estos y, por ende, sus análogos. En células epiteliales ectocervicales tratadas para simular infección, la administración de medroxiprogesterona causa aumento en la producción de citocinas proinflamatorias y disminución de IL-10, dependiendo de la dosis administrada *in vitro*.²⁶ En nuestro caso, no se observaron cambios estadísticamente significativos en ningún grupo, lo cual puede tener que ver con las células estudiadas, además del tiempo de exposición a esta.

En estudios previos, el aumento o disminución de la TNF-alfa ha dependido del estado fisiológico o patológico en que se encuentre el ambiente estudiado, con variaciones constantes en sus niveles y sin estudios significativos *in vitro* que demuestren un comportamiento específico de la citocina al estar expuesta a medroxiprogesterona o inclusive a progesterona. En nuestro caso, la cuantificación de TNF-alfa demuestra una tendencia constante a la disminución de la citocina al aumentar la dosis y el tiempo de exposición a medroxiprogesterona. La mayor concentración de la citocina se encontró en el grupo con exposición aguda (3 horas), reflejando una posible dependencia no solo en las células estudiadas, sino en el tiempo de exposición, con posibilidad de un resultado estadísticamente significativo si la población muestra hubiera sido mayor; valdría la pena su estudio *in vivo* para observar si es constante esta disminución y se crea un estado antiinflamatorio en las usuarias.

En cuanto a IL-10, fisiológicamente se eleva con el aumento de progesterona para mantener un estado antiinflamatorio beneficioso en el embarazo, que es cuando se presenta el alza de la hormona, con alteraciones en sus niveles en estados patológicos como en el parto pretérmino^{32,33}. En nuestro caso, sin embargo, los resultados fueron poco satisfactorios, ya que la cantidad detectada de la citocina fue mínima, inclusive menor al rango de detección de nuestros kits de ELISA. Sin embargo, la tendencia encontrada fue que con el mayor tiempo de exposición hay tendencia a la disminución en la mediana pero con aumento en el tercer cuartil, principalmente durante la exposición prolongada. Este resultado no es comparable con resultados previos en otras líneas celulares, pero tiene la posibilidad de que al aumentar el tiempo de exposición y la muestra poblacional pudieran encontrarse lecturas significativas, en particular al observar la comparación entre los grupos con distinto tiempo de

exposición, que sugieren que simulando una exposición realmente crónica se podrían observar resultados significativos.

En cuanto a la citometría de flujo, la cual fue realizada buscando una disminución en la proliferación celular, los resultados no fueron los esperados pero sí de interés. En estudios previos se había encontrado un aumento inicial en la proliferación de células de cáncer con subsecuente disminución a las 72 horas posteriores⁴¹. Sin embargo, su efecto en la proliferación de células en tejidos no asociados con estimulación hormonal no ha sido ampliamente estudiado, con vaga evidencia de que la exposición a medroxiprogesterona disminuye la proliferación celular y por ende la secreción de reguladores de la respuesta humoral contra patógenos invasores, de particular interés en pacientes infectados con VIH⁴²

En nuestro caso, no se observó proliferación celular *per se*, ya que en los histogramas se encontró un único pico de captación de yoduro de propidio, el cual se adhiere al ADN y nos permite cuantificar la disminución de este en caso de división celular. Se observaron algunas variaciones en la cantidad de yoduro de propidio en las células analizadas, en ocasiones con ligero aumento o disminución, pero sin un patrón o tendencia que nos oriente a algún resultado o estimación de qué pasaría con una población más amplia. Tampoco hubo diferencias significativas entre los diversos tiempos de exposición.

Sin embargo, al observar las poblaciones de células vivas que captaron y no captaron el yoduro de propidio, se encontró un aumento constante, aunque no significativo, en el grupo celular que no captó el fluorocromo. Las células apoptóticas presentan fragmentación del DNA, que podría ser lo que se está observando en esta situación; no obstante, existen diversos tipos de apoptosis que no involucran la fragmentación del ADN y en muchos casos podría no ser este proceso, ya que podría encontrarse el mismo resultado en células necróticas, fragmentos de núcleo y cromosomas amontonados, por lo cual es complicado estimar si podría tratarse de un núcleo apoptótico o de basura nuclear únicamente analizando con yoduro de propidio⁴⁷.

Es importante tomar en cuenta el ambiente en el que fue realizado el estudio, ya que aunque pueden ser de gran relevancia científica el poder controlar ciertas variables y las condiciones del ambiente para llevar a cabo un estudio *in vitro*, y por ende el contexto en el que serán interpretados los resultados, las limitaciones son conocidas. Al depender las células de que el ambiente en el que se desarrollen sea controlado a la perfección para su adecuado desarrollo, las poblaciones celulares están expuestas a otras variables que en el cuerpo humano no, y viceversa. Con menos variables, los resultados que se pueden obtener son en teoría más limpios, pero no siempre representativos de lo que sucedería con un modelo *in vivo*. En este caso, no sólo la limitante del ambiente juega un papel importante, sino también la población muestra, ya que es difícil que se alcance una muestra representativa de la población femenina en México si no se cuenta con los recursos para acceder a esta, siendo nuestra población únicamente quienes quisieron participar en el proyecto, de forma gratuita, dentro de la población Universitaria en la Facultad de Medicina. Otra limitación fueron los recursos

financieros con los que se cuenta, que si bien fueron otorgados, se necesitarían muchos más para poder explorar más opciones de citocinas que podrían alterarse con la exposición a análogos de progesterona, así como investigar otras variables, en particular durante la proliferación celular.

Es importante mencionar, que en este trabajo la selección de las citocinas fue adecuada, ya que son las más representativas en su rango y de las que más podríamos encontrar resultados con poco tiempo de exposición basándonos en los antecedentes científicos. Aunque no se logró demostrar una disminución en la proliferación celular, el yoduro de propidio dio pie a investigar la relación que pudiera tener esta hormona con la apoptosis, la cual no ha sido estudiada previamente.

14. Conclusiones y perspectiva a futuro

La relevancia de este estudio radica en el uso amplio e indiscriminado de los métodos anticonceptivos en la población mexicana. Pese a que se han relacionado con diversas patologías, los basados en progesterona no se habían estudiado ampliamente al considerarse inocuos. La alteración de la homeostasis del sistema inmunológico, tanto de la producción de citocinas como en la proliferación celular, puede traer consecuencias para la salud, por lo cual es necesaria una mejor comprensión de los posibles riesgos a los que se expone la población femenina al hacer uso de estos fármacos.

Aunque nuestros resultados no fueron concluyentes o estadísticamente significativos, las tendencias observadas por TNF-alfa para disminuir comprueban nuestra hipótesis, aunque en el caso de IL-10 se observara que los resultados buscados se encontrarían probablemente con un aumento en el tiempo de exposición. Así mismo, aunque la proliferación celular no pudo ser comprobada como se buscaba en la hipótesis, tanto nula como alterna, sí ayudo a encontrar nuevas interrogantes y a sugerir que podría enfocarse en apoptosis.

Por estos resultados y con estas mismas variables, podría llegarse a resultados significativos si se aumentara la muestra poblacional. Sin embargo, las oportunidades que presenta para crecimiento son mayores, por las interrogantes surgidas a lo largo del proceso.

Hay posibilidad de aumentar la cantidad de citocinas cuantificadas, con tiempos de exposición más largos buscando observar los efectos de la exposición, hasta cierto punto, crónica. Además, existe la posibilidad de realizar el estudio en mujeres en las que se controle la administración de la hormona, el tiempo de exposición a esta y así obtener resultados fidedignos de su actuar en el modelo *in vivo*.

En cuanto a la proliferación celular, solo el aumentar la población muestra podría ayudar a obtener resultados concluyentes; sin embargo, con la nueva interrogante de la apoptosis, estudios futuros podrían centrarse en usar marcadores específicos para la búsqueda de fragmentos de ADN, eliminando otras variables y enfocándose en tiempos prolongados de exposición.

Como ya se ha expuesto, la planificación familiar a través del uso de métodos anticonceptivos ha sido uno de los grandes avances del siglo XX y fundamental para la salud pública. Su uso amplio no debe ser moderado sin bases científicas que nos ayuden a orientar las políticas para la protección del paciente. Con estudios más profundos y prolongados, se podría llegar a conclusiones que ayudaran a escoger con mayor veracidad el método anticonceptivo de preferencia para cada paciente, y evaluar los riesgos personales de estos, con subsecuente mejoría en la salud de la población y continuando con las libertades establecidas en nuestro país.

15. Bibliografía

1. https://www.who.int/reproductivehealth/about_us/en/
2. <https://datos.gob.mx/busca/dataset/indicadores-de-fecundidad-y-salud-reproductiva-ods/resource/64e29847-0639-45e8-815e-a82bf7b0a458>
3. <http://www.gob.mx/conapo>
4. www.plannedparenthood.org.
5. www.oecd.org/els/social/childwellbeing
6. <http://cnegsr.salud.gob.mx/contenidos/descargas/PlanFam/PlanificacionFamiliaAnticoncepcion.pdf>
7. www.inegi.org.mx
8. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/66398/SaludSexualyReproductivaMX.pdf>
9. Katzung, B. G., Masters, S. B., Trevor, A. J., *Basic and clinical pharmacology*, 18ava Edición McGraw-Hill Medical, 2012.
10. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00603>
11. <https://www.pfizermedicalinformation.com/en-us/provera/clinical-pharmacology>
12. https://www.pfizerpro.com.pe/sites/g/files/g10029046/f/201510/Depo-provera-peru_0.pdf
13. Li C, Beaber, EF, Tang MT, Poryer PL, Darling JR, Malone KE. Effect of depo-medroxyprogesterone acetate on breast cancer risk among women 20–44 years of age. *Cancer research*. 2012; 72 (8): 2028–2035.
14. Hughes GC, Clark EA, Wong AH, The intracellular progesterone receptor regulates CD4⁺T cells and T cell-dependent antibody responses. *J Leukoc Biol*. 2013; 93 (3): 369-375
15. Srivastava MD, Anderson DJ. Progesterone receptor expression by human leukocyte cell lines: molecular mechanisms of cytokine suppression. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2007;34 (1):14-24.
16. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon, *Immunol Today* 1993;14:353–356.
17. Raghupathy R, Szekeres-Bartho J. Dydrogesterone and the immunology of pregnancy. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016;27(2):1–9.
18. Engelmann F, Rivera A, Park B, Messerle-Forbes M, Jensen JT, Messaoudi I. Impact of estrogen therapy on lymphocyte homeostasis and the response to seasonal influenza vaccine in post-menopausal women. *PLoS One*. 2016;11(2):e149045.
19. Scheibl P, Zerbe H. Effect of progesterone on the immune system in consideration of bovine placental retention. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 2000; 107 (6):221–227.
20. Murray RZ, Stow JL. Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking. *Front Immunol*. 2014;5:538.
21. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. Novena edición. Garland Science. 2008.

22. Male D. Immunology: An Illustrated Outline. Quinta edición. Garland Scienc. 2014.
23. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008;180 (9):5771–5777.
24. Groux H, Cottrez F. The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. *J Autoimmun* 2003; 20 (4):281–285.
25. Yates MA, Li Y, Chlebeck P, Proctor T, Vandembark AA, Offner H. Progesterone treatment reduces disease severity and increases IL-10 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2010; 220(1–2):136–139.
26. Weissenbacher T, Laubender RP, Witkin SS, Gangelmaier A, Schiessl B, Kainer F, et al. Diagnostic biomarkers of pro-inflammatory immune-mediated preterm birth. *Arch Gynecol Obstet.* 2013; 287(4):673–685.
27. Mobini M, Mortazavi M, Nadi S, Zare-Bidaki M, Pourtalebi S, Arababadi MK. Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(2):119–124
28. Louw-du Toit R, Hapgood JP, Africander D. Medroxyprogesterone acetate differentially regulates interleukin (IL)-12a and IL-10 in a human ectocervical epithelial cell line in a glucocorticoid receptor (GR)-dependent manner. *J Biol Chem.* 2014; 289 (45):31136–31149.
29. Jameson JL, DeGroot LJ, De Kretser DM, David M., Giudice L, Grossman A, Melmed S, et al. *Endocrinology: adult and pediatric 7th edition.* Saunders; 2016.
30. Meng Y, Murtha AP, Feng L. Progesterone, Inflammatory Cytokine (TNF- α), and Oxidative Stress (H₂O₂) Regulate Progesterone Receptor Membrane Component 1 Expression in Fetal Membrane Cells. *Reprod Sci.* 2016; 23 (9):1168–1178.
31. Calleja Agius J, Shanthi Muttukrishna S, Jauniaux E. The role of tumor necrosis factor-receptors in pregnancy with normal and adverse outcome. *Int J Interf Cytokine Mediat Res.* 2012; 4:1–15.
32. Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Llubra E, Gris JM. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Pregnancy: Focus on Biologics. An Updated and Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017; 53 (1): 40–53.
33. Aydin F, Ulusoy S, Ovali E, Sonmez M. Effect of High-Dose Medroxyprogesterone Acetate on Tumor Necrosis Factor-Alpha Release in Patients with Chemotherapy-Induced Neutropenia. *J Chemother.* 1997; 9 (5):377–381.
34. Sahin B, Albayrak BS, Ismailoglu O, Gorgulu A. The effects of medroxy progesterone acetate on the pro-inflammatory cytokines, TNF-alpha and IL-1beta in the early phase of the spinal cord injury. *Neurol Res.* 2011; 33 (1):63–67.
35. Mooney SM, Lein PJ, Miller MW. *Neural Circuit Development and Function in the Brain.* Primera edición Elsevier. 2013.
36. Casem ML. *Case Studies in Cell Biology.* Primera edición. Elsevier. 2016.
37. Baserga R. *The biology of cell reproduction.* Primera edición. Harvard University Press. 1985.
38. Clarke CI, Sutherland RI. Progesterone Regulation of Cellular Proliferation. *Endocr Rev.* 1990; 11 (2):266–301.

39. Chen CC, Hardy DB, Mendelson CR. Progesterone receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells via induction of MAPK phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1). *J Biol Chem*. 2011; 286 (50):43091–43102.
40. Wood CE, Branstetter D, Jacob AP, Cline JM, Register TC, Rohrbach K, et al. Progestin effects on cell proliferation pathways in the postmenopausal mammary gland. *Breast Cancer Res*. 2013;15 (4):R62.
41. Rose PG. Endometrial Carcinoma. *N Engl J Med*. 1996; 335 (9):640–649.
42. Kim JJ, Chapman-Davis E. Role of progesterone in endometrial cancer. *Semin Reprod Med*. 2010; 28 (1): 81–90.
43. Saitoh M, Ohmichi M, Takahashi K, Kawagoe J, Ohta T, Doshida M, et al. Medroxyprogesterone Acetate Induces Cell Proliferation through Up-Regulation of Cyclin D1 Expression via Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Nuclear Factor-κB Cascade in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology*. 2018;146 (11): 4917–4925.
44. Kim JJ, Chapman-Davis E. Role of progesterone in endometrial cancer. *Semin Reprod Med*. 2010; 28 (1): 81–90.
45. <https://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales2Ed.pdf>
46. Tian JM, Ran B, Zhang CL, Yan DM, Li XH. Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2018; 51(3): e5612
47. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature*. 2006; 1(3): 1458-1461

16. Anexos

ANEXO 1: FORMATO DE HISTORIA CLÍNICA

Fecha: _____

Nombre de quien aplica: _____

1. Ficha de Identificación y datos de contacto

Nombre _____	Edad _____	Sexo _____
Nacionalidad _____	Edo. Civil _____	Fecha Nac. _____
Ocupación _____	Tipo Sanguíneo _____	
Lugar de Origen _____	Lugar de residencia _____	Teléfono _____
Correo electrónico _____	Domicilio _____	

2. Antecedentes Heredo-Familiares

Familiar directo que padezca algún cáncer ginecológico (incluyendo cáncer de mama). (¿Quién? ¿Cuándo? ¿Qué tipo?)	
Familiar directo que haya fallecido por algún cáncer ginecológico (incluyendo cáncer de mama). (¿Quién? ¿Cuándo? ¿Qué tipo?)	
Familiares directos que hagan o hayan hecho uso de/usen actualmente métodos anticonceptivos hormonales. (¿Cuál? ¿Cuánto tiempo?)	
Familiar directo que padezca/haya padecido o fallecido por cualquier tipo de cáncer, desbalance hormonal, diabetes mellitus, enfermedad	

tiroidea, etc.	
Otros (enfermedades quísticas benignas en familiares directos)	

3. Antecedentes personales patológicos

Antecedentes de algún cáncer ginecológico (cáncer de mama, ovario, endometrio, útero, etc.)	
Antecedentes de tratamiento para cualquier tipo de cáncer	
Antecedentes de diabetes mellitus, eventos trombóticos, hemofilia, hipertensión, sangrado uterino anormal, enfermedades autoinmune, enfermedades renales o hepáticas, enfermedad tiroidea, enfermedad hormonal previa o enfermedad actual/antecedente que podría interferir con el estudio	

4. Antecedentes personales no patológicos

Tabaquismo SI/NO	Cigarros Consumidos al día	Años de consumo
Alcoholismo SI/NO	Bebida alcohólica consumida	Frecuencia
Toxicomanías SI/NO	Sustancia consumida	Frecuencia
Alimentación (enliste alimentos consumidos en un día normal divididos por Desayuno, Comida,		

Cena)	
Deportes	
Alergias/Hipersensibilidad	
Otros	

5. Antecedentes gineco-obstétricos

Menarca	
Ciclo menstrual (Regular/Irregular)	
Vida sexual	
FUR	
Método anticonceptivo actual y previo (Ninguno, Hormonal, de Barrera → Tiempo usándolo, marca, experiencia, etc)	
Embarazos/partos/cesáreas	
¿Está embarazada (o sospecha) en la actualidad o amamantando?	
Otros	

6. Padecimiento actual

Al momento de la historia clínica

¿Está enferma al momento del estudio?	
Antibióticos	
Medicamento de uso regular	

Al momento del estudio

¿Está enferma al momento del estudio?	
Antibióticos	
Medicamento de uso regular	

7. Signos vitales al momento de la historia clínica

FC	
FR	
TA	
Glucosa	
Temperatura	
Peso	
Altura	
IMC	

Al momento del estudio

FC	
FR	
TA	
Glucosa	
Temperatura	
Peso	
Altura	
IMC	

ANEXO 2 : FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Efecto de la exposición in vitro de medroxiprogesterona en la producción de citocinas y proliferación celular por células mononucleares aisladas de sangre periférica de mujeres sanas de 18 a 25 años”

El objetivo del presente proyecto de investigación es analizar el efecto de la exposición de leucocitos en circulación a acetato de medroxiprogesterona sobre la producción de citocinas en leucocitos y la proliferación celular. La justificación incluye un más profundo entendimiento del papel que juega el sistema endócrino en el sistema inmunológico y que la alteración de la homeostasis del sistema inmunológico, tanto de su producción de citocinas como de su proliferación, puede traer consecuencias para la salud, por lo cual es necesaria una comprensión adecuada de los posibles riesgos a los que se expone la población femenina.

Se tomará una muestra de sangre por punción venosa de 10 mL con jeringa y aguja desechable y estéril, la paciente puede presentar molestias leves al momento de insertar la aguja en la piel y al retirarla. Posibles complicaciones del procedimiento incluyen hematoma o equimosis en caso de desgarro venoso, infección en el sitio de punción o síncope por estimulación vagal, así como mareo o debilidad, se asegura al paciente que se tomarán todas las medidas necesarias para evitar estas complicaciones, como enguantado con técnica estéril, realizar asepsia y cuidados generales a la paciente posterior a la extracción.

He leído, comprendido y discutido la información anterior con el investigador responsable del estudio y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. Mi participación en este estudio es voluntaria y aleatoria, podré renunciar a participar en cualquier momento, sin causa y sin responsabilidad alguna. Si durante el transcurso de la investigación, surge información relevante para continuar participando en el estudio, el investigador deberá entregar esta información. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos y/o educativos, manteniendo mi privacidad y datos personales confidenciales. A su vez, he sido informado sobre los posibles riesgos que conlleva el estudio, siendo esta una *Investigación con riesgo mínimo*. Si durante el transcurso de la investigación me surgen dudas respecto a la investigación o sobre mi participación en el estudio, puedo contactarme con el investigador responsable.

Yo, _____ **Acepto participar en este estudio de investigación titulado “Efecto de la exposición in vitro de medroxiprogesterona en la producción de citocinas y proliferación celular por células mononucleares aisladas de sangre periférica de mujeres sanas de 18 a 25 años”**

Firma del participante

Firma del Primer Testigo

Firma del Primer Testigo

Investigador:

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha: _____

ANEXO 3: Aprobación del comité de ética en investigación



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

Comité de Ética en Investigación
Oficio No.005/2015

01 de Junio de 2015

DRA. IRAZU CONTRERAS GARCIA
INVESTIGADOR PRINCIPAL

PRESENTE

Por este medio le envié un cordial saludo, y en respuesta a su Solicitud de Evaluación del Protocolo de Investigación "EFECTO DE LA EXPOSICION DE ANALOGOS DE PROGESTERONA EN LA PRODUCCION DE CITOCINAS POR LEUCOCITOS EN CIRCULACION", el Comité de Ética en Investigación dictamina como **APROBADO** el proyecto antes mencionado.

Sin otro particular por el momento, agradezco su atención dada a la presente.

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"

FACULTAD DE MÉDICINA



M. EN I.C. JOAQUIN ROBERTO BELTRAN SALGADO
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

**COMITE DE ÉTICA
EN INVESTIGACIÓN**



**FACULTAD DE
MEDICINA**

c.c.p Dra. en C.S.P. Lilia Patricia Bustamante Montes/ Directora de la Facultad de Medicina
c.c.p Archivo/JRBS*DRM



www.uaemex.mx