

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



**Efecto del uso de implante subdérmico de etonogestrel sobre la producción de citocinas y proliferación celular en leucocitos en circulación en mujeres sanas de 18 a 30 años**

## **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO**

### **PRESENTA:**

M.P.S.S. María Carolina Erazo Muñoz

### **Directores de Tesis:**

Ph.D. Irazú Contreras García

Ph.D. José Antonio Estrada Guadarrama

### **Revisores de Tesis:**

Ph.D. Keila Isaac Olivé

Dra. en C. Beatriz Elina Martínez Carrillo

## Índice

<b>1. Título</b>	<b>3</b>
<b>2. Resumen</b>	<b>4</b>
<b>3. Introducción</b>	<b>5</b>
<b>4. Marco Teórico</b>	<b>7</b>
4.1 Anticoncepción en México	7
4.1.1 Progesterona	7
4.1.2 Análogos de progesterona	10
4.1.3 Etonogestrel	10
4.1.3.1 Estructura química	11
4.1.3.2 Historia	12
4.1.3.3 Farmacocinética	12
4.1.3.4 Farmacodinamia	13
4.1.3.5 Efectos secundarios	13
4.2 Citocinas	15
4.2.1 IL-10	15
4.2.2 TNF- $\alpha$	16
4.2.3 IL-1 $\beta$	18
4.3 Proliferación celular	20
4.4 Relación de la progesterona con el sistema inmune	21
<b>5. Planteamiento del problema</b>	<b>24</b>
<b>6. Justificaciones</b>	<b>26</b>
<b>7. Hipótesis</b>	<b>27</b>
<b>8. Objetivos</b>	<b>28</b>
8.1 Objetivo general	28
8.2 Objetivos específicos	28
<b>9. Metodología</b>	<b>29</b>
9.1 Tipo de estudio	29
9.2 Operacionalización de variables	29
9.3 Universo de trabajo	30
9.4 Método de muestreo	30
9.5 Tamaño de muestra	30
9.6 Criterios de inclusión y exclusión	31
9.7 Desarrollo de proyecto	31
9.7.1 Aislamiento de leucocitos mononucleares de sangre periférica	32
9.7.2. Cuantificación por citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10) por el método de ELISA	33
9.7.3. Determinación de células en ciclo celular por medio de citometría de flujo	34
9.8 Límite de tiempo y espacio	34
9.9 Diseño de análisis	35
9.10 Implicaciones éticas	35
9.11 Organización y financiamiento	36
<b>10. Resultados</b>	<b>37</b>
10.1 Tablas, figuras y leyendas de figuras	40

<b>11. Discusión</b>	<b>44</b>
<b>12. Conclusiones y perspectivas futuras</b>	<b>48</b>
<b>13. Bibliografía</b>	<b>49</b>
<b>14. Anexos</b>	<b>52</b>
14.1 Anexo 1. Historia Clínica	<b>52</b>
14.2 Anexo 2. Formato de consentimiento informado	<b>55</b>
14.3 Anexo 3. Soluciones y diluciones para la técnica de ELISA	<b>56</b>
14.4 Anexo 4. Aprobación del comité de Ética en Investigación	<b>57</b>

## **1. Título**

**Efecto del uso de Implante subdérmico de etonogestrel sobre la producción de citocinas y proliferación celular en leucocitos en circulación en mujeres sanas de 18 a 30 años**

## 2. Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo principal analizar el efecto del uso del implante anticonceptivo de etonogestrel sobre la producción de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10) y sobre el ciclo celular de leucocitos. Para este fin, se estudiaron muestras de sangre de 13 mujeres que se encontraban en tratamiento con etonogestrel y 11 mujeres sin tratamiento. Se obtuvieron muestras de sangre por punción venosa, se separó el plasma y se aislaron los leucocitos mononucleares para su cultivo y estimulación antigénica. La concentración de citocinas se midió tanto en plasma como en el sobrenadante del cultivo celular por medio de la técnica de ELISA. Por citometría de flujo, se midió el porcentaje de células en ciclo celular con la técnica de incorporación de yoduro de propidio.

Nuestros resultados mostraron que en plasma, la única citocina que tuvo una diferencia estadísticamente significativa fue la IL-10, siendo menor su concentración en el grupo experimental de etonogestrel. En cuanto la producción de las citocinas por los leucocitos con y sin estímulo antigénico, se observó que la IL-10 y TNF- $\alpha$  presentaron una disminución en la concentración en el mismo grupo experimental. En la proliferación celular no observamos cambios importantes entre grupos.

Estos resultados preliminares muestran que pudieran existir alteraciones en la producción de citocinas en mujeres que utilizan este tipo de métodos anticonceptivos; sin embargo, es necesario ampliar el tamaño de la muestra para determinar más precisamente sus efectos sobre las células del sistema inmunológico.

### **3. Introducción**

En estudios anteriores, se ha observado que existe una estrecha relación entre el funcionamiento del sistema inmune y la producción de hormonas femeninas. Los estrógenos están estrechamente relacionados con el aumento de la expresión de citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). De modo inverso, el embarazo se ha ligado con una reducción en los factores inmunológicos pro-inflamatorios, debido a la acción de la progesterona, resultando en una inmunosupresión general al inicio de este (1). Desde 1973, en nuestro país se empezó a difundir el uso de anticonceptivos con el fin de implementar estrategias para controlar la natalidad. Actualmente, se estima que el 10.2% de las mujeres con vida sexual activa usan métodos anticonceptivos hormonales de manera constante (2). Los métodos hormonales se componen con base en dos hormonas femeninas; el estrógeno y la progesterona (3).

De los estrógenos, se han estudiado algunos efectos, como el aumento de peso, alteraciones en el ciclo menstrual y relación con diversas patologías, como fibrosis mamaria, cáncer de ovario, cáncer de mama. Sin embargo, en lo referente a los métodos basados en progesterona, como son la mini-píldora de etonogestrel, la inyección de medroxiprogesterona y el implante subdérmico de etonogestrel, no se tienen estudios que expliquen sus efectos fuera de la función anticonceptiva (3).

Se ha encontrado que concentraciones elevadas de progesterona en la sangre dan como resultado un curso más severo y una persistencia más prolongada de bacterias en enfermedades infecciosas, ya que la progesterona suprime componentes específicos del sistema inmune y la actividad de los linfocitos asesinos naturales (NK), aunque de la misma manera aumentan la quimiotaxis y presencia de leucocitos en sangre (4).

El objetivo del presente estudio fue observar la acción del etonogestrel sobre la producción de citocinas por leucocitos y el ciclo celular de los mismos, en mujeres que se encontraban en tratamiento anticonceptivo con etonogestrel en forma de

implante subdérmico, presumiendo que este se comportaría de la misma manera que la progesterona, reduciendo la producción de citocinas y la proliferación de leucocitos en circulación.

## **4. Marco teórico**

### **4.1 Anticoncepción en México**

La anticoncepción como base de la planificación familiar constituye uno de los principales pilares de bienestar de una sociedad, ya que disminuyen de manera indirecta la pobreza, la mortalidad materna e infantil y promueve la igualdad y empoderamiento de las mujeres. México inicia su transformación en cuanto a lo correspondiente a anticoncepción en 1973, cuando se incluye en el artículo 4° de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos el derecho a decidir el número de hijos (3).

En 1977, se publica el Plan Nacional de Planificación Familiar 1977-1979, por medio del cual las instituciones de salud mexicanas emprendieron acciones de promoción y aplicación de métodos de planificación familiar. Se observó el resultado con una reducción de la tasa de fecundidad de 7.26 hijos por mujer en 1962 a 3.43 en 1990, y a 2.01 en 2012.

En México, según datos arrojados por 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, aumentando el porcentaje a 10.2% con las que utilizan la pastilla anticonceptiva de emergencia (2).

Los métodos hormonales utilizados en la medicina, son basados en los análogos de dos hormonas femeninas: los estrógenos, y la progesterona. Estos medicamentos usualmente son utilizados de manera sinérgica, en combinaciones de análogos de cada uno; sin embargo, la progesterona por si misma consigue un efecto anticonceptivo, a diferencia del estrógeno.

#### *4.1.1 Progesterona*

La progesterona (P4) es un esteroide endógeno y hormona sexual progestágena involucrada en el ciclo menstrual, el embarazo y la embriogénesis de humanos y

otras especies. Pertenece a un grupo de hormonas esteroides llamadas progestógenos y es el principal progestágeno en el cuerpo. La progesterona tiene una variedad de funciones importantes en el cuerpo, como el desarrollo mamario, la regulación del ciclo menstrual y el desarrollo del embarazo. También es un intermedio metabólico crucial en la producción de otros esteroides endógenos, incluidas las hormonas sexuales y los corticosteroides, y desempeña un papel importante en la función cerebral como neuroesteroide (5).

La progesterona previene la activación de los mineralocorticoides, uniéndose a este receptor con una afinidad que excede incluso a la de la aldosterona y los glucocorticoides, como el cortisol y la corticosterona, y produce efectos antimineralocorticoides, como la natriuresis (6).

La progesterona, a través de sus metabolitos activos neuroesteroideos, como 5-alfa-dihidroprogesterona y alopregnanolona, actúa indirectamente como un modulador alostérico positivo del receptor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), potenciando así su efecto como neurotransmisor inhibitorio (7). De acuerdo con esto, la progesterona induce la producción de varias enzimas hepáticas relacionadas al citocromo P450, como la CYP3A4, especialmente durante el embarazo, cuando sus concentraciones son mucho más altas de lo normal. Se ha encontrado que las mujeres menopáusicas tienen una mayor actividad de CYP3A4 en relación con los hombres y las mujeres posmenopáusicas, y se ha inferido que esto puede deberse a los niveles más altos de progesterona presentes en las mujeres menopáusicas (8).

La progesterona tiene una serie de efectos fisiológicos que se amplifican en presencia de estrógenos. Los estrógenos a través de los receptores de estrógenos (ER) inducen o regulan positivamente la expresión de los receptores de progesterona (RP). Un ejemplo de esto es en el tejido mamario, donde los estrógenos permiten a la progesterona mediar en el desarrollo lóbulo-alveolar.

Los niveles elevados de progesterona reducen de manera potente la actividad retenedora de sodio de la aldosterona, lo que produce natriuresis y una reducción en el volumen de líquido extracelular. La extracción de progesterona, por otro lado, se asocia con un aumento temporal de la retención de sodio (natriuresis reducida, con un aumento en el volumen de líquido extracelular), debido al aumento compensatorio en la producción de aldosterona, que combate el bloqueo del receptor de mineralocorticoides por la elevación previa del nivel de progesterona (9).

La progesterona tiene efectos clave a través de la señalización no genómica en los espermatozoides humanos, ya que migran a través del tracto femenino antes de que se produzca la fecundación, aunque estos receptores todavía no se han identificado. La caracterización detallada de los eventos que ocurren en los espermatozoides en respuesta a la progesterona ha elucidado ciertos eventos, que incluyen cambios transitorios en las concentraciones de calcio intracelular, que posiblemente regulan la motilidad de los espermatozoides (10).

La progesterona, a la que también se le llama la "hormona del embarazo", tiene muchos roles relacionados con el desarrollo del feto: la progesterona convierte el endometrio en su etapa secretora para preparar el útero para la implantación. Al mismo tiempo, la progesterona afecta el epitelio vaginal y el moco cervical, por lo que es grueso e impenetrable para los espermatozoides. La progesterona es antimitogénica en las células epiteliales endometriales y como tal, mitiga los efectos tróficos del estrógeno. Si no ocurre el embarazo, los niveles de progesterona disminuyen, llevando a la menstruación, la cual es la renovación del tejido del útero por deprivación de progesterona. Si no se produce la ovulación y no se desarrolla el cuerpo lúteo, los niveles de progesterona pueden ser bajos, lo que conduce a una hemorragia uterina disfuncional anovulatoria (11).

Durante la implantación y la gestación, la progesterona parece disminuir la respuesta inmune materna para permitir la aceptación del embarazo. La

progesterona disminuye la contractilidad del músculo liso uterino. Además, la progesterona inhibe la lactancia durante el embarazo. La caída en los niveles de progesterona después del parto es uno de los factores desencadenantes de la producción de leche. Una caída en los niveles de progesterona es posiblemente un paso que facilita el inicio del parto, además el feto metaboliza la progesterona placentaria en la producción de esteroides suprarrenales (11). Por sus efectos uterinos, el uso de sus análogos es preferido como anticonceptivo, ya sea en forma combinada (con análogos de los estrógenos) o por si solos.

#### *4.1.2 Análogos de progesterona*

Los análogos de progesterona de primera generación utilizados dentro de la anticoncepción son la noretisterona (NET), la noretindrona (NE), el diacetato de etinidol y el linestrenol (LYN). Por otra parte, el levonorgestrel (LNG) y el norgestrel (NG) son los progestágenos de segunda generación, y entre los de tercera generación se incluyen el desogestrel (DSG), su derivado etonogestrel (ETG), el gestodeno (GSD) y el norgestimato (NGM). Actualmente, el LNG es probablemente el progestágeno más usado y se lo combina, predominantemente, con 30 µg de etinil estradiol en anticonceptivos orales combinados, así como por si sólo en la mini-píldora y en la pastilla de anticoncepción de emergencia (12).

Por la manera de aplicación de los anticonceptivos, el etonogestrel se encuentra cada vez más difundido en su presentación de implante subdérmico, ya que su duración es mayor, necesitando menor concentración hormonal para lograr resultados.

#### *4.1.3 Etonogestrel*

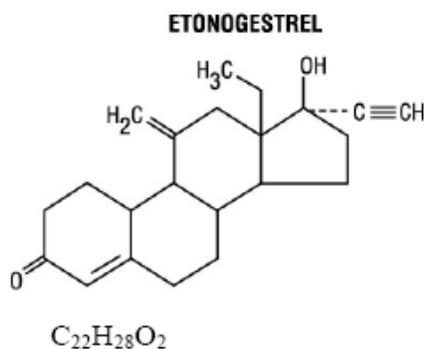
El etonogestrel es un medicamento/progestina que se usa como un método anticonceptivo para mujeres (13). Está disponible solo como un implante colocado debajo de la piel de la parte superior del brazo, bajo las marcas registradas de Nexplanon® e Implanon® y en combinación con etinilestradiol, un estrógeno que

se utiliza como un anillo vaginal bajo las marcas registrada de NuvaRing® y Circlet®. El etonogestrel es eficaz como método anticonceptivo a partir de las 8 horas de la inserción (14).

El etonogestrel es un progestágeno, o un progestágeno sintético, y por lo tanto, es un agonista del receptor de la progesterona, que es el objetivo biológico de los progestágenos, como la progesterona. Tiene actividad androgénica y glucocorticoide muy débil y ninguna otra actividad hormonal importante (15). El etonogestrel se introdujo para uso médico en 1998 (16).

#### 4.1.3.1 Estructura química

Etonogestrel, también conocido como 11-metileno-17-alfa-etinil-18-metil-19-nortestosterona o como 11-metileno-17-alfa-etinil-18-metilestr-4-en-17-beta-ol-3-ona, es un estrano sintético esteroides y un derivado de la testosterona. Es más específicamente un derivado de noretisterona (17.alfa-etinil-19-nortestosterona) y es un miembro del subgrupo de gonane (18-methylestrane), de la familia de progestinas de 19-nortestosterona. El etonogestrel es el derivado de cetona C3 del desogestrel y el derivado de metileno C11 de levonorgestrel y también se conoce como 3-cetodesogestrel y como 11-metilenlevonorgestrel (17). La figura 1, muestra la estructura química del compuesto.



**Figura 1: Estructura química del etonogestrel (17).**

#### *4.1.3.1 Historia*

El desogestrel (3-deketoetonogestrel), un pro-fármaco de etonogestrel, se introdujo para uso médico en 1981. En su forma comercial, se presentó por primera vez, como Implanon® en Indonesia, en 1998, y posteriormente se comercializó en el Reino Unido y poco después, en el 2001 en México y en los Estados Unidos hasta el 2006. Actualmente se encuentra distribuido en todo el mundo (18,19).

El etonogestrel a veces se conoce como progestina de "tercera generación" (20). En 1988 se iniciaron los estudios de introducción del método en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en cuatro centros: Distrito Federal, Morelos, Puebla y Estado de México. En 1997 se introdujo al régimen de IMSS-SOLIDARIDAD, en dos hospitales rurales. En el año 2000, se desarrolla el implante anticonceptivo subdérmico Implanon®, el cual consiste en una sola cápsula que contiene etonogestrel. Inicialmente, este producto, se introduce en ocho países de Europa. En México, Implanon® se encuentra disponible desde 2001 en el cuadro básico de medicamentos incluidos en la cobertura de las principales instituciones de salud. Además, los médicos reciben actualmente capacitación para aplicar y retirar el implante (3).

#### *4.1.3.3 Farmacocinética*

La biodisponibilidad del etonogestrel cuando se administra como un implante subcutáneo o como un anillo vaginal es del 100%. Los niveles de etonogestrel en estado estable se alcanzan dentro de una semana después de la inserción como un implante o anillo vaginal. El volumen medio de distribución de etonogestrel es 200 pg/mL. La unión a proteínas plasmáticas de la medicación es al menos del 98%, con un 66% unido a albúmina y un 32% a globulina fijadora de hormonas sexuales. Etonogestrel se metaboliza en el hígado por CYP3A4. La actividad biológica de sus metabolitos es desconocida. La vida media de eliminación de etonogestrel es de aproximadamente 25 a 29 horas. Después de la extracción de

un implante que contiene etonogestrel, los niveles de la medicación estuvieron por debajo de los límites de la detección del ensayo en una semana. La mayor parte del etonogestrel se elimina en la orina y una pequeña parte se elimina en las heces (21).

#### *4.1.3.4 Farmacodinamia*

El etonogestrel es un progestágeno o un agonista del receptor de la progesterona, es menos androgénico que el levonorgestrel y la noretisterona, y no causa una disminución en los niveles de globulina fijadora de hormonas sexuales. Sin embargo, todavía se asocia con el acné en hasta el 13.5% de las pacientes cuando se usa como un implante, aunque este efecto secundario solo representa el 1.3% de las extracciones prematuras del implante. Además de su actividad androgénica progestogénica débil, el etonogestrel se une al receptor de glucocorticoides con aproximadamente el 14% de la afinidad de la dexametasona (en comparación con el 1% para el levonorgestrel) y tiene una actividad glucocorticoide muy débil. Etonogestrel no tiene otra actividad hormonal (por ejemplo, estrogénico, antimineralocorticoide). Se ha observado cierta inhibición de la 5-alfa-reductasa y de las enzimas del citocromo P450 hepático con etonogestrel *in vitro*, de forma similar a otras progestinas de 19-nortestosterona (15).

#### *4.1.3.5 Efectos secundarios*

Los efectos secundarios más comunes de etonogestrel cuando se usa como un implante, experimentado por más del 10% de las mujeres, incluyen irregularidades menstruales, con patrones de sangrado menstrual que incluyen hipomenorrea (33.6%), amenorrea (22.2%), menorragia (17.7% ) y polimenorrea (6.7%); cefalea (24.9%), vaginitis (14.5%), aumento de peso (13.7%), acné (13.5%), dolor de senos (12.8%), dolor abdominal (10.9%) y faringitis (10.5%) (13).

Los efectos secundarios menos comunes de etonogestrel cuando se usa como implante, experimentados por 5 a 10% de las mujeres, incluyen leucorrea (9.6%), reacciones en el sitio del implante (8.6%), síntomas similares a la influenza (7.6%), mareos (7.2%), dismenorrea (7.2%), dolor de espalda (6.8%), labilidad emocional (6.5%), náuseas (6.4%), dolor (5.6%), nerviosismo (5.6%), depresión (5.5%), hipersensibilidad (5.4%) y dolor en el sitio de inserción (5.2%). Las reacciones en el sitio del implante incluyeron eritema (3.3%), hematomas (2.0%), dolor (1.0%) e hinchazón (0.7%). Las razones para la interrupción del tratamiento con implante de etonogestrel incluyen irregularidades menstruales (11.1%), labilidad emocional (2.3-6.1%), aumento de peso (2.3%), dolor de cabeza (1.6%), acné (1.3%) y depresión (1.0-2.4%) (13).

Se ha observado, por incidencia estadística, que el etonogestrel puede verse relacionado a la aparición de embarazo ectópico, trombosis y otros eventos vasculares, quistes ováricos, cáncer de mama, cáncer cervical, neoplasia intraepitelial cervical, adenomas hepáticos, presión arterial elevada, enfermedad de la vesícula biliar, resistencia leve a la insulina, pequeños cambios en los niveles de glucosa; hiperlipidemia, retención de líquidos y cambios visuales o en la tolerancia de la lente en personas con lentes de contacto. Se han informado muchos efectos secundarios posibles adicionales de etonogestrel en la vigilancia posterior a la comercialización (13).

El etonogestrel es el metabolito activo del pro-fármaco inactivo desogestrel, una de las dos progestinas de tercera generación que se encuentran en algunos estudios epidemiológicos de píldoras anticonceptivas combinadas, que se asocian con un mayor riesgo de trombosis venosa que las píldoras anticonceptivas combinadas que contienen ciertas progestinas de segunda generación. Debido a que las hormonas se liberan continuamente a partir de anillos vaginales que contienen etonogestrel, las dosis máxima y total de estrógeno y progestina son significativamente más bajas que con las píldoras anticonceptivas combinadas, aunque no se sabe si esto reduce el riesgo de coágulos sanguíneos (13).

En un estudio, se observó que la progesterona suplementaria (P4) puede alterar la producción de mediadores de inflamación por los macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) bacterianos. Particularmente, se ha estudiado el impacto de P4 sobre algunas citocinas como la IL-1, en sus tipos IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  y la producción de IL-8, mediante la comparación de los niveles en diferentes dosis de P4 y las concentraciones de organismos; encontrándose una producción modificada de citocinas de manera dependiente de la dosis. P4 mejoró la producción de IL-1 $\beta$  e IL-8, pero inhibió la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  en monocitos estimulados con distintos antígenos (1).

## **4.2 Citocinas**

Las citocinas son glicoproteínas solubles de bajo peso molecular que funcionan como mediadoras de crecimiento celular, inflamación, reguladoras de la respuesta inmune humoral y celular, diferenciación y reparación, entre otras actividades. Dentro de sus funciones está el mediar la respuesta inflamatoria. Existen citocinas pro inflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y la IL-1, y antiinflamatorias, como la IL-10. Las citocinas previamente mencionadas serán analizadas para propósito de este estudio (22).

### *4.2.1 IL-10*

La IL-10 es una interleucina producida por los linfocitos T y B, así como por macrófagos y queratinocitos. Inhibe las funciones accesorias de los macrófagos en la activación de las células T, por medio de una reducción en la expresión de moléculas de MHC clase-II y de las moléculas co-estimuladoras B7-1 y B7-2 (CD80 y CD86, respectivamente). De esta manera, se inhibe la respuesta adaptativa celular (23). IL-10 es una citocina con efectos pleiotrópicos múltiples en la inmunorregulación e inflamación. Regula a la baja la expresión de las citocinas Th1, los antígenos del MHC de clase II y las moléculas co-estimuladoras en los macrófagos. También mejora la supervivencia de las células B, la proliferación y la producción de anticuerpos. La IL-10 puede bloquear la actividad del factor de

transcripción NF- $\kappa$ B, y está implicado en la regulación de la vía de señalización JAK-STAT (24).

La IL-10 es capaz de inhibir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, tales como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), producidas por células tales como macrófagos y células T Th1. Se ha observado que, además, muestra una potente capacidad para suprimir la capacidad de presentación de antígeno de las células presentadoras de antígeno; sin embargo, también es estimulante para ciertas células T (Th2) y mastocitos y estimula la maduración de las células B y la producción de anticuerpos, al tiempo que impide la inducción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). En ratones, se ha demostrado que la falta de IL-10 provoca la activación de COX y la activación del receptor de tromboxano, lo que puede causar disfunciones endoteliales y cardíacas vasculares (25). La IL-10 está relacionada con las mioquinas, ya que el ejercicio provoca un aumento en los niveles circulantes de IL-1Ra, IL-10 y TNF-R, lo que sugiere que el ejercicio físico fomenta un entorno antiinflamatorio (23).

#### *4.2.2 Factor de necrosis tumoral alfa*

El TNF- $\alpha$  es una citocina cuya acción está relacionada con leucocitos de la sangre, el endotelio y otros tejidos, en el transcurso de distintas agresiones celulares, como por ejemplo las infecciones. Su estimulación está relacionada con otros mediadores celulares, como la IL-1 y endotoxinas bacterianas. El TNF- $\alpha$  ejerce distintas funciones en diferentes órganos, como la activación de la producción de otros mediadores, como la IL-1 y la IL-6 (22).

El TNF- $\alpha$  es una proteína de señalización celular implicada en la inflamación sistémica y es una de las citocinas que componen la reacción de fase aguda. Se produce principalmente por macrófagos activados, aunque puede producirse por muchos otros tipos de células, como los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, las células NK, los neutrófilos, los mastocitos, los eosinófilos y las neuronas (26).

El papel principal del TNF- $\alpha$  está en la regulación de las células inmunes. Al ser un pirógeno endógeno, puede inducir fiebre, muerte celular apoptótica, caquexia, inflamación e inhibir la tumorigénesis, la replicación viral y responder a la sepsis a través de las células productoras de IL-1 e IL-6. La desregulación de la producción de TNF- $\alpha$  se ha visto implicada en una variedad de enfermedades humanas, incluidas la enfermedad de Alzheimer, cáncer, depresión mayor, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Aunque controvertido, los estudios sobre la depresión y la EII están actualmente relacionados con cambios en los niveles de TNF- $\alpha$ .

El TNF- $\alpha$  recombinante se usa como inmunoestimulante bajo el nombre de tasonermina. El TNF- $\alpha$  puede producirse ectópicamente en el contexto de un tumor maligno y es similar a la hormona paratiroidea, tanto en la causa de la hipercalcemia secundaria como en los cánceres con los que se asocia una producción excesiva de la misma (27).

Esta citocina se produce principalmente como una proteína transmembrana tipo II, de 233 aminoácidos de longitud, dispuesta en homotrímeros estables. A partir de esta forma integrada a la membrana, la citocina homotrimérica soluble (sTNF) se libera a través de la escisión proteolítica mediante la enzima metaloproteasa convertidora de TNF- $\alpha$  (TACE, también llamada ADAM17). La forma secretada del TNF- $\alpha$  humano adopta una forma de pirámide triangular y pesa alrededor de 17 KDa. Tanto las formas secretadas como las vinculadas a la membrana son biológicamente activas, aunque las funciones específicas de cada una son controvertidas. Ambas formas tienen actividades biológicas superpuestas y distintas (28).

Tras el contacto con su ligando, los receptores de TNF- $\alpha$  también forman trímeros, y sus puntas encajan en los surcos formados entre los monómeros de TNF- $\alpha$ . Esta unión provoca que se produzca un cambio conformacional en el receptor, que conduce a la disociación de la proteína superóxido dismutasa del dominio de

muerte intracelular. Esta disociación permite que la proteína adaptadora de muerte asociada con el receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1 (TRADD) se una al dominio de muerte, sirviendo como una plataforma para la posterior unión a otras proteínas (29).

Como todos los miembros de la superfamilia de TNFR que contienen el dominio de muerte, TNFR1 está implicado en la señalización durante la apoptosis. Sin embargo, la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$  desempeña solo un papel menor en comparación con sus importantes funciones en el proceso inflamatorio. Su capacidad para inducir la muerte es débil, en comparación con otros miembros de la familia (como Fas) y a menudo es enmascarada por los efectos anti-apoptóticos de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, TRADD se une a la proteína asociada a Fas con dominio de muerte (FADD), que luego recluta la cisteína proteasa caspasa-8. Una alta concentración de caspasa-8 induce su activación autoproteolítica y posterior escisión de caspasas efectoras, lo que lleva a la apoptosis celular (30).

#### 4.2.3 IL-1 $\beta$

La IL-1 es una familia de citocinas relacionadas con la inflamación aguda y crónica, secretada por macrófagos, monocitos, fibroblastos y células dendríticas. Tiene función pirógena, de hiperalgesia, vasodilatación e hipotensión (31,32). La familia de IL-1 es un grupo de 11 citocinas, que induce una red compleja de citocinas pro-inflamatorias y, a través de la expresión de integrinas en los leucocitos y las células endoteliales, esta familia de citocinas regula e inicia las respuestas inflamatorias.

IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son los miembros más estudiados, porque fueron descubiertos primero y porque poseen un fuerte efecto pro-inflamatorio. Tienen un antagonista natural, conocido como IL-1Ra (antagonista del receptor de IL-1). Se unen al receptor IL-1 (IL-1R) y activan la señalización a través del adaptador MyD88. IL-1Ra regula la actividad pro-inflamatoria de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , compitiendo con ellos por los sitios de unión del receptor (33).

IL-1 tiene un papel principal en la neuroinflamación. Durante la inflamación, hay niveles aumentados de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en el cerebro, y su presencia puede causar la apertura de la barrera hematoencefálica. Se ha descubierto que los polimorfismos en los genes de la IL-1 contribuyen a la susceptibilidad genética a algunos cánceres, espondilitis anquilosante y enfermedad de Graves (34).

En términos de uso clínico, debido a su caracterización como factor hematopoyético, se administró IL-1 a los pacientes después del trasplante de médula ósea, para mejorar el injerto. Se descubrió que los pacientes experimentaban síntomas de inflamación sistémica (35). Gracias a este hallazgo se inició a investigar el bloqueo farmacológico de estos receptores para aliviar los síntomas relacionados a la inflamación sistémica, como los presentes en la enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide. Sin embargo, aún no se han obtenido resultados significativamente importantes comparándolos con placebos utilizados (35).

Hoy en día, el bloqueo de la actividad de IL-1 (especialmente IL-1 $\beta$ ) es una terapia estándar para pacientes con enfermedades autoinmunes o linfomas. La anakinra es un producto sintético que actúa como antagonista del receptor de IL-1 endógeno (IL-1Ra). Está aprobado por la FDA como terapia para pacientes con artritis reumatoide, porque reduce los síntomas y ralentiza la destrucción articular en esta enfermedad inflamatoria. También se ha recetado a pacientes con mieloma indolente o latente, con un alto riesgo de progresión a mieloma múltiple. se ha observado mejoría en cuanto a disminución de sintomatología y ralentización en la progresión de la enfermedad (36).

Además de lo correspondiente a las citocinas, se ha estudiado el efecto de la progesterona y sus análogos como el etonogestrel en el ciclo celular, únicamente en células endometriales, observándose aumento en la proliferación de células estromales. Se ha buscado, sin resultados, una activación directa del ciclo celular de las células estromales en presencia de la progesterona; sin embargo, se ha

encontrado que la progesterona activa la proliferación celular por medio de la activación de las cinasas ERK1/2 y Akt, que a su vez activan el regulador del ciclo celular Cdc2 (37).

### **4.3 Proliferación Celular**

Las progestinas inducen la proliferación de células de cáncer de mama y están implicadas en el desarrollo de este tipo de cáncer. Los efectos de las progestinas están mediados por los receptores de progesterona (PR), aunque no está claro si los efectos proliferativos se producen a través de actividades como factores de transcripción activados por ligando o mediante la activación de cinasas citoplásmicas. La progresión a la fase S se correlacionó con la regulación al alza de la ciclina D1, la cual forma un complejo con las cinasas dependiente de ciclina CDK4 o 6, actuando sobre el ciclo celular acelerando la fase G1. También se ha observado que el antagonista de PR RU486 también indujo la activación de las cinasas MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos), aumentó en la expresión de ciclina D1 y estimuló la entrada de fase S, que se bloqueó por inhibición de las quinasas ERK 1/2 o p38, mientras que la proliferación inducida por R5020 fue sensible solo a la inhibición de ERK 1/2 (38).

Las células MCF-7, que expresan establemente un PR mutante incapaz de unirse a c-Src y activar las MAPK, no reaccionaron a la proliferación inducida por progestina. Estos datos sugieren que los PR median la progresión del ciclo celular, principalmente mediante la activación de cinasas citoplásmicas e independientemente de la regulación directa de la transcripción, mientras que la regulación coordinada de ambos aspectos de la acción de los PR es necesaria para una proliferación mejorada en respuesta a progestinas en presencia de factores de crecimiento (38).

Las citocinas afectan el ciclo celular en distintos niveles; se ha observado que la IL-2 y la IL-7 inducen a los linfocitos T, particularmente CD4, a entrar en ciclo celular (39). También se ha observado en ciertas patologías relacionadas con el

exceso de proliferación de un grupo de células, como es el caso de los queratinocitos en el coleostoma, que el aumento de la IL-1 $\alpha$  provoca aumento en la división celular, aumentando la expresión de las cinasas cdk2 y cdk4, las cuales regulan positivamente la proliferación celular (40).

La proliferación celular se basa directamente en el ciclo celular, que es el proceso durante el cual la célula duplica su información genética para dar origen a una nueva célula. Las etapas, son G1-S-G2 y M. El estado G1 quiere decir «GAP 1» (Intervalo 1). El estado S representa la «síntesis», en el que ocurre la replicación del ADN. El estado G2 representa «GAP 2» (Intervalo 2). El estado M representa «la fase M», y agrupa a la mitosis o meiosis (reparto de material genético nuclear) y la citocinesis (división del citoplasma). Las células que se encuentran en el ciclo celular se denominan «proliferantes» y las que se encuentran en fase G0 se llaman células «quiescentes» (40).

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 estas. Para ello, se pueden ocupar agentes de intercalación que se unan a los ácidos nucleicos, como el yoduro de propidio, un agente de intercalación y molécula fluorescente con una masa molecular de 668.4 KDa, que se puede utilizar para teñir las células marcando el ADN y analizando la cantidad de este por medio de la citometría de flujo. Esto también nos permite diferenciar células necróticas, apoptóticas y células normales (41).

#### **4.4 Relación de la progesterona con el sistema inmune**

La interacción entre las hormonas sexuales como los progestágenos y el sistema inmunológico es muy compleja. Múltiples factores afectan los efectos inmunomoduladores de los progestágenos, incluidas las fluctuaciones en los niveles de hormonas sexuales endógenas, el estrés, el uso de hormonas exógenas (dosis, la vía y el tiempo de administración) y las alteraciones en el metabolismo hormonal. Aunque se han estudiado los efectos inmunomoduladores

de la progesterona, especialmente el efecto de la progesterona en las células T, las subpoblaciones de células T y sus proporciones, así como los efectos de la dosis y el uso de progestágenos sintéticos, todavía hay áreas abiertas para futuras exploraciones del impacto multifacético de los progestágenos en el sistema inmune. Una mejor comprensión de los intrincados efectos inmunomoduladores de las progestinas puede allanar el camino para desarrollar intervenciones terapéuticas clínicamente significativas en ciertas enfermedades autoinmunes (4).

La progesterona suprime el desarrollo de células T Th1 y favorece las secreciones de citocinas de tipo Th2, inhibe la citotoxicidad de las células T y aumenta la diferenciación de las células Th0 hacia células T reguladoras. De manera similar, el efecto inhibitorio es ejercido por la progesterona sobre las actividades de las células NK. También bajo la influencia de la progesterona, el porcentaje de anticuerpos asimétricos (IgG glicosilados con un oligosacárido que interfiere con su funcionalidad), aumenta a medida que el mecanismo íntimo es la glicosilación del fragmento Fab de las moléculas de IgG, lo que provoca que estos no pongan en marcha funciones de la respuesta inmune como la formación de complejos precipitables y fijación del complemento, lo cual provoca que actúen como bloqueantes de los blancos reconocidos por las células efectoras. Los nuevos objetivos identificados de la progesterona son las células dendríticas y las células madre mesenquimales. La progesterona altera las células dendríticas, haciéndolas reclutar predominantemente células con actividades pro-tolerogénicas. Además, la progesterona regula al alza la secreción de citocinas anti-inflamatorias, como IL-4, por las células madre mesenquimales (44).

En mujeres embarazadas, se ha observado que el aumento de los niveles de progesterona en suero está asociado con la hipermetilación del ADN de la región promotora del gen para IFN- $\gamma$  y la producción reducida de IFN- $\gamma$  en células T CD8<sup>+</sup> de memoria (CD8 Tm) tras la estimulación no específica de antígeno *ex vivo*. Además, la hipermetilación del gen de IFN- $\gamma$  y la producción de IFN- $\gamma$  significativamente reducida después de la infección, también se observa en

ratones gestantes o en ratones no embarazadas tratados con progesterona, que es un fenotipo reversible después del tratamiento de desmetilación. Es importante destacar que las células T CD8<sup>+</sup> no específicas para antígenos de ratones tratados con progesterona tienen una protección anti-membrana dañada cuando se transfieren a ratones preñados o ratones deficientes en IFN- $\gamma$ . El tratamiento de desmetilación rescata la protección adoptiva de tales células CD8<sup>+</sup> Tm. Estos datos demuestran que el aumento de progesterona altera las funciones de protección inmunitaria de las células T CD8<sup>+</sup> no específicas para antígeno, a través de la inducción de la hipermetilación del gen de IFN- $\gamma$  (44).

Pese a que se tiene esta información, no existen al momento estudios centrados en el etonogestrel, además de que no se ha estudiado al relación entre la presencia de este progestágeno con la producción de citocinas en estado fisiológico o ante un estímulo antigénico.

## 5. Planteamiento del problema

Desde 1973, en nuestro país se empieza a difundir el uso de anticonceptivos, con el fin de implementar estrategias para controlar la natalidad. Los anticonceptivos hormonales que están disponibles para uso de las mujeres han aumentado en proporción, con un 6.9% de uso reportado en la ENSANUT 2006, tomando en cuenta las pastilla anticonceptiva de emergencia. Posteriormente, la ENSANUT 2012 muestra que 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 y 4.1% más utiliza la pastilla anticonceptiva de emergencia (2).

Dentro de los métodos anticonceptivos utilizados resaltan los análogos de progesterona. Los análogos de progesterona de primera generación utilizados dentro de la anticoncepción son la noretisterona (NET), la noretindrona (NE), el diacetato de etinidol y el linestrenol (LYN). El levonorgestrel (LNG) y el norgestrel (NG) son los progestágenos de segunda generación, y entre los de tercera generación se incluyen el desogestrel (DSG), su derivado etonogestrel (ETG) el gestodeno (GSD) y el norgestimato (NGM).

Los efectos de la progesterona en el sistema inmune se han estudiado en especies como ratones, vacas y perros. Se ha observado que concentraciones elevadas de progesterona en la sangre dan como resultado un curso más severo y una persistencia más prolongada de las bacterias en enfermedades infecciosas y una disminución del aclaramiento de los eritrocitos recubiertos de anticuerpos *in vivo* (42).

También se ha observado, que la progesterona suprime componentes específicos del sistema inmune y la actividad de las células NK, mientras que tiene una influencia principalmente positiva en otros componentes no específicos del sistema del complemento. Suprime la blastogénesis y la citotoxicidad de los linfocitos y aumenta la síntesis de anticuerpos asimétricos sin función efectora para bloquear antígenos fetales.

La progesterona aumenta la concentración de leucocitos en sangre, la migración aleatoria y la capacidad quimiotáctica, además de la síntesis de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por leucocitos polimorfonucleares (PMN), específicamente eosinófilos, así como la expresión de receptores del complemento, la síntesis de ROIs y la fagocitosis por macrófagos peritoneales (43).

Sin embargo, no se han encontrado estudios que muestren la acción de los análogos de la progesterona como el etonogestrel, presente en el implante subdérmico, sobre el sistema inmunológico, y aunque se presume que su efecto puede ser similar al de la progesterona *per se*, no se cuentan con datos concretos, por lo que surge la siguiente pregunta de investigación:

**¿Cuál es el efecto del uso del implante subdérmico de etonogestrel sobre la proliferación celular y producción de citocinas de leucocitos en circulación en mujeres sanas de 18 a 30 años?**

## **6. Justificaciones**

- 1.** En México, el 10.2% de las mujeres con vida sexual activa utiliza métodos anticonceptivos hormonales, además de que la vida sexual se inicia a edades tempranas.
- 2.** Las interacciones de los anticonceptivos de progesterona con el sistema inmunológico no se han estudiado extensivamente. Se ha encontrado que la progesterona encontrada naturalmente en el cuerpo de los mamíferos afecta el ciclo celular y las reacciones inflamatorias en diversas circunstancias.
- 3.** Las relaciones de los anticonceptivos hormonales con patología de interés para la salud pública se han estudiado centradas en los métodos estrogénicos o combinados (progesterona/estrógeno). En estos, se ha encontrado una relación directa con la aparición de cáncer de ovario, mama y útero. Se ha visto que estos efectos van ligados a los estrógenos por sí mismos, así que la influencia de los anticonceptivos de progesterona en procesos ligados al sistema inmune no se encuentra clara.
- 4.** El conocer la acción del etonogestrel sobre el sistema inmunológico puede dar pie a la prevención temprana de posibles complicaciones ligadas a su uso, así como su empleo probable en inmunoterapia.

## **7. Hipótesis**

### **Hipótesis alterna**

El uso de implantes subdérmicos de etonogestrel resultará en la disminución de la proliferación celular y producción de citocinas en leucocitos en circulación.

### **Hipótesis nula**

El uso de implantes subdérmicos de etonogestrel no modificará la proliferación celular y producción de citocinas en circulación.

## **8. Objetivos**

### **8.1 General:**

Determinar el efecto del uso del implante subdérmico de etonogestrel sobre la producción de citocinas y la proliferación celular de leucocitos circulantes, en mujeres clínicamente sanas de entre 18 y 30 años de edad.

### **8.2 Específicos:**

- Cuantificar las concentraciones plasmáticas de las citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$ , por el método de ELISA, en mujeres con implante subdérmico de etonogestrel.
- Cuantificar las concentraciones de las citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$  en sobrenadante del cultivo celular de leucocitos, con y sin estímulo de LPS, por el método de ELISA, en mujeres con implante subdérmico de etonogestrel.
- Cuantificar los leucocitos en ciclo celular, con y sin estímulo de LPS, por el método de incorporación de yoduro de propidio, por citometría de flujo, en mujeres con implante subdérmico de etonogestrel.
- Comparar los resultados obtenidos con los resultados de un grupo de mujeres que no usan este método anticonceptivo.

## 9. Metodología

### 9.1 Tipo de estudio

Experimental y comparativo

### 9.2 Operacionalización de variables

Variable	Descripción	Tipo	Unidades de medida
Etonogestrel	El etonogestrel es un medicamento/progestina que se usa como un método anticonceptivo para mujeres. El etonogestrel es eficaz como método anticonceptivo dentro de las 8 horas de la inserción.	Independiente. Cuantitativa continua.	mg/mL
IL-10	La interleucina 10 (IL-10) es una citocina de tipo II. Las funciones biológicas principales de la IL-10 son disminuir y regular la respuesta inflamatoria producida por las células dendríticas y los macrófagos, así como reducir las respuestas adaptativas de las células T CD4 <sup>+</sup> .	Dependiente. Cuantitativa continua.	pg/mL
TNF- $\alpha$	El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es miembro de un grupo de otras citocinas que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria. Proteína elaborada por los glóbulos blancos en respuesta a un antígeno o a una infección.	Dependiente. Cuantitativa continua.	pg/mL
IL-1 $\beta$	Inhibe la producción de citocinas, promueve la	Dependiente. Cuantitativa	pg/mL

	proliferación de células B y la producción de anticuerpos, suprime la inmunidad celular, crecimiento de mastocitos.	continua.	
Proliferación celular	La proliferación celular es el incremento del número de células por división celular. Es característica de cada tipo celular por lo que está controlada de forma muy específica, incluyendo por factores de crecimiento. El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo, la pérdida de esta regulación es causa de proliferación ilimitada, y la pérdida de capacidad de proliferación origina el envejecimiento.	Dependiente. Cuantitativa continua.	Intensidad de fluorescencia para el marcador yoduro de propidio y porcentaje de células positivas para el mismo

### 9.3. Universo de trabajo

Leucocitos mononucleares aislados de sangre periférica en mujeres sanas de 18 a 30 años.

### 9.4 Método de muestreo

No probabilístico, a conveniencia, por ser un estudio piloto.

### 9.5 Tamaño de muestra

13 mujeres para el grupo experimental (con tratamiento de método anticonceptivo) y 11 mujeres control (que no estén en tratamiento con ningún método anticonceptivo).

## **9.6 Criterios de inclusión y exclusión**

### ***Inclusión:***

Mujeres sanas de entre 18 y 30 años que se encontraban en tratamiento con implante subdérmico anticonceptivo de etonogestrel.

### ***Exclusión:***

Mujeres con antecedentes de cáncer de mama, útero, ovario, endometrio, etc.; diabetes mellitus tipo 2, eventos tromبóticos, 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 considere que podría interferir con el estudio.

Mujeres que se encontraran enfermas al momento del estudio, que estuvieran tomando antibióticos u otro medicamento que pudiera alterar los resultados.

Mujeres que consumieran alcohol más de una vez cada semana o que hubieran fumado al menos 100 cigarrillos en su vida y fumaran todos o algunos días más de tres cigarrillos.

Mujeres que estén amamantando o que sospechen estar embarazadas.

## **9.7 Desarrollo del proyecto**

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México en los meses de Mayo a Octubre de 2016.

1. Se recolectaron datos de cada participante en forma de una historia clínica modificada, 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) [Anexo 1]. Los datos personales se mantuvieron privados y cada mujer firmó un formato de consentimiento informado a usar sus datos de forma anónima para estudios estadísticos y experimentales [Anexo 2].

2. Se recolectaron 10 mL de sangre por participante por técnica de punción venosa estándar en vena cubital media o cefálica, en un tubo con heparina.
3. Se separaron 6 mL de sangre para aislamiento de leucocitos.
4. 4 mL de sangre se centrifugaron durante 30 minutos a 900G para obtener plasma, para ser utilizado en la cuantificación de citocinas por la técnica de ELISA.

#### *9.7.1 Aislamiento de leucocitos mononucleares de sangre periférica*

1. Los 6 mL de sangre para aislamiento se mezclaron con Fycoll-Histopaque (1.077 g/mL de densidad) en una proporción 2:1.
2. La mezcla se centrifugó por 30 min a 2,500 rpm, sin freno.
3. Se separó el anillo que contenía las células con pipeta Pasteur, en un tubo de 10 mL.
4. Se aforó a 10 mL con buffer fosfato salino (PBS) y se centrifugó por 10 min.
5. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 mL de PBS.
6. Se centrifugó el tubo a 2,000 rpm por 10 min.
7. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo completo (RPMI, 10% suero fetal bovino, L-glutamina y 1% antibióticos).
8. Se realizó conteo celular con una cámara de Neubauer.

9. Se colocaron  $1 \times 10^6$  células en cuatro pozos de una placa de cultivo de 24 pozos.
10. A dos pozos se les agregaron 50  $\mu\text{L}$  de LPS (1 mg/mL) y dos pozos se dejaron sin estímulo antigénico (volumen final/pozo: 500  $\mu\text{L}$ ).
11. Las células se incubaron por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y con atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ .
12. Se desprendieron las células con la ayuda de un émbolo; el contenido total del pozo se recolectó en tubos de 1.5 mL.
13. Los tubos se centrifugaron a 2,000 rpm por 15 min.
14. Se retiró sobrenadante y se congeló a  $-70^\circ\text{C}$  en tubos de 1.5 mL, para la posterior cuantificación de citocinas por técnica ELISA.
15. Las células se resuspendieron en 50  $\mu\text{L}$  de etanol al 50% y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Posteriormente, las células se utilizaron para la determinación de la proliferación celular.

#### *9.7.2. Cuantificación por citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10) por el método de ELISA*

Se emplearon kits comerciales de ELISA basados en el principio de inmunoensayo competitivo. Las concentraciones de las citocinas se midieron tanto en plasma como en el sobrenadante de los leucocitos aislados.

1. Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de captura en una placa para ELISA y se incubó a temperatura ambiente toda la noche.
2. La placa se lavó 4 veces con PBS-Tween 20.
3. Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de diluyente de ensayo para bloquear.
4. Se incubó a temperatura ambiente en agitación, durante una hora.
5. Se prepararon muestras y curvas estándar de cada citocina [Anexo 3].
6. Se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween 20.
7. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de detección.
8. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente.
9. Se lavó 4 veces con PBS-Tween 20.

10. Se colocaron 100  $\mu$ L de estreptavidina y la placa se incubó durante 45 min a temperatura ambiente, en agitación.
11. Se lavó 5 veces (1 min por lavado).
12. Se adicionaron 100  $\mu$ L del substrato TMB. Se incubó por 30 minutos en la oscuridad.
13. Se colocó solución de paro ( $H_2SO_4$  2N) 100  $\mu$ L.
14. Se realizó lectura en espectrofotómetro, a una longitud de onda de 450 nm.

### *9.7.3. Determinación de células en ciclo celular por medio de citometría de flujo*

Se realizó la tinción con yoduro de propidio para la estimación de la proliferación celular con respecto a cantidad de DNA. Para esto, se utilizaron las células previamente preservadas en congelación en etanol al 50%.

1. Se efectuaron 2 lavados con 1 mL de PBS, centrifugando por 10 minutos para retirar alcohol.
2. Se resuspendió en 250  $\mu$ L de PBS.
3. Se añadieron 6.15  $\mu$ L de RNAsa, agitando suavemente por 5 minutos.
4. Se añadió yoduro de propidio (15  $\mu$ L) y se incubó 1.5 horas, protegiendo de la luz.
5. Se realizó lectura en citómetro, seleccionando un mínimo de 10,000 eventos y excluyendo células muertas

## **9.8 Límite de tiempo y espacio**

El estudio se llevó a cabo en el periodo de Mayo a Octubre del 2016, en el Laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma del Estado de México.

### **9.9. Diseño de análisis**

Por el tamaño de la muestra, se utilizó la prueba estadística no paramétrica t de student, con U de Mann Whitney para la comparación entre dos grupos, considerando el valor de  $p \leq 0.05$  como estadísticamente significativo. Se utilizó el programa Graphpad 7.0 para realizar el análisis estadístico y la elaboración de las gráficas. Los resultados se compararon entre los dos grupos de estudio (con y sin tratamiento de etonogestrel). Los datos se muestran en medias  $\pm$  desviación estándar (DE).

### **9.10 Implicaciones éticas**

El desarrollo y aplicación de esta investigación se basó en lo establecido en los principios éticos de la XVIII Asamblea Médica Mundial de Helsinky 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 dada conforme a los requerimientos de la investigación, sin dar pie a prejuicios o discriminación.
4. El riesgo para los 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. Los participantes en la investigación mantuvieron protegida su privacidad, tuvieron la opción de dejar la investigación y se realizó un monitoreo de su bienestar.
7. Adicionalmente, 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 4].

## **9.11 Organización y Financiamiento**

Estudiante:

- María Carolina Erazo Muñoz

Directores de tesis:

- Ph.D. Irazú Contreras García
- Ph.D. José Antonio Estrada Guadarrama

Este proyecto recibió financiamiento parcial a cargo del programa “Jóvenes por la Investigación”, COMECYT 2016.

## 10. Resultados

### Características generales de la población

Para determinar las características generales de nuestro grupo control y nuestro grupo en tratamiento, se llevó a cabo la aplicación de la historia clínica [Anexo 1], de la cual se obtuvieron los siguientes datos relevantes.

En cuanto a la edad de las mujeres, la edad promedio resultó en  $22.09 \pm 2.47$  para el grupo control y de  $22.46 \pm 2.66$  para el grupo con tratamiento. En cuanto al índice de masa corporal (IMC), donde es importante tomar en cuenta que el IMC de normopeso es de 19 hasta 24.9, encontramos en el grupo control una media de  $21.83 \pm 1.57$  (mínimo de 19.9 y un máximo de 24.7); mientras que en el grupo en tratamiento se encontró una media de  $22.03 \pm 1.65$  (mínimo de 19.21 y un máximo de 24.5). Como se puede observar el 100% de las mujeres participantes de ambos grupos de estudio son adultos jóvenes y el 100% de ellas con normopeso.

Las toxicomanías resultaron positivas para alcoholismo en 27.2% del grupo control y 38.4% del grupo en tratamiento, únicamente caracterizado por alcoholismo social, siendo el consumo menos de una vez a la semana; tabaquismo moderado en 18.2% del grupo control y 7.70% del grupo en tratamiento. No se encontraron otras toxicomanías relacionadas a otro tipo de droga.

En cuanto al estado civil, encontramos que un 100% del grupo control de encuentran solteras, y sólo 7.7% del grupo en tratamiento se encuentran casadas, sin encontrarse en el estudio mujeres en unión libre, divorciadas o viudas. En nivel de estudios observamos 81.8% del grupo control con preparatoria concluida y un 18.2% con estudios de licenciatura concluida; en el grupo en tratamiento se observa 7.70% con secundaria concluida; 84.62% con preparatoria concluida y 7.70% con estudios de licenciatura concluida.

En la ocupación, encontramos que el 81.8% de las mujeres en el grupo control son estudiantes, y el 18.2% tienen un empleo formal. En el grupo en tratamiento, el 84.6 % son estudiantes, el 7.7% tienen un empleo formal, y el 7.7% se dedican al hogar.

En los antecedentes heredofamiliares, se encontró en el grupo control un 27.3% con antecedente de cáncer ginecológico, un 45.5% con antecedente de diabetes mellitus y 36.4% con antecedente de hipertensión, mientras que en el grupo en tratamiento se encontró 15.4% con antecedente de cáncer ginecológico; 23.1% con antecedente de diabetes mellitus; 38.5% con antecedente de hipertensión y 7.7% con antecedente de enfermedad tiroidea. Finalmente, no se encontraron pacientes con otros antecedentes personales de importancia. El resumen de las características generales de la muestra se observan en la Tabla 1.

### **Cuantificación de la concentración de citocinas en plasma y cultivo celular**

Se realizó la técnica de ELISA para determinar la concentración de las citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) y la anti-inflamatoria IL-10 tanto en plasma como en el sobrenadante de células cultivadas, con y sin estímulo antigénico (LPS), en ambos grupos de estudio.

### **Concentración de citocinas en plasma**

Las concentraciones de TNF- $\alpha$  en plasma fueron de  $61.59 \pm 7.8$  pg/mL en el grupo control y se encontró una media de  $59.4 \pm 10.7$  pg/mL en el grupo en tratamiento (Figura 2A). Las concentraciones de IL-1 $\beta$  en suero fueron muy bajas y encontramos una media de  $1.98 \pm 5.25$  pg/mL en el grupo control y en el grupo en tratamiento una media de  $0.7545 \pm 1.756$  pg/mL (Figura 2B). Finalmente, en cuanto a la IL-10, encontramos una media de  $70.42 \pm 28.26$  pg/mL en el grupo control, mientras que el grupo en tratamiento presentó una media de  $52.57 \pm 1.58$  pg/mL, siendo las concentraciones de esta citocina estadísticamente diferentes entre grupos ( $p=0.0048$ ) (Figura 2C).

### **Concentración de citocinas en cultivo celular.**

Los leucocitos mononucleares aislados de sangre periférica se sometieron a cultivo celular, para estimularlos antigénicamente con LPS. El sobrenadante del cultivo celular se ocupó para medir las concentraciones de citocinas producidas por estas células.

En cuanto a la concentración de TNF- $\alpha$ , se obtuvo una media de  $290.8 \pm 127$  pg/mL en el grupo control, sin estímulo de LPS, y de  $322.3 \pm 101.9$  pg/mL con el estímulo de LPS. Para el grupo en tratamiento, las concentraciones de TNF- $\alpha$  fueron de  $208.2 \pm 134.4$  pg/mL sin el estímulo y de  $255.5 \pm 110.5$  pg/mL para las células estimuladas. Para la IL-1 $\beta$ , se observó una media de  $189.5 \pm 52.5$  pg/mL en el grupo control sin estímulo de LPS y de  $182.9 \pm 49.2$  pg/mL con estímulo. El grupo con tratamiento de etonogestrel presentó una media de concentración de  $190.8 \pm 90.6$  pg/mL sin estímulo y de  $185.3 \pm 83.5$  pg/mL con LPS (Figura 3 A y B).

Para la citocina IL-10, hubo una concentración media de  $318.3 \pm 100.3$  pg/mL en las células del grupo control sin estímulo y las estimuladas presentaron  $326.7 \pm 88.8$  pg/mL, mientras que en el grupo de etonogestrel la media sin estímulo antigénico fue de  $258.2 \pm 175.6$  pg/mL y de  $216.2 \pm 123.1$  pg/mL con estímulo.

### **Proliferación celular**

Se realizó el estudio de porcentaje de células en ciclo celular basado en cambios en la cantidad de ADN en fase de síntesis, por medio de la técnica de incorporación de yoduro de propidio. Este análisis se llevó a cabo en células sin estímulo y estimuladas con LPS; sin embargo, la cantidad de muestras analizadas fue muy baja, debido a que se presentaron fallas en el desarrollo de la técnica.

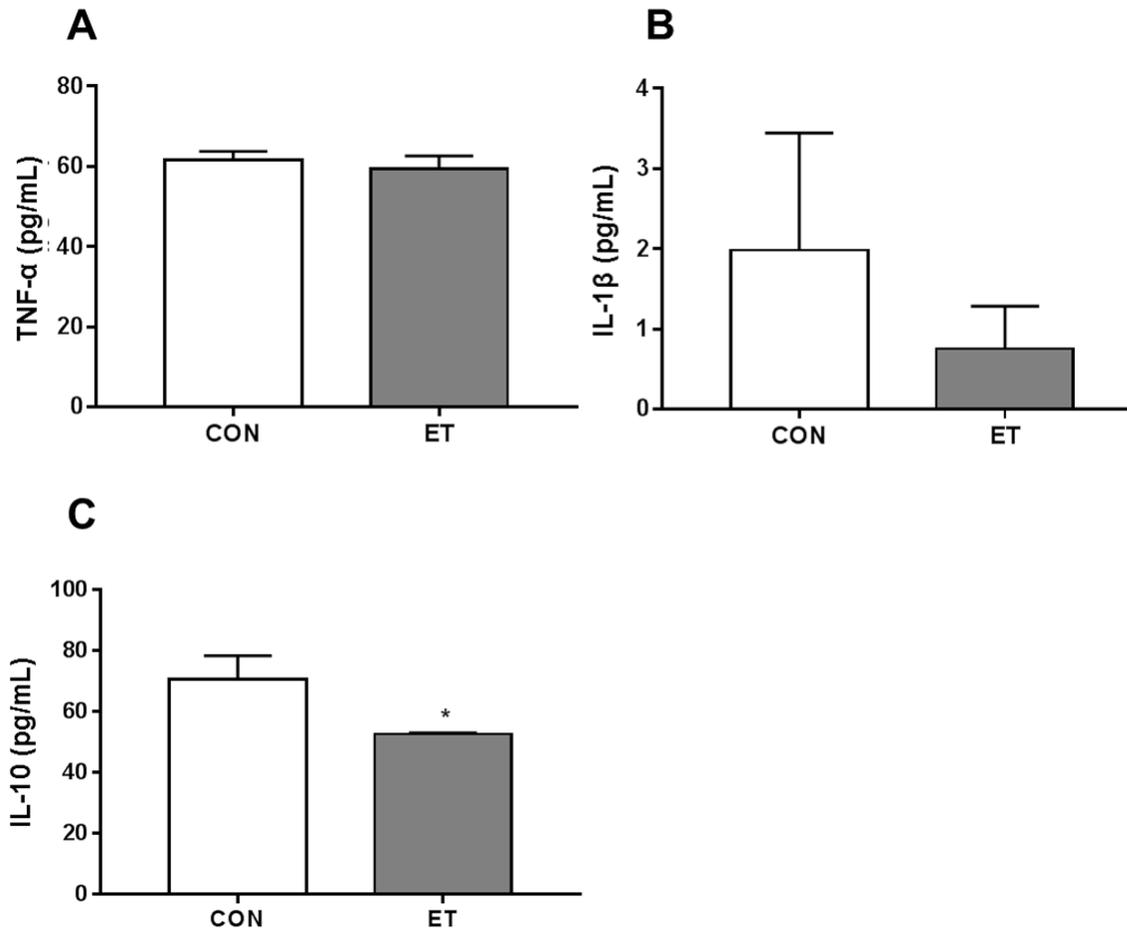
Los resultados muestran que no hay diferencias claras en la proliferación celular entre los grupos; sin embargo, se pudo observar que el grupo control presentó una mayor cantidad de células apoptóticas (Figura 4).

## 10.1 Tablas, figuras y leyendas de figuras

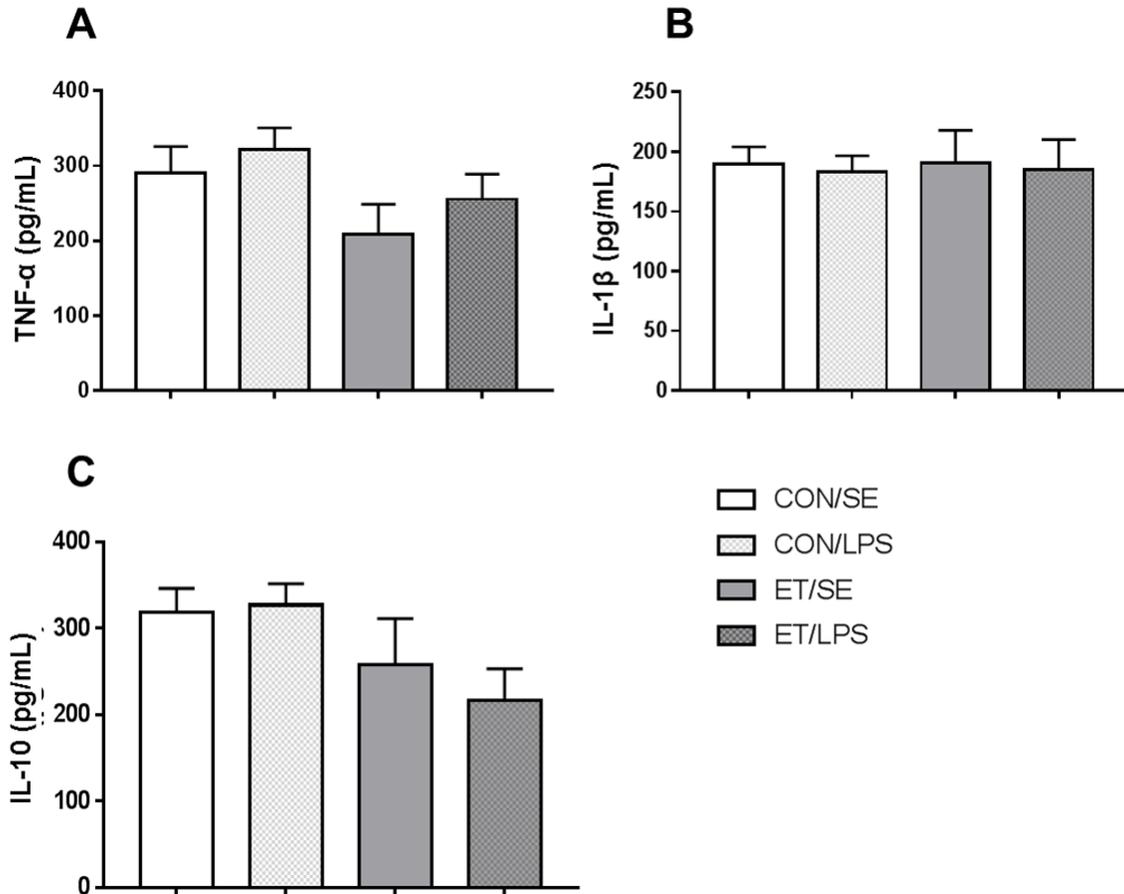
Tabla 1: Características generales de la población

	Control	Etonogestrel
<b>Edad*</b>	22.1 ± 2.5	22.5 ± 2.7
<b>IMC*</b>	21.8 ± 1.6	22.0 ± 1.7
<b>Toxicomanías</b>		
<b>Tabaquismo</b>	18.2%	7.7%
<b>Alcoholismo</b>	27.2%	38.4%
<b>Nivel de estudios</b>		
<b>Secundaria</b>	0.0%	7.7%
<b>Preparatoria</b>	81.8%	84.6%
<b>Licenciatura</b>	18.2%	7.7%
<b>Estado Civil</b>		
<b>Soltera</b>	100%	92.30%
<b>Casada</b>	0.0%	7.7%
<b>Viuda</b>	0.0%	0.0%
<b>Divorciada</b>	0.0%	0.0%
<b>Unión libre</b>	0.0%	0.0%
<b>Ocupación</b>		
<b>Estudiante</b>	81.8%	84.6%
<b>Empleo formal</b>	18.2%	7.7%
<b>Hogar</b>	0.0%	7.7%
<b>Antecedentes familiares</b>		
<b>Cáncer ginecológico</b>	27.3%	15.4%
<b>Diabetes</b>	45.5%	23.1%
<b>Hipertensión</b>	36.4%	38.5%
<b>Enfermedad tiroidea</b>	0.0%	7.7%

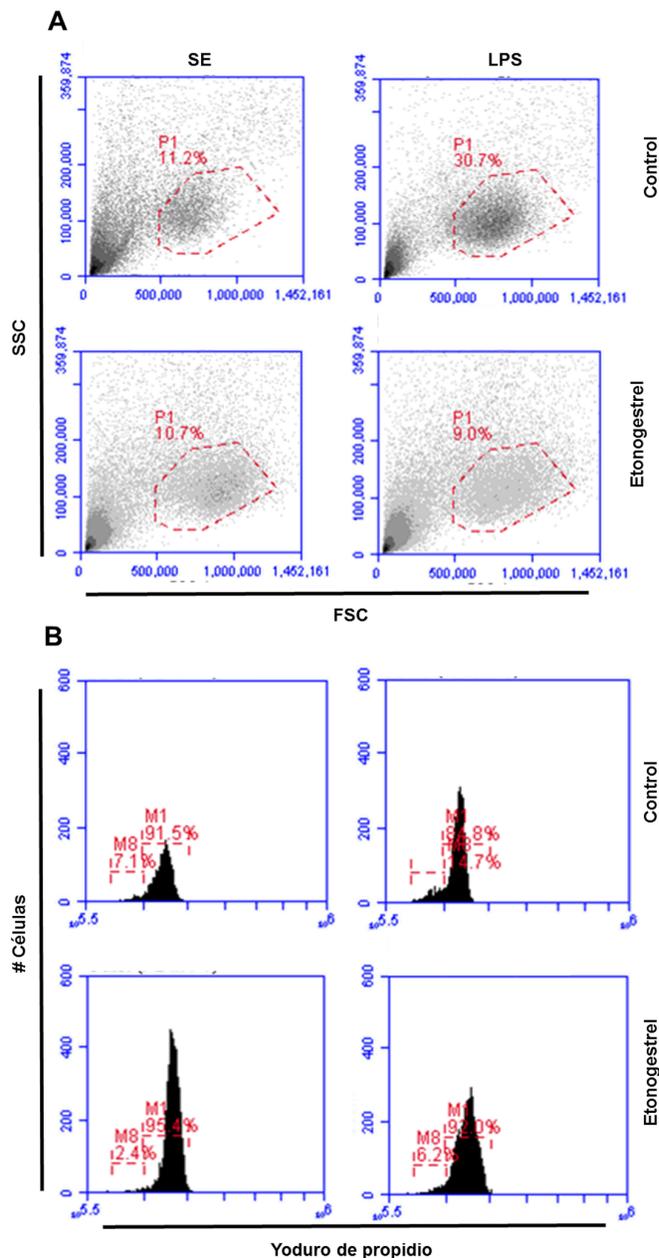
\*Media ± DE. n= 11 grupo control; 13 grupo de etonogestrel.



**Figura 2: Concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 en mujeres con implante subdérmico de etonogestrel.** Concentración de citocinas cuantificada en plasma por medio de ELISA. **A)** TNF- $\alpha$ , **B)** IL-1 $\beta$  y **C)** IL-10. CON representa el grupo control (sin tratamiento de anticonceptivos) y ET representa al grupo en tratamiento con etonogestrel. Los datos se muestran en medias  $\pm$  DE. \* $p < 0.05$ .  $n = 11$  grupo CON; 13 grupo ET.



**Figura 3: Concentraciones de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, de leucocitos en cultivo con y sin estímulo antigénico (LPS), en mujeres con implante subdérmico de etonogestrel.** Concentraciones de citocinas en sobrenadantes de leucocitos en cultivo, determinadas por medio de ELISA. **A)** TNF- $\alpha$ , **B)** IL-1 $\beta$  y **C)** IL-10. CON/SE: grupo control sin LPS; CON/LPS: grupo control con LPS; ET/SE: grupo experimental sin LPS y; ET/LPS: grupo experimental con LPS. Los datos se muestran en media  $\pm$  DE. n= 11 grupo control; 13 grupo de etonogestrel.



**Figura 4: Proliferación celular de leucocitos de sangre periférica en mujeres con implante subdérmico de etonogestrel.** Determinación de intensidad de fluorescencia y porcentajes de células positivas para tinción por yoduro de propidio en leucocitos de sangre periférica por medio de citometría de flujo. **A)** Diagramas de puntos de la población celular viable seleccionada, de acuerdo a tamaño (FSC) y granularidad (SSC). **B)** Histogramas de fluorescencia para células positivas a yoduro de propidio (M1) y células apoptóticas (M8). n = 2 por grupo con y sin estímulo de LPS.

## 11. Discusión

El uso de los métodos anticonceptivos hormonales se encuentra cada vez más difundido entre la población mexicana, y la vida sexual activa se inicia a edades tan tempranas como los 15 años (2). Considerando que la fertilidad femenina abarca aproximadamente hasta los 50 años; podríamos pensar que el uso prolongado de un anticonceptivo hormonal va convirtiéndose en un hecho cada vez más común, por lo que es importante conocer las implicaciones inmunológicas de la exposición a los progestágenos, para conocer los probables efectos a futuro que estos pudieran tener en la salud femenina, y llegar a recomendarlos de manera más informada; dado aquí el propósito de este estudio.

Observando lo correspondiente a las citocinas, tenemos el precedente de reportes que muestran una disminución de las concentraciones de TNF- $\alpha$  y un aumento de IL-1 $\beta$  e IL-8, dependientes de la dosis de progesterona sintética administrada (1).

En nuestro estudio, encontramos que la IL-10, de la que no contamos con datos que la relacionen previamente a la progesterona o sus análogos, presentó una disminución estadísticamente significativa en su concentración en plasma en el grupo con tratamiento de etonogestrel. Esta fue la única citocina que presentó una diferencia significativa en sus concentraciones en plasma, también presentando una tendencia a la disminución en el cultivo celular en el mismo grupo de estudio. La acción de la IL-10 es principalmente inhibidora de la producción de citocinas por parte de los linfocitos T; al verse reducida, podríamos esperar un aumento en la presencia de citocinas Th1.

Aunque los niveles detectados fueron muy bajos, también se observó una disminución en las concentraciones de IL-1 $\beta$  en plasma del grupo en tratamiento con etonogestrel, lo cual podría afectar su función como activadora de linfocitos; sin embargo, en el cultivo celular, no se observó una diferencia en la concentración de esta citocina entre el grupo control y el grupo con etonogestrel, tanto con estímulo de LPS como sin él.

En el estudio anteriormente citado (43), donde se midieron las concentraciones de citocinas producidas por células mononucleares con estímulo antigénico (LPS) se observó una disminución en la producción de IL-1 $\beta$ : sería importante observar si esto se debe al uso de distintos progestágenos, ya que previamente se había utilizado progesterona sintética, la cual es usada como tratamiento en embarazos de riesgo, obteniendo un aumento en la producción de citocinas anti-inflamatorias; y una disminución en la producción de citocinas pro- inflamatorias (43).

En el plasma no se encontraron diferencias entre las concentraciones de TNF- $\alpha$  entre grupo control y el grupo experimental, sin embargo, en el ensayo con leucocitos en cultivo celular, se observa una tendencia a la disminución de la concentración de TNF- $\alpha$  en el grupo experimental, la cual se presentó de igual manera en el estudio mencionado en los antecedentes (1), donde se observa que la progesterona disminuye la concentración del TNF- $\alpha$ , sin embargo, en ambos grupos existe un aumento de TNF- $\alpha$  al presentarse el estímulo de LPS. Esto podría traducirse en que existe una respuesta ante el estímulo del LPS en ambos grupos, pero, al disminuir la concentración de TNF- $\alpha$ , en el grupo experimental, comparado con el grupo control, se puede pensar en una respuesta inmunológica disminuida.

La ausencia de diferencias importantes en las concentraciones de las citocinas medidas podrían estar relacionadas al tamaño de la muestra, dado que en nuestro estudio la muestra empleada fue muy pequeña, por lo que se sugiere que los efectos de este fármaco sobre la producción de citocinas podrían observarse de mejor manera con una muestra de mayor tamaño.

En cuanto a la proliferación celular, estudios previos *in vitro* han encontrado que la progesterona activa la proliferación celular del estroma endometrial, por medio de la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (37). Los efectos proliferativos de la progesterona se han estudiado para saber si están relacionados a regulación directa de la transcripción o a la activación de cinasas

citoplasmáticas, dada la aparente necesidad de factores de crecimiento (38). Sin embargo, no se ha estudiado su efecto proliferativo en poblaciones de leucocitos, habiéndose hecho solo ensayos en células mesenquimatosas o tejido mamario (1).

Los resultados referentes a la proliferación celular obtenidos en nuestro estudio, debido a fallas en la técnica la mayoría de las muestras, nos impiden realizar un análisis comparativo concluyente. No obstante, pudimos observar que las células provenientes de las muestras de las participantes del grupo de etonogestrel parecen tener un menor porcentaje de células en proceso de apoptosis, el cual es un proceso fisiológico de regulación celular, que a nivel de linfocitos T y B, es un mecanismo que ayuda a eliminar células autorreactivas (46). Se ha observado previamente que la apoptosis alterada en las células T activadas extiende la duración de la fase efectora de la respuesta inmune específica, aumentando así el número de células T efectoras (47), por lo que sería importante también determinar si en el caso de las células provenientes del grupo de mujeres con el implante de etonogestrel, presentan la misma capacidad efectora.

En este sentido, es necesario repetir el ensayo y ampliar también el tamaño de la muestra para poder ver un efecto real sobre el etonogestrel en el ciclo celular de los leucocitos. Podría ser posible también utilizar otra técnica para el estudio del ciclo celular, como es la cuantificación de las distintas proteínas que se producen en cada etapa del ciclo (48).

Al haberse hecho el estudio con leucocitos en general, sin diferenciar tipos de células, resultaría importante saber cómo se afecta cada tipo celular de manera individual, ya que se ha observado que la progesterona participa en la inhibición de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, de las células NK y de la producción de citocinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos (42,43), asimismo, se ha visto que estimula la maduración y acción de los linfocitos B (41). De esta manera, sería útil identificar como se afecta cada una de estas poblaciones celulares,

particularmente en la producción de sus citocinas características y en su capacidad de supervivencia, proliferación y funciones efectoras. Además, sería importante determinar si la concentración de LPS aplicada en el caso de los cultivos celulares tiene una relación directa o inversa con la producción de las citocinas en cuestión, ya que se ha observado previamente que la progesterona afecta la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-Ra, IL 10 e IL8 por parte de macrófagos estimulados con LPS (1), para lo cual sería importante probar con distintas concentraciones de LPS.

## **12. Conclusiones y perspectivas futuras**

Con nuestro estudio podemos observar que la presencia del etonogestrel modifica la producción de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias estudiadas, sin embargo, pareciera que su comportamiento es distinto al de la progesterona por si misma. La disminución de las citocinas pro-inflamatorias concuerda con la acción previamente estudiada de los progestágenos como inhibidores; sin embargo, es necesario ampliar el estudio para tener resultados concluyentes, ya que se observan diferencias de nuestros resultados con estudios previos.

Lo que correspondió a la proliferación celular, el observar disminución de la apoptosis podría tener implicaciones inmunológicas importantes, dada la reactividad de los linfocitos, sin embargo, sería necesario buscar otras técnicas, y repetir el ensayo para corroborar que esto sea cierto, ya que no se ha encontrado información anterior referente al tema y las muestras analizadas fueron muy pocas.

Nuestro estudio refleja resultados que nos instan a continuar con la investigación sobre este tema; sin embargo, se necesita realizar esta investigación con un mayor número de individuos por grupo, para demostrar el grado de significancia estadística de los resultados encontrados, y posteriormente darles una aplicación clínica en cuanto a la adecuación y regulación de la prescripción de los métodos anticonceptivos de etonogestrel.

Sería de nuestro interés además incluir otras citocinas en el estudio, principalmente anti-inflamatorias (por ejemplo el TGF- $\beta$ ), para obtener resultados comparativos y observar efectos más globales de este tipo de fármacos anticonceptivos y sus probables consecuencias clínicas. Además de conocer qué poblaciones leucocitarias son las que están produciendo las diferentes citocinas.

### 13. Bibliografía

1. Peltier MR, Tee SC, Smulian JC. *Effect of Progesterone on Proinflammatory Cytokine Production by Monocytes Stimulated with Pathogens Associated with Preterm birth*. **American Journal of Reproductive Immunology**. 2008. 60 (4): 346–353.
2. Allen-Leigh B, Villalobos-Hernández A, Hernández-Serrato M. *Inicio de vida sexual, uso de anticonceptivos y planificación familiar en mujeres adolescentes y adultas en México*. **Salud Pública de México**. 2013. 55 (Supl.2): 235.
3. Otero FB. *Manual de actualización en metodología anticonceptiva*. 3ª edición México: Laboratorios Organon. 2007. 39-47
4. Tan I, Peeva E, Zandman-Goddard G. *Hormonal modulation of the immune system: A spotlight on the role of progestogens*. **Autoimmunity Reviews**. 2015. 14 (6): 536-542.
5. Jameson JL, De Groot LJ. *Endocrinology: Adult and Pediatric E-Book*. 3ª edición. Elsevier Health Sciences. 2015. 2179.
6. Lei K, Chen L, Georgiou EX, Sooranna SR, Khanjani S, et. al. *Progesterone acts via the nuclear glucocorticoid receptor to suppress IL-1beta-induced COX-2 expression in human term myometrial cells*. **PLOS One**. 2012. 7 (11): e50167.
7. Paul SM, Purdy RH. *Neuroactive steroids*. **FASEB Journal**. 1992. 6 (6): 2311–2322.
8. Legato MJ, Bilezikian JP. *Principles of Gender-specific Medicine*. 2ª edición. Gulf Professional Publishing. 2004. 146.
9. Coad J, Dunstall M. *Anatomy and Physiology for Midwives*. 1ª edición. Elsevier Health Sciences. 2013. 413.
10. Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ. *Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of [Ca(2+)](i) oscillations and cyclical transitions in flagellar beating*. **The Journal of Biological Chemistry**. 2004. 279 (44): 46315–46325.
11. Strauss JF, Barbieri RL. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*. 8ª edición. Elsevier Health Sciences. 2014. 236.
12. Festin M. *Progestágenos en los anticonceptivos orales combinados para la anticoncepción: Comentario de la BSR*. **La Biblioteca de Salud Reproductiva de la OMS**; Ginebra: Organización Mundial de la Salud. 2013. 213.
13. Lemke T, Williams D. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 7ª edición. Lipincott Williams & Wilkins. 2012. 1409.
14. Lentz G, Lobo RA, Gershenson A, Katz, V. *Comprehensive Gynecology*. 6ª edición. Elsevier Health Sciences. 2012. 256.
15. Kuhl H. *Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration*. **Climacteric**. 2015. 8 (Supl 1): 3–63.

16. Carcio H, Secor M. *Advanced Health Assessment of Women: Clinical Skills and Procedures*. 3<sup>a</sup> edición. Springer Publishing Company. 2014. 411.
17. Glasier A, Winikoff B. *Contraception*. 7<sup>a</sup> edición. Health Press. 1999. 41.
18. Vaamonde D, Stefan S, Ashok A. *Exercise and Human Reproduction: Induced Fertility Disorders and Possible Therapies*. 1<sup>a</sup> edición. Springer. 2016. 288.
19. Mayeaux EJ. *The Essential Guide to Primary Care Procedures*. Lipincott Williams & Wilkins. 2012. 589.
20. Brucker MC, King T. *Pharmacology for Women's Health*. 2<sup>a</sup> edición. Jones & Bartlett Publishers. 2015. 368.
21. Benno CR, Thomas R, Kiesel L. *Female Contraception: Update and Trends*. 1<sup>a</sup> edición. Springer Science & Business Media. 2012. 156–163.
22. Wan C, Latter JL, Amirshahi A, Symonds I, Finnie J, et. al. *Progesterone activates multiple innate immune pathways in Chlamydia trachomatis-infected endocervical cells*. **Am J Reprod Immunol**. 2014. 71:165–177.
23. Oft M. IL-10: Master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. **Cancer Immunol Res**. 2014. 2: 194-199.
24. Mosser DM, Zhang X. *Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine*. **Immunological Reviews**. 2008. 226 (1): 205–18.
25. Sharma A, Kumar M, Aich J, Hariharan M, Samir K, et. al. *Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a*. **PNAS**. 2009. 106 (14): 5761–5766.
26. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. **Cell**. 2001. 104 (4): 487–501.
27. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, et. al. *A meta-analysis of cytokines in major depression*. **Biol Psychiatry**. 2010. 67 (5): 446–457.
28. Victor FC, Gottlieb AB. *TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis of psoriasis*. **J Drugs Dermatol**. 2002. 1 (3): 264–75.
29. Brynskov J, Foegh P, Pedersen G, Ellervik C, Kirkegaard T, et. al. *Tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease*. **Gut**. 2002. 51 (1): 37–43.
30. Mikocka-Walus AA, Turnbull DA, Moulding NT, Wilson IG, Andrews JM, et. al. *Controversies surrounding the comorbidity of depression and anxiety in inflammatory bowel disease patients: a literature review*. **Inflammatory Bowel Diseases**. 2007. 13 (2): 225–234.
31. Dinarello A Blood. *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases*. **Charles**. 2011. 117(14): 3720–3732.
32. Contassot E, Beer H, Lars E. *Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin*. **French Swiss Med Wkly**. 2012.142: w13590.
33. Rivers-Auty J, Daniels MJ, Colliver I, Robertson DL, Brough D. *Redefining the ancestral origins of the interleukin-1 superfamily*. **Nature Communications**. 2018. 9 (1): 1156.

34. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, et. al. *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2*. **Immunity**. 2005. 23 (5): 479–490.
35. Sims JE, Nicklin MJ, Bazan JF, Barton JL, Busfield SJ, et.al. *A new nomenclature for IL-1-family genes*. **Trends in Immunology**. 2001. 22 (10): 536–537.
36. Van de Veerdonk FL, Stoeckman AK, Wu G, Boeckermann AN, Azam T, Netea MG, et. al. *IL-38 binds to the IL-36 receptor and has biological effects on immune cells similar to IL-36 receptor antagonist*. **PNAS**. 2012. 109 (8): 3001–3005.
37. Vallejo G, La Greca AD, Tarifa-Reischle IC, Mestre-Citrinovitz AC, Ballaré C, et al. *CDC2 Mediates Progesterin Initiated Endometrial Stromal Cell Proliferation: A PR Signaling to Gene Expression Independently of Its Binding to Chromatin*. 2014. **PLoS ONE**. 9(5): e97311.
38. Skildum A, Faivre E, Lange CA. *Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen activated protein kinases*. **Mol Endocrinol**. 2015. 19: 327–339.
39. Wang R. *Partial Signaling by Cytokines: Cytokine Regulation of Cell Cycle and Fas-Dependent, Activation-Induced Death in CD4<sup>+</sup> Subsets*. **Cellular Immunology**. 1997. 182 (2): 152-160.
40. Tanaka Y. *Roles of cytokines and cell cycle regulating substances in proliferation of cholesteatoma epithelium*. **The Laryngoscope**. 199. 109 (7): 1102-1107.
41. Lodish H. *Molecular cell biology*. 8<sup>a</sup> edición. Freeman. 2016. 321.
42. Lecoeur H. *Nuclear Apoptosis Detection by Flow Cytometry: Endogenous Endonucleases*. **Experimental Cell Research**. 2002. 277(1): 1-14.
43. Ahmed S, Talal N. *Sex hormones and the immune system: part 2. Animal data*. **Baillière's Clinical Rheumatology**. 1990. 4(1): 13-31.
44. Kyurkchiev, D. *Immunoregulation by Progesterone: Effects on Immune Cells and Mesenchymal Stem Cells*. **Advances in Neuroimmune Biology** 2011. 1:105–123.
45. Yao Y., Li H., Ding J., Xia Y., Wang L. *Progesterone impairs antigen-non-specific immune protection by CD8 T memory cells via interferon- $\gamma$  gene hypermethylation*. **PLoS Pathogens**. 2017. 3 (11): e1006736.
46. Elmore S. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. **Toxicologic Pathology**. 2007. 35: 495-516.
47. Zhang Y. *Impaired apoptosis, extended duration of immune responses, and a lupus-like autoimmune disease in IEX-1-transgenic mice*. **PNAS**. 2002. 99 (2): 878-883.
48. Uzbekov R. *Analysis of the Cell Cycle and a Method Employing Synchronized Cells for Study of Protein Expression at Various Stages of the Cell Cycle*. **Biochemistry**. 2004. 69 (5): 489-496.

## 14. Anexos

### 14.1 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	

## 14.2 Anexo 2: Formato de consentimiento informado

### **Efecto del uso de Implante subdérmico de etonogestrel sobre la producción de citocinas y proliferación celular en leucocitos en circulación**

El objetivo del presente proyecto de investigación es 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 una exposición de acuerdo a un tratamiento médico controlado. La importancia de realizar este estudio radica en que se espera que los resultados aporten evidencia sobre los posibles efectos de los anticonceptivos hormonales sobre el sistema inmunológico.

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 del uso de Implante subdérmico de etonogestrel sobre la producción de citocinas y proliferación celular en leucocitos en circulación"**

\_\_\_\_\_  
**Firma del participante**

\_\_\_\_\_  
**Firma del Primer Testigo**

\_\_\_\_\_  
**Firma del Segundo 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:** \_\_\_\_\_

### **14.3 Anexo 3: Soluciones y diluciones para la técnica de ELSA**

#### **Diluciones para preparación de muestra:**

- Diluya el anticuerpo de captura pretratado 1: 200 en el buffer de recubrimiento. Por placa, diluir 60 µL de anticuerpo de captura en 11,94 mL de buffer.
- Reconstituir el estándar liofilizado con 0.2 mL de diluyente de ensayo, vuelva a tapar el vial y mezcle bien. Permitir que el estándar reconstituido se asiente durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego invertir y agitar en vórtex para mezclar.
- Antes de usar, prepare 1,000 µL del estándar en la concentración máxima diluyente de ensayo.
- Realizar seis diluciones en serie de dos veces del máximo estándar.
- Diluir en tubos separados.

#### **Diluciones de las curvas estándar:**

##### **TNF- $\alpha$**

500 pg/mL; 250 pg/mL; 125 pg/mL; 62.5 pg/mL; 31.3 pg / mL; 15.6 pg/mL; 7.8 pg/mL.

##### **IL-1 $\beta$**

2,000 pg/mL; 1,000 pg/mL; 500 pg/mL; 250 pg/mL; 125 pg/mL; 62.5 pg/mL; 31.3 pg/mL

##### **IL10**

250 pg/mL; 125 pg/mL; 62.5 pg/mL; 31.3 pg / mL; 15.6 pg/mL; 7.8 pg/mL; 3.9 pg/mL.

\*Diluyente de ensayo sirve como el estándar cero (0 pg/mL).

- Diluya el anticuerpo de detección biotinilado precertificado 1:200 en diluyente de ensayo.
- Para una placa, diluya 60 µL de anticuerpo de detección en 11.94 mL de diluyente de ensayo.
- Diluir Avidin-HRP 1:1000 en diluyente de ensayo. Para una placa, diluya 12 µL de Avidin-HRP en 11.99 mL de diluyente de ensayo.

## 14.4. Anexo 4: 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 ETICA EN INVESTIGACION

**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](http://www.uaemex.mx)