



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



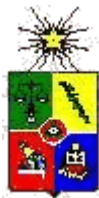
USO DE LEVONORGESTREL COMO ANTICONCEPTIVO  
DE EMERGENCIA EN LA MONA *Cebus apella*

**MARÍA ALEJANDRA FUENTES PRIEGO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

**PROFESOR GUÍA: DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ**

SANTIAGO, CHILE  
2004



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



## USO DE LEVONORGESTREL COMO ANTICONCEPTIVO DE EMERGENCIA EN LA MONA *Cebus apella*

### MARÍA ALEJANDRA FUENTES PRIEGO

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: MARÍA ELENA ORTIZ.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: BESSIE URQUIETA M.	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2004

## **DEDICATORIA**

A Encarnación y Nelson, mis padres.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa Regional de Capacitación en Salud Sexual y Reproductiva para América Latina y El Caribe (PROGRESAR), por otorgarme una beca para desarrollar esta tesis.

Al Dr. Víctor Hugo Parraguez, por ofrecerme esta tesis, por confiar en mi desempeño, y por el tiempo dedicado.

A la Prof. María Elena Ortiz, por dedicarme tiempo, escucharme, apoyarme, compartir conmigo sus conocimientos y por ofrecerme su apoyo profesional y humano.

A la Dra. Rita Ortiz, por enseñarme todo lo que necesité para desarrollar mi tesis, además de enseñarme la importancia del trabajo metódico, de la planificación y del cumplimiento de los horarios. También por su paciencia y apoyo.

A la Dra. Alejandra Ortiz, por compartir sus conocimientos conmigo y ayudarme cuando lo necesité; a Marlene Montecinos, por ayudarme en algunas tareas y manejos dentro del laboratorio y a Julio Castañeda, por ayudarme cada vez que lo necesité, y por su incondicional amor a los monos de la colonia.

Al Dr. Horacio Croxatto, por su apoyo y simpatía y por ayudarme a seleccionar material bibliográfico para mi tema de memoria.

A Elizabeth Núñez y a Carmen Llados por su colaboración y trabajo en el Laboratorio de Radioinmunoensayo (RIA) de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

A Cristina Jorquera, Laura Arancibia y Pilar Rodríguez del Instituto Chileno de Medicina Reproductiva (ICMER) por su amabilidad y buena disposición.

A Álvaro Bahamondes, al Dr. Ernesto Hajek y a Andrés Müller, por ayudar a resolver problemas computacionales.

A Ruth Ramos, por ayudarme, apoyarme y orientarme durante todos los años de estudiante y de tesista.

A mis amigas, compañeras y colegas, Olivia Blank, Manuelita García - Huidobro, Valentina Ramírez y Macarena Salamero, por su gran apoyo y constante aliento, y por estar cuando las necesito.

A Eva Miranda, por su orientación y apoyo profesional, además de su apoyo humano.

A mi amada Familia, por alentarme, apoyarme y soportarme durante este período y por su amor incondicional.

A los animales de la colonia de *Cebus apella*, gracias a los cuales pude llevar a cabo este proyecto.

A todos los que de una u otra manera, durante este tiempo, han estado a mi lado haciéndose partícipes de mi proyecto y de mi vida.

A los que ya se han ido...

Muchas Gracias.

## ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>SUMMARY</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
<b>1. Ciclo reproductivo de la mona <i>Cebus apella</i>.</b>	<b>4</b>
1.1 Dinámica morfológica de los ovarios y fluctuaciones de estradiol y progesterona durante el ciclo menstrual.	<b>4</b>
1.2 Cambios morfofuncionales de la vagina y del endometrio.	<b>6</b>
<b>2. Anticoncepción hormonal de emergencia.</b>	<b>8</b>
2.1 Mifepristona (RU 486).	<b>9</b>
2.2 Método de Yuzpe.	<b>10</b>
2.3 Levonorgestrel.	<b>12</b>
2.3.1 Efecto del LNG sobre la migración espermática.	<b>13</b>
2.3.2 Efecto del LNG sobre el proceso ovulatorio.	<b>14</b>
2.3.3 Efecto del LNG sobre el endometrio.	<b>14</b>
2.4 Efecto de la administración de hormonas esteroidales sobre la fertilidad en animales de experimentación.	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>1. Objetivo general.</b>	<b>18</b>
<b>2. Objetivos específicos.</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>19</b>
<b>1. Animales.</b>	<b>19</b>
<b>2. Diseño para determinar el efecto post - coital del LNG sobre         la fertilidad.</b>	<b>20</b>

<b>3. Seguimiento del ciclo.</b>	<b>21</b>
<b>4. Tratamiento.</b>	<b>23</b>
<b>5. Procedimientos y técnicas.</b>	<b>24</b>
5.1 Frotis vaginales.	24
5.2 Apareamiento.	25
5.3 Exámenes ecográficos.	25
5.4 Toma de muestras de sangre.	26
<b>6. Biodisponibilidad del LNG.</b>	<b>27</b>
<b>7. Análisis de resultados.</b>	<b>28</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>1. Evaluación inicial.</b>	<b>30</b>
<b>2. Efecto post - coital del LNG sobre la fertilidad.</b>	<b>30</b>
<b>3. Duración y secuencia de las fases del ciclo menstrual según la citología vaginal.</b>	<b>31</b>
<b>4. Tamaño del folículo dominante y relación temporal entre cópula y ovulación.</b>	<b>32</b>
<b>5. Evaluación del saco gestacional.</b>	<b>34</b>
<b>6. Concentraciones plasmáticas de esteroides ováricos.</b>	<b>35</b>
<b>7. Duración del sangrado endometrial consecuente con la menstruación y con la interrupción de la gestación.</b>	<b>38</b>
<b>8. Hematocrito.</b>	<b>38</b>
<b>9. Biodisponibilidad del LNG.</b>	<b>38</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>

## RESUMEN

El mono *Cebus apella*, ha demostrado ser un buen modelo animal para estudios de fisiología reproductiva en primates, fundamentalmente porque posee una gran capacidad para adaptarse y reproducirse en cautiverio y porque el aparato reproductor de la hembra posee semejanzas anatómicas y fisiológicas con el aparato reproductor de la mujer y con el de monas del viejo mundo. Por estas razones pensamos que *Cebus apella* puede ser un modelo animal adecuado para estudiar el mecanismo de acción de levonorgestrel (LNG), administrado como anticonceptivo de emergencia.

En este estudio se determinó el efecto de la administración post - coital de LNG sobre la fertilidad de la mona *Cebus apella*. Para esto, se administraron una o dos dosis de 0,75 mg de LNG subcutánea (s.c.) u oral (p.o.) durante las primeras 24 horas después de la cópula. Se utilizaron 12 hembras con ciclos menstruales regulares con una duración de 16 a 25 días. Cada hembra contribuyó con dos ciclos tratados con LNG (tratados) y dos ciclos con administración de vehículo (controles), los cuales fueron distribuidos al azar. Los ciclos fueron monitoreados con frotis vaginales para reconocer el período periovulatorio (óptimo para el apareamiento) y para confirmar la cópula. Además, se utilizó ultrasonografía para confirmar la ovulación y la gestación. A las hembras que se preñaron se les interrumpió la gestación con una antiprogesterina (mifepristona) y fueron reintroducidas al estudio, al igual que las no preñadas, en el ciclo subsiguiente.

La gestación se produjo en 13 de 24 ciclos tratados con LNG y en 13 de 24 ciclos controles. Por lo tanto, la administración post - coital de LNG no reduce el número de embriones que se implantan.

Se demuestra, por primera vez en un primate, que el LNG administrado como anticonceptivo de emergencia, no interfiere con procesos posteriores a la fecundación.



## SUMMARY

The new world monkey, *Cebus apella*, has been demonstrated to be an adequate animal model for reproductive physiology studies in primates, mainly because they have a great adaptation and reproductive capacity in captivity, and because the anatomy and physiology of the female reproductive tract is similar to that of women and old world monkeys. For these reasons we thought that *Cebus apella* might be an adequate animal model to study the mechanism of action of levonorgestrel (LNG) as an emergency contraceptive.

In this study we determined the effect of post - coital administration of LNG on fertility, in the *Cebus* monkey. For this purpose, LNG 0,75 mg or vehicle were administered orally or subcutaneously once or twice within the first 24 h after mating occurring very close to the time of ovulation. Females that became pregnant were aborted with mifepristone and re - entered to the study after a resting cycle until each female had contributed, at random, with two LNG and two vehicle - treated cycles. Vaginal smears and ultrasonographic examinations were performed before and after mating and immediately before treatment to examine ovaries and pinpoint the timing of copulation and treatment with respect to ovulation.

The overall pregnancies were 13 out of 24 treated cycles in each group. Therefore the pregnancy rate was identical in LNG and vehicle treated cycles.

These results show for the first time in a primate species, that LNG administered as used in emergency contraception in women has no impact on fertilization and subsequent processes. LNG given post - coitally does not prevent pregnancy in this primate species, apparently because *Cebus apella* has a different mating pattern than humans.

## INTRODUCCIÓN

El *Cebus apella* es un mono del Nuevo Mundo capaz de adaptarse a variados hábitats naturales de las regiones tropicales y subtropicales de América del Sur. La Figura 1 muestra la distribución geográfica de esta especie, que se extiende desde los llanos de Colombia y Venezuela, a través de la mayor parte del Amazonas y de las Guyanas, el sur y el este del Mato Grosso del centro de Brasil, los bosques atlánticos del este de Brasil y los bosques subtropicales del norte de Argentina (Nagle y Denari, 1983; Rylands *et al*, 1997). Se alimenta de una gran variedad de frutas, semillas, hojas tiernas, flores, huevos e insectos y ocasionalmente, de pequeños mamíferos, reptiles y aves (Mittermeier y Coimbra - Filho, 1983).

**Figura 1. Distribución geográfica de *Cebus apella*.**



En su hábitat natural los *Cebus apella* (Figura 2) viven en grupos compuestos por aproximadamente 30 individuos, hembras y machos de distintas edades entre los cuales se establece una estructura social jerárquica y polígama. El macho dominante es el que tiene la primera opción para aparearse, alimentarse y proteger al grupo de los depredadores. El apareamiento ocurre cuando la hembra está receptiva al macho.

Para lograr el apareamiento, la hembra comunica al macho su disposición con sonidos y gestos característicos. El tiempo de gestación varía entre 150 y 160 días y normalmente nace una sola cría (Kinzey, 1989). A pesar de su amplia distribución geográfica, algunas subespecies del género *Cebus* están en peligro de extinción debido a la deforestación de las regiones donde habita y a la caza indiscriminada de estos primates con fines comerciales (Mittermeier y Coimbra - Filho, 1983).

**Figura 2. Ejemplares de *Cebus apella* en su medio ambiente.**



**Macho**



**Hembra**

Otra característica del *Cebus apella* es su buena capacidad de adaptarse y reproducirse en cautiverio. Esto ha incentivado el establecimiento de colonias de animales destinadas a la investigación biomédica sobre reproducción, enfermedades infecciosas y patologías en general (Nagle y Denari, 1983; Corradini *et al*, 1998; Ortiz, A., 2000; Ortiz, R., 2000).

La hembra *Cebus apella* es especialmente interesante para estudiar aspectos poco conocidos de la fisiología reproductiva de los primates, incluyendo la especie humana, dado que estudios previos demuestran que distintos procedimientos experimentales (frotis vaginales, toma de muestras de sangre, ecografías) no afectan el curso normal de los ciclos reproductivos ni de la gestación. Adicionalmente, el ciclo ovárico y las

características anatómicas y fisiológicas del tracto reproductor de esta especie son más parecidas a las de la mujer que las de otros animales (Nagle y Denari, 1983; Corradini *et al*, 1998; Ortiz, A., 2000; Ortiz, R., 2000), por lo tanto, la mona *Cebus apella* puede ser un modelo animal adecuado para estudiar el mecanismo de acción del LNG administrado como anticonceptivo de emergencia.

La anticoncepción de emergencia comprende métodos anticonceptivos que las mujeres pueden utilizar después de un coito no protegido para evitar un embarazo no deseado. Cuando el levonorgestrel (LNG) se administra como anticonceptivo de emergencia dentro de las primeras 72 horas después del coito, tiene una eficacia que varía entre 60 y 89 % (Ho y Kwan, 1993; WHO, 1998). Para muchas personas, lo más crítico de la anticoncepción de emergencia es no saber si previene el embarazo porque impide la fecundación o porque interfiere con procesos posteriores a ella. Problemas éticos y logísticos impiden desarrollar un estudio que permita dilucidar este asunto en la mujer.

Este estudio tiene una clara proyección para la medicina humana y para evaluar la posibilidad de utilizar LNG como una herramienta para el control de la reproducción de monos *Cebus apella* u otros primates mantenidos en cautiverio en centros de rehabilitación, zoológicos, circos, centros de investigación y casas particulares.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Ciclo reproductivo de la mona *Cebus apella*.

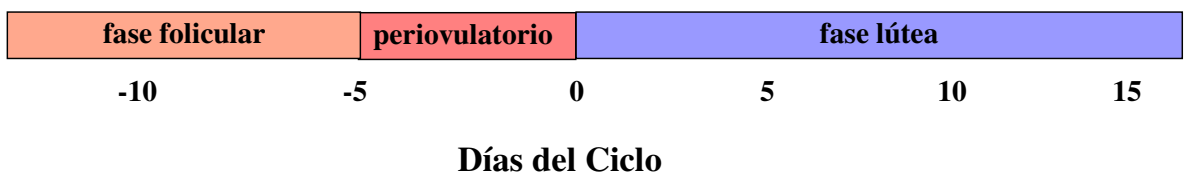
Las hembras *Cebus apella* alcanzan la madurez sexual entre los 4 y 5 años de edad. A esta edad ocurre la erupción de los caninos y se alcanza un peso aproximado de 1,8 Kg. Tienen un ciclo ovárico bifásico de  $20,3 \pm 2,8$  días ( $X \pm EE$ ) con un rango que puede variar entre 13 y 28 días (Nagle y Denari, 1983). En la colonia de *Cebus apella* de la Pontificia Universidad Católica de Chile, se ha observado que la duración del ciclo normalmente varía entre 17 y 22 días (Ortiz, R., 2000). Las fases folicular y lútea son consecuentes con la dinámica morfológica de los ovarios y con las fluctuaciones de estradiol ( $E_2$ ) y progesterona ( $P_4$ ) que se producen a lo largo del ciclo menstrual y que pueden ser evaluadas determinando las concentraciones plasmáticas por radioinmunoanálisis (RIA). Estas fluctuaciones inducen cambios morfofuncionales de la vagina y del endometrio que pueden ser reconocidos mediante frotis vaginales, histología y ultrasonografía (Nagle y Denari, 1983; Ortiz, A., 2000; Ortiz, R., 2000).

#### 1.1 Dinámica morfológica de los ovarios y fluctuaciones de estradiol y progesterona durante el ciclo menstrual.

En la fase folicular se produce la selección y crecimiento del folículo dominante, que puede observarse mediante ultrasonografía (Figura 3). El folículo comienza a aumentar de tamaño hasta alcanzar un diámetro máximo que varía entre 6,4 y 9,7 mm al final del período periovulatorio (Ortiz, R., 2000). Entre 24 a 30 horas antes de la ovulación (día 0), comienza la vascularización que posteriormente aumenta, sin variación del diámetro folicular. Durante este proceso también se puede observar la formación del cono hemorrágico, que aparece como un anillo compresivo en la base del folículo. En el ovario, al comienzo de la ovulación, se produce una adhesión de la fimbria al ovario ovulatorio por al menos 24 horas (Nagle *et al*, 1980). La ovulación se reconoce por una disminución del diámetro folicular (Ortiz, R., 2000). Después de la ovulación, en la mayoría de las hembras, se inicia la pérdida de la arquitectura vascular del cuerpo lúteo

recién formado y un cierre progresivo del estigma ovárico, pero en algunas ocasiones el estigma puede mantenerse abierto durante el resto del ciclo por una revascularización de las paredes del cuerpo lúteo. Esta estructura podría corresponder al comienzo de la luteinización (Nagle y Denari, 1983).

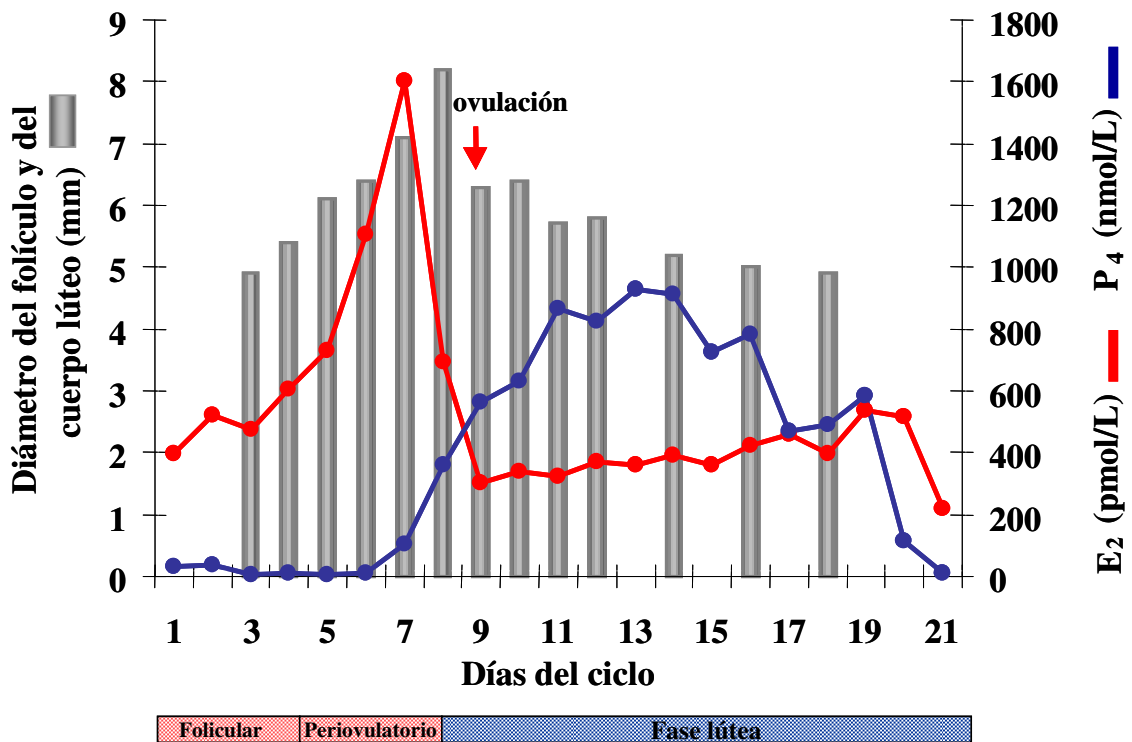
**Figura 3. Imágenes ultrasonográficas del folículo dominante y del cuerpo lúteo en distintas etapas del ciclo menstrual de la mona *Cebus apella*.**



Durante el ciclo, el  $E_2$  aumenta gradualmente desde 500 a 950 pmol/L entre la menstruación y el período periovulatorio. El pico preovulatorio con valores superiores a 1500 pmol/L se produce 48 a 72 horas antes de la ovulación. Posteriormente, durante la fase lútea, los valores disminuyen a 380 pmol/L (Ortiz, A., 2000). El pico de  $E_2$  estimula una mayor liberación hipofisiaria de la hormona luteinizante (LH), que alcanza su máxima concentración 8 a 20 horas después del pico de  $E_2$  (Nagle y Denari, 1983). El perfil de  $E_2$  a lo largo del ciclo menstrual de la mona *Cebus apella* es similar al de la mujer, pero a diferencia de ella, en las monas no se produce un aumento durante la fase lútea media. La concentración plasmática de  $P_4$  se mantiene baja (100 - 150 nmol/L) durante la mayor parte de la fase folicular. Esta concentración empieza a aumentar gradualmente desde el final del período periovulatorio, hasta alcanzar concentraciones máximas de 750 nmol/L en la fase lútea media. Dos a tres días antes de la menstruación, la concentración de  $P_4$  disminuye nuevamente a 430 nmol/L, lo cual coincide con la involución del cuerpo lúteo (Figura 4). Las concentraciones de  $P_4$  que se producen

durante la fase lútea media en esta mona, son 6 a 10 veces mayores que las que se producen en la mujer y 8 a 12 veces mayores que las descritas en monas del Viejo Mundo (Ortiz, A., 2000; Ortiz, R., 2000).

**Figura 4. Relación temporal entre las concentraciones plasmáticas de estradiol, progesterona, desarrollo folicular, cuerpo lúteo y citología vaginal durante el ciclo menstrual de la mona *Cebus apella*.**



**Fases del ciclo reconocidas por citología vaginal**

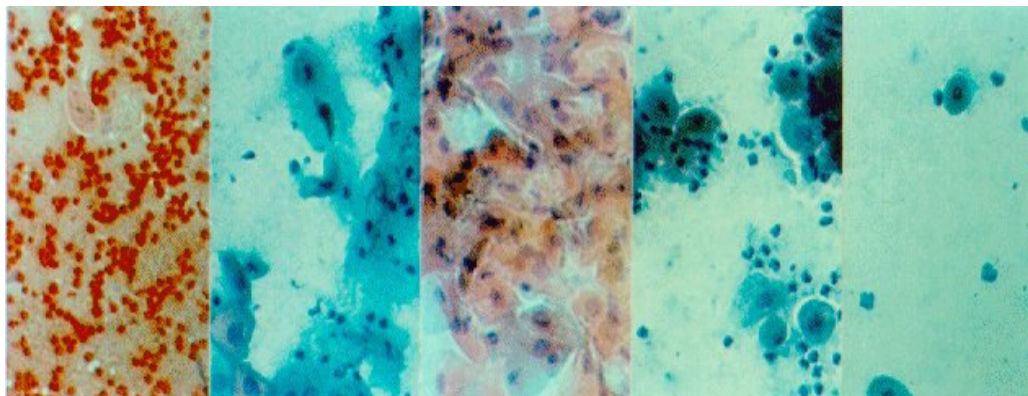
### 1.2 Cambios morfofuncionales de la vagina y del endometrio.

De acuerdo a la citología vaginal (Figura 5), la fase folicular tiene una duración de  $8,8 \pm 0,3$  días ( $X \pm EE$ ) y la fase lútea  $11,0 \pm 0,5$  días ( $X \pm EE$ ). En la fase folicular se reconocen tres períodos: menstrual, folicular y periovulatorio. En el frotis vaginal obtenido durante la menstruación que dura 1 a 5 días ( $2,8 \pm 0,4$ ;  $X \pm EE$ ) se pueden observar eritrocitos, pero no se visualiza un sangramiento externo, como sucede en

simios, en monas del Viejo Mundo y en la mujer. En la fase folicular que sigue a la menstruación, los frotis vaginales presentan una disminución de los leucocitos y un aumento de las células epiteliales superficiales de aspecto cianofílico y eosinofílico e intermedias y parabasales cianofílicas, que están inmersas en un mucus transparente. En el frotis vaginal del período periovulatorio se observa la máxima celularidad y eosinofilia (Nagle y Denari, 1983; Ortiz, A., 2000; Ortiz, R., 2000).

La fase lútea tiene una duración de 8 a 12 días y su frotis vaginal se caracteriza por la reaparición y aumento progresivo de leucocitos, disminución de las células epiteliales, desaparición de las agregaciones celulares eosinofílicas y aparición de detritus celulares.

**Figura 5. Citología vaginal según frotis.**



**Menstruación      Folicular      Periovulatorio      Lútea Temprana      Lútea Tardía**

### **Fases del ciclo menstrual**

En esta fase se produce la formación del cuerpo lúteo y un ambiente propicio para el desarrollo e implantación de un embrión, en cuyo caso, durante la gestación, se mantienen las características de la citología vaginal de la fase lútea, de lo contrario, comenzará un nuevo ciclo junto con la siguiente menstruación (Nagle y Denari, 1983; Ortiz, A., 2000; Ortiz, R., 2000).

En el endometrio se producen diversos cambios morfofuncionales durante el ciclo, tal es así que durante la menstruación se produce una descamación parcial de la capa superficial del endometrio, necrosis de las glándulas y del estroma, y trombos de fibrina



en algunos vasos del estroma. Consecuentemente, la capa endometrial es delgada, las glándulas endometriales son estrechas y están revestidas por un epitelio pseudoestratificado y el estroma es denso. En esta etapa no se detectan mitosis en las glándulas ni en el estroma. En el período periovulatorio, se observa un aumento de mitosis tanto en las glándulas como en el estroma, presencia de secreción glandular intraluminal y edema, y cambios predeciduales perivasculares en el estroma (Nagle y Denari, 1983).

Durante la fase lútea, en el endometrio persisten las mitosis de las células epiteliales, existe una abundante secreción glandular y ausencia de arteriolas espiraladas. En el estroma las células predeciduales perivasculares están distribuidas como parches. Al final de esta fase se produce la descamación de la capa superficial del endometrio para dar paso al nuevo ciclo con el comienzo de la menstruación (Nagle y Denari, 1983).

## **2. Anticoncepción hormonal de emergencia.**

Se denominan “anticonceptivos hormonales de emergencia” a los tratamientos hormonales que se pueden utilizar dentro de horas o pocos días después de un coito o apareamiento no programado o no protegido, con el propósito de evitar una gestación no deseada.

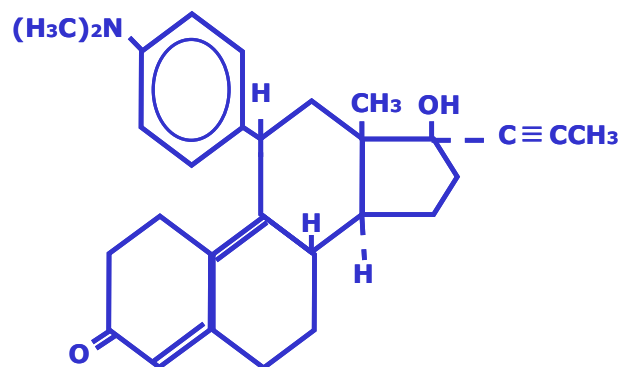
La investigación realizada en los últimos años ha permitido determinar la dosificación, efectividad y efectos colaterales de cada método, pero no permite establecer el mecanismo de acción de todos ellos. En esta revisión se incluye información sobre la anticoncepción de emergencia usada actualmente en la mujer. Ésta se basa en la administración de píldoras que contienen mifepristona (RU 486) o LNG combinado con etinil estradiol (método de Yuzpe) o LNG solo (Croxatto *et al*, 2001). La mifepristona se incluye en esta revisión a pesar de no ser una hormona, sino una antiprogestina y porque está disponible como método anticonceptivo de emergencia en China. También se incluye información sobre el efecto de la administración de hormonas esteroidales sobre procesos reproductivos en animales de experimentación.

La aceptación del uso de los anticonceptivos de emergencia depende fundamentalmente de la posibilidad de establecer si previenen la gestación porque actúan sobre etapas del proceso reproductivo que ocurren antes de la fecundación, tales como la maduración folicular, la ovulación y la migración espermática, en cuyo caso no se podría argumentar un efecto microabortivo. Sin embargo, si actuaran sobre etapas que ocurren después de la fecundación, tales como el desarrollo y transporte del cigoto al útero, la retención de la mórula o del blastocisto en el útero antes de la implantación, la receptividad endometrial y la implantación del blastocisto (Croxatto *et al*, 2001), se podría argumentar un efecto microabortivo.

## 2.1 Mifepristona (RU 486).

La mifepristona es un derivado de la 19 - nor noretindrona, que contiene un sustituto dimetil - aminofenil en la posición 11 $\beta$  (Figura 6).

**Figura 6. Estructura química de la mifepristona.**



Es un potente antagonista competitivo de la unión de P<sub>4</sub> a sus receptores y menos potente a la unión de glucocorticoides a sus receptores (Lahteenmaki *et al*, 1987; Williams y Stancel, 1996). Los efectos de la administración de RU 486 sobre la fertilidad y procesos reproductivos dependen de la dosis y del momento del ciclo en que se administra. La administración post - coital de 10 y 600 mg vía oral por una sola vez, previene entre el 84 - 86 % de los embarazos (WHO, 1999). Cuando es administrada

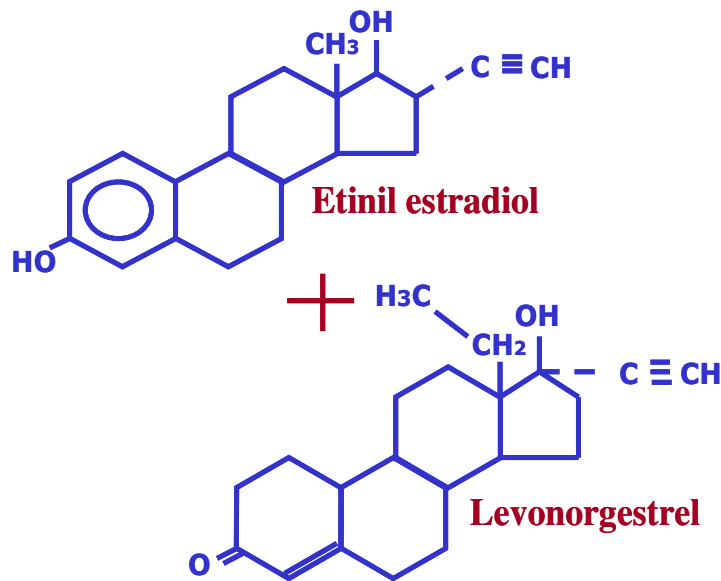
durante el período preovulatorio, inhibe o retrasa la ovulación y, dependiendo de la dosis, retrasa la presentación de la menstruación, siendo la dosis de 600 mg la que produce un mayor retraso. Una dosis de 5 mg detiene la maduración folicular (Croxatto *et al*, 1995) y 10 - 100 mg administrados en los días 6 y 10 del ciclo, disminuyen las concentraciones plasmáticas de la LH y de la hormona folículo estimulante (FSH) (Permezel *et al*, 1989). Cuando se administra en la fase lútea 200 mg dos días después del pico preovulatorio de LH, retrasa el desarrollo endometrial por al menos seis días, aunque los niveles de P<sub>4</sub> sean normales (Gemzell - Danielsson *et al*, 1994). La administración de 5 - 200 mg produce una asincronía en la maduración endometrial (Graham *et al*, 1991; Greene *et al*, 1992; Berthois *et al*, 1991). Otros estudios muestran que una dosis única de 2 ó 10 mg/kg en mono rhesus (Ghosh y Sengupta, 1993) y de 10 ó 200 mg en la mujer (Gemzell - Danielsson *et al*, 1997; Marions *et al*, 2002) en la fase lútea temprana previenen la gestación.

En el plasma, las concentraciones máximas de RU 486 se detectan varias horas después de la administración, depurándose con lentitud, presentando una vida media de 20 a 40 horas (Williams y Stancel, 1996). Los efectos colaterales son menores que los provocados por el método de Yuzpe y se relacionan con la dosis administrada, a menor dosis menos efectos colaterales. Algunos de ellos son náuseas, dolor de cabeza, fatiga y retraso de la próxima menstruación. También se ha usado como anticonceptivo post-coital. La administración de 10 mg es más eficaz que el método de Yuzpe (Webb *et al*, 1992; WHO 2002). Como anticonceptivo de emergencia, puede prevenir la gestación interfiriendo con procesos que ocurren antes o después de la fecundación e incluso después de la implantación.

## **2.2 Método de Yuzpe.**

El método de Yuzpe consiste en la administración de comprimidos que contienen 100 µg de etinil estradiol + 500 µg de LNG (Figura 7).

**Figura 7. Estructura química de los componentes del método de Yuzpe.**



Los comprimidos se toman en dos dosis separadas por 12 horas dentro de las primeras 72 horas post - coito. La efectividad de este método disminuye a medida que aumenta el intervalo entre el coito y el tratamiento. La tasa cruda de falla del método aumenta de 0,5 %, cuando el tratamiento se administra dentro de las primeras 12 horas después del coito; a 4,1 % cuando el tratamiento se administra entre 61 a 72 horas después del coito (Piaggio *et al*, 1999).

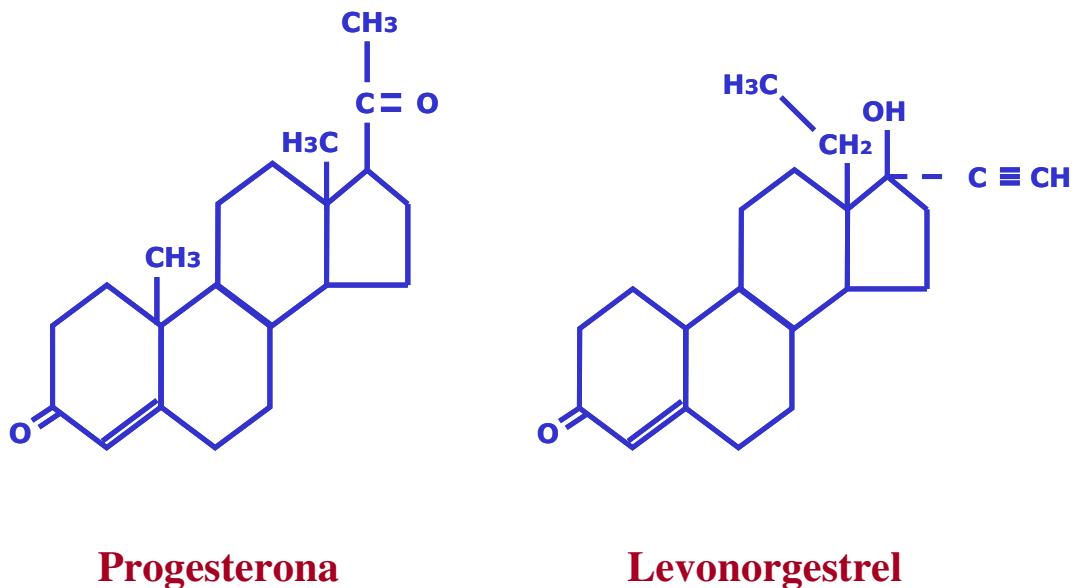
En la mujer, interfiere con el proceso ovulatorio cuando se administra en la fase folicular temprana y modifica algunos parámetros morfométricos del endometrio cuando se administra después de la ovulación. La administración previa al alza de la LH, afecta el curso temporal y/o la amplitud del pico preovulatorio y retarda o suprime la ovulación cuando el tratamiento coincide con folículos pequeños (12 a 14 mm) o medianos (15 a 17 mm). Por lo tanto, si el método de Yuzpe se administrara coincidiendo con un folículo de 12 - 17 mm, la falla de la ovulación o la disfunción ovulatoria podrían dar cuenta de al menos un 90 % de la efectividad anticonceptiva. Si el tratamiento se administra durante el pico de LH, no afecta la secreción de la hormona ni la ovulación (Swahn *et al*, 1996; Croxatto *et al*, 2002). La administración post - ovulatoria induce un aumento significativo de las células vacuoladas y del lumen de las

glándulas endometriales, pero no modifica el número de glándulas ni las mitosis de las células glandulares (Swahn *et al*, 1996). Los efectos colaterales más reportados son náuseas, vómitos, mareos y fatiga (WHO, 1998; Croxatto *et al*, 2001).

### 2.3 Levonorgestrel

El LNG es una progestina sintética, del grupo de progestágenos que derivan de la 19 - nortestosterona y que se denominan compuestos 19 - nor. Es una mezcla racémica de d - norgestrel y l - norgestrel, siendo el d - norgestrel la parte biológicamente activa. Se diferencia de la P<sub>4</sub> por la presencia de distintos radicales en C<sub>17</sub> y C<sub>18</sub> y por la ausencia, en el LNG, del grupo CH<sub>3</sub> en C<sub>10</sub> (Figura 8).

**Figura 8. Estructura química de la progesterona y del levonorgestrel.**



Tiene una potente actividad progestacional y se usa ampliamente como anticonceptivo en la mujer. El LNG puede ser administrado vía oral, intrauterina o como implante subdérmico. Solo o combinado (método de Yuzpe) ha sido exitosamente utilizado como anticonceptivo de emergencia. El tratamiento con LNG solo, consiste en la administración de dos comprimidos que contienen 0,75 mg cada uno que se toman con

un intervalo de 12 horas dentro de las primeras 72 horas post - coito. Al igual que el método de Yuzpe, su efectividad disminuye a medida que aumenta el intervalo entre el coito y el tratamiento. La tasa cruda de falla del método aumenta 0,4 %, 1,2 % y 2,7 % cuando el tratamiento se administra dentro de las primeras, segundas o terceras 24 horas post - coito (WHO, 1998).

Los efectos colaterales más frecuentes son náuseas (23 %), dolor abdominal (18 %), fatiga (17 %), sangramiento menstrual profuso o leve (14 - 13 %), mareos (11 %), dolor o sensibilidad en las mamas (11 %), vómitos (6 %) y diarrea (5 %). En relación a éstos, en un estudio comparativo de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), se concluye que el LNG es mejor tolerado que el método de Yuzpe (WHO, 1998).

Dado que el LNG produce menos efectos colaterales que el método de Yuzpe, existe gran interés por conocer el mecanismo de acción a través del cual su administración post - coital previene la gestación. Por razones éticas y logísticas, no ha sido posible separar grupos de mujeres que tomen anticonceptivos de emergencia después de la fecundación para evaluar su efecto en el establecimiento del embarazo. Por lo tanto, no hay evidencia directa a favor o en contra de la hipótesis que estas píldoras previenen el embarazo por interferencia con eventos post - fecundación.

La información disponible se basa en estudios relativos al efecto del LNG como anticonceptivo de emergencia, sobre la migración espermática, la calidad del moco cervical (Kessuru *et al*, 1974), el proceso ovulatorio y el endometrio (Durand *et al*, 2001; Marions *et al*, 2002).

### **2.3.1 Efecto del LNG sobre la migración espermática.**

La administración de 0,4 mg de LNG 3 a 10 horas después del coito afectó la migración espermática entre 3 y 9 horas después del tratamiento en la mujer. Redujo el número de espermatozoides recuperados de la cavidad uterina, aumentó el pH del fluido uterino (lo cual inmovilizó a los espermatozoides) y aumentó la viscosidad del moco cervical (lo cual impidió el paso de más espermatozoides desde el cuello del útero hacia la cavidad

uterina). Aunque los investigadores usaron sólo el 57 % de la dosis que se usa normalmente como anticonceptivo de emergencia, estos resultados muestran un claro efecto del LNG sobre la migración espermática (Kesseru *et al*, 1974).

### **2.3.2 Efecto del LNG sobre el proceso ovulatorio.**

Los conocimientos actuales del proceso de ovulación indican que una elevación normal de gonadotropina actúa sobre los folículos maduros y desencadena una serie de respuestas locales, coordinadas, que eventualmente llevan a la liberación del oocito maduro fecundable y a la formación del cuerpo lúteo completamente funcional (Croxatto *et al*, 2003).

Muchos grupos de investigadores, usando distintos diseños experimentales, han explorado la posibilidad que las píldoras de anticoncepción de emergencia alteren el proceso ovulatorio de la mujer. Durand *et al* (2001) y Marions *et al* (2002), encontraron instancias en las cuales ninguno de los aspectos estudiados fue anormal, así como instancias en donde el pico de la LH estaba parcial o totalmente suprimido o pospuesto, o la luteinización falló parcial o totalmente. Los resultados parecen depender del momento de la administración de la anticoncepción de emergencia en relación al ciclo ovárico. Dependiendo de cuán cerca esté el pico de la LH al momento del tratamiento, el LNG inhibe o pospone la elevación de gonadotropina o la ruptura del folículo, o interfiere con la formación del cuerpo lúteo, o no tiene efecto en estos procesos. Por lo tanto, las píldoras de anticoncepción de emergencia dadas durante la fase folicular tienen la capacidad de interferir con el proceso ovulatorio, ya sea suprimiendo el pico de la LH, la ruptura folicular o la luteinización (Croxatto *et al*, 2003).

### **2.3.3 Efecto del LNG sobre el endometrio.**

El único mecanismo de post - fecundación que ha sido investigado y sólo indirectamente, es una alteración en la receptividad endometrial que podría interferir

con la implantación. En el estudio de Durand *et al* (2001), se examinó la biopsia del endometrio obtenida 9 días después del pico de LH en 24 mujeres que recibieron LNG en diferentes momentos del período periovulatorio para analizar 3 variables morfológicas al microscopio de luz (número de glándulas, edema del estroma y cambios predeciduales evaluados por la presencia de arterias espiraladas prominentes). En ninguna de ellas se evidenciaron diferencias con lo observado en las biopsias obtenidas en los ciclos controles de las mismas voluntarias. En el estudio publicado por Marions *et al* (2002) se examinó la biopsia de endometrio obtenida en el período de receptividad endometrial en 3 mujeres que recibieron LNG dos días antes del alza preovulatoria de LH y en 4 que lo recibieron dos días después. Se analizaron 7 parámetros morfométricos al microscopio de luz (número de glándulas por mm<sup>2</sup>, número de mitosis de la glándula y del estroma x 1000 células glandulares y de estroma respectivamente, diámetro glandular en µm, alto de glándulas epiteliales, células con vacuolización basal x 1000 células glandulares y grado de edema del estroma), 1 al microscopio electrónico de Barrido (presencia de pinópodos) y 6 variables moleculares por inmunohistoquímica (expresión de COX - 1, de COX - 2, de integrinas  $\alpha$  3 y  $\alpha$  4, concentración de receptores de P<sub>4</sub> y componentes secretores del endometrio). Ninguna de estas variables mostró diferencias con lo observado en las biopsias obtenidas en los ciclos controles de las mismas voluntarias.

Por lo tanto, desde el punto de vista fisiológico y farmacológico, es muy poco probable que la administración de progestágenos sintéticos como el LNG pueda reducir la receptividad endometrial o que impida la implantación (Croxatto *et al*, 2003).

#### **2.4 Efecto de la administración de hormonas esteroidales sobre la fertilidad en animales de experimentación.**

El efecto del LNG solo o combinado, administrado como anticonceptivo de emergencia, no se ha estudiado en primates no humanos. Sin embargo, la literatura muestra bastante información sobre el efecto de E<sub>2</sub>, progestinas y antiprogestinas sobre la fertilidad y el tracto reproductivo de estos primates (Croxatto *et al*, 2001). La mayoría de estos estudios se ha hecho en monos rhesus.



Si en monos rhesus se administran dosis suprafisiológicas de E<sub>2</sub> en la mitad o al final de la fase folicular, se produce atresia folicular o luteinización sin ruptura del folículo dominante, reduciéndose la viabilidad de las células de la granulosa, la síntesis de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> y afectando negativamente al oocito (Dierschke *et al*, 1994; Hutz *et al*, 1986). Además, se produce una depresión en el crecimiento endometrial, generando una influencia negativa en el factor de crecimiento endotelial vascular, por lo tanto, la receptividad endometrial se ve afectada y por ende la implantación (Greb *et al*, 1997). Los efectos de la administración de E<sub>2</sub> en la fase folicular podrían estar mediados por un alza prematura de LH, lo cual podría inhibir la ovulación y posterior formación de un cuerpo lúteo funcional (Yamaji *et al*, 1971; Karsch *et al*, 1973). En los macacos, la administración post - ovulatoria inmediata puede interferir con la gestación (Morris, 1973).

La administración concomitante de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> en monos rhesus antes del alza de LH, inhibe la ovulación (Dierschke *et al*, 1973). Por otra parte, la administración de estas hormonas durante la fase lútea temprana, en rhesus y en *Cebus apella*, induce una prematura luteolisis (Hutchison *et al*, 1987). Estos efectos podrían explicar la eficacia anticonceptiva de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> en monos.

En rhesus, la administración preovulatoria de progestinas exógenas antagoniza la producción de E<sub>2</sub> necesaria para la liberación de LH y, consecuentemente, para la ovulación (Dierschke *et al*, 1973; Spies *et al*, 1971). Estas alteraciones producen una asincronía en el desarrollo de las glándulas y del estroma en el endometrio (Greb *et al*, 1997; Okulicz 1993, Clarke y Sutherland, 1990).

En rhesus la P<sub>4</sub> juega un rol importante durante el período periovulatorio y la fase lútea (Chandrasekhar *et al*, 1994; Duffy *et al*, 1994; Hibbert *et al*, 1996; Zelinski - Wooten y Stouffer, 1996), por lo tanto, la reducción de la biodisponibilidad de P<sub>4</sub>, ya sea por inhibición en la síntesis o por competencia por los receptores, puede interferir con la ovulación, la función del cuerpo lúteo y el subsecuente desarrollo endometrial.

Por ejemplo, la administración preovulatoria de inhibidores de la síntesis de P<sub>4</sub>, induce la formación de un folículo luteinizado no eclosionado, porque interfiere con los

mecanismos de la ruptura folicular (Hibbert *et al*, 1996). Por otra parte, las antiprogestinas también pueden interferir con la ovulación porque si se administran en la fase folicular detienen el crecimiento del folículo, afectan al alza de LH y, por lo tanto, la ovulación puede ser retrasada o inhibida (Collins y Hodgen, 1986; Ghosh *et al*, 1997).

En la mayoría de los trabajos destinados al estudio de los efectos que producen los esteroides sobre la fertilidad en los animales de experimentación, se han utilizado conejo, rata y ratón como modelos animales y E<sub>2</sub>, progestinas y mifepristona como esteroides. En estos animales, al igual que en primates no humanos, el efecto del LNG ha sido poco estudiado y sólo recientemente se publicó un trabajo hecho en la rata (Müller *et al*, 2003). Los resultados sobre la acción de los esteroides muestran que los efectos son variados dependiendo de la especie, de las dosis, del momento de la administración y de la hormona administrada. Por ejemplo, la administración de E<sub>2</sub> en la rata interfiere con la fertilidad porque cualquier dosis entre 1 y 25 µg adelanta la llegada de los embriones al útero y consecuentemente éstos son expulsados del tracto genital (Ortiz *et al*, 1979). En cambio, en el ratón, la administración de las mismas dosis produce una retención de los embriones en el oviducto (Moscoso *et al*, 1984). En la coneja, la administración post - coital de 100 - 250 µg de ciclopentilpropionato también produce una retención de los embriones en el oviducto porque produce un cierre de la unión istmo - ampular (Greenwald, 1967).

En ratas, la administración post - coital de 5 mg de P<sub>4</sub> en el día 2 ó 3 post - ovulación (Saunders, 1958) y la administración post - coital, pre o post - ovulatoria de 50 µg/kg de LNG no tienen efecto sobre la fertilidad (Müller *et al*, 2003). Sin embargo, si se administra 50 µg/kg en la mañana y en la tarde del diestro y del proestro (2 y 1 días antes de la ovulación, respectivamente) se suprime la ovulación. En la rata y en el ratón, la administración post - coital de mifepristona disminuye la tasa de fertilidad. En ratas el efecto se asocia al transporte acelerado de embriones por el oviducto, al retraso del desarrollo de la mórula, a la pérdida uterina de embriones y a la baja receptividad endometrial. En ratones, se produce retención de embriones en el oviducto, aceleración y expulsión de otros embriones y bajo desarrollo embrionario (Psychoyos y Prapas, 1987).

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General.**

Establecer si la mona *Cebus apella* es un modelo animal que responda a la acción de drogas que se puedan utilizar como anticonceptivos de emergencia.

### **2. Objetivos Específicos.**

- Determinar si la administración de una dosis de 0,75 mg de LNG vía subcutánea disminuye la fertilidad, expresada como tasa de preñez, cuando se administra dentro de las 24 horas posteriores a la cópula.
  
- Determinar si la misma dosis administrada vía oral y dentro de las 24 horas post - coito, disminuye la fertilidad.
  
- Si los resultados de la administración de estas dosis no disminuyen la fertilidad, se repetirán los protocolos, administrando dos dosis de 0,75 mg de LNG, separadas por 12 horas, dentro de las primeras 24 horas post - coito.

## MATERIAL Y MÉTODO

### 1. Animales.

Se utilizaron 12 hembras y 8 machos adultos (Figura 9) de fertilidad probada de la colonia de *Cebus apella* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las hembras tenían entre 7 y 17 años, no tenían historial de cirugías pélvico - abdominales, estaban ciclando regularmente y sus ciclos menstruales habían sido previamente definidos como normales por su duración (17 a 22 días) y secuencia de las fases de acuerdo a la citología vaginal (Ortiz, A., 2000; Ortiz, R., 2000). Los machos tenían entre 14 y 25 años. En esta colonia, los animales son mantenidos en jaulas individuales con alimentación completa y balanceada, agua *ad libitum* y condiciones ambientales controladas de temperatura (24° a 27° C), humedad relativa (70 %) y ciclo de luz - oscuridad de 14 y 10 horas, respectivamente.

**Figura 9. Macho y hembra *Cebus apella* del Bioterio de Primates de la PUC.**



**Macho**



**Hembra**

## 2. Diseño para determinar el efecto post - coital de LNG sobre la fertilidad.

Al ingresar al estudio, las 12 hembras fueron monitoreadas mediante citología vaginal para determinar el día 1 del ciclo por la aparición de eritrocitos en el frotis. Ese mismo día se hizo una evaluación clínica inicial, para lo cual se tomó una muestra de sangre para medir el hematocrito y se evaluó ecográficamente el estado de los ovarios y del útero. A partir de ese día el seguimiento de los ciclos se hizo con frotis vaginales, ecografías y muestras de sangre tomadas en determinados días del ciclo. Cada animal contribuyó con 4 ciclos, 2 de estos ciclos fueron tratados con LNG (ciclos tratados) y 2 con vehículo (ciclos control) de acuerdo a una distribución al azar. De este modo se completó un total de 24 ciclos tratados y 24 ciclos controles. El LNG en los ciclos tratados y el vehículo en los ciclos controles, fueron administrados una o dos veces, vía s.c. o p.o. (Tabla 1).

**Tabla 1. Distribución de los ciclos tratados y controles en 12 hembras.**

N° asignado	N° de la ♀	Secuencia de tratamiento post - coital en 4 ciclos			
		0,75mg sc	0,75mg po	0,75mgx2 sc	0,75mgx2po
1	120	V	LNG	LNG	V
2	46	LNG	LNG	V	V
3	174	V	LNG	LNG	V
4	124	LNG	V	LNG	V
5	109	LNG	LNG	V	V
6	140	V	V	LNG	LNG
7	68	V	LNG	V	LNG
8	170	LNG	V	V	LNG
9	8	V	V	LNG	LNG
10	233	LNG	V	V	LNG
11	111	LNG	V	LNG	V
12	49	V	LNG	V	LNG
<b>Total de hembras tratadas</b>		<b>V: 6 LNG : 6</b>	<b>V: 6 LNG : 6</b>	<b>V: 6 LNG : 6</b>	<b>V: 6 LNG : 6</b>

V: Ciclo tratado con vehículo (controles); LNG: Ciclo tratado con levonorgestrel (tratados).

En todos los casos, la administración de LNG o de vehículo se hizo dentro de las primeras 24 horas después de la cópula.

### **3. Seguimiento del ciclo.**

Para reconocer el período oportuno para el apareamiento (período periovulatorio) y determinar su duración, se hicieron frotis vaginales diariamente durante la fase folicular. Durante la fase lútea los frotis se obtuvieron cada dos o tres días y diariamente a partir del día 7 u 8 para detectar la próxima menstruación o la continuación de la fase lútea en caso de gestación.

Los exámenes ecográficos se hicieron el primer día del ciclo para evaluar clínicamente los ovarios y el útero, al comienzo del período periovulatorio para determinar la presencia y tamaño del folículo en desarrollo antes del apareamiento, después de la cópula y diariamente hasta el comienzo de la fase lútea para estimar la relación temporal entre cópula y ovulación. Además, se hicieron exámenes ecográficos los días 12 y 15 de la fase lútea, para diagnosticar gestación y determinar el tamaño del saco gestacional (Figura 10).

Las hembras que no menstruaron el día 12 y 15 de la fase lútea, fueron examinadas ecográficamente para confirmar o descartar la gestación por la presencia del saco gestacional. Después de confirmar la presencia y expansión del saco gestacional el día 15, la gestación se interrumpió administrando 30 mg s.c. de una antiprogestina (mifepristona). La interrupción de la gestación se reconoció por la aparición del sangrado en el frotis vaginal y por la ausencia del saco gestacional en el examen ecográfico. Cuando no se confirmó el sangrado endometrial al día siguiente, se repitió la dosis de antiprogestina. Estas hembras fueron reincorporadas al estudio después de un ciclo de descanso.

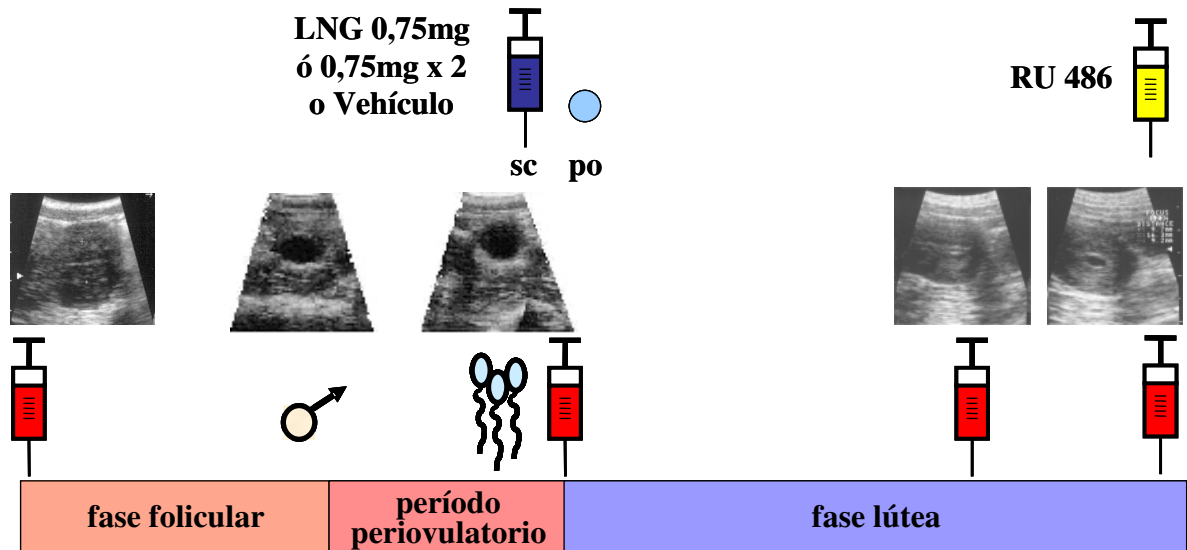
Las muestras de sangre se obtuvieron el primer día del ciclo, al comienzo de la fase lútea, en los días 12 y 15 de la fase lútea y después de la interrupción de la gestación, para determinar las concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> por RIA. También se determinó el microhematocrito en el primer día del ciclo, en los días 12 y 15 de la fase lútea y después de verificar el sangrado y pérdida del saco gestacional en los animales en que se interumpió la gestación (Tabla 2 y Figura 10).

**Tabla 2. Cronología y propósito de la obtención de muestras de sangre a lo largo de los ciclos tratados y controles.**

	Días del ciclo				
	M1	L1	L12	L15	M1PA
<b>Propósito de la muestra</b>					
Determinación de E <sub>2</sub> y P <sub>4</sub>	X	X	X	X	X
Microhematocrito	X	-	X	X	X

M1: día 1 del ciclo; L1, L12, L15: días 1, 12 y 15 de la fase lútea; M1PA: día 1 post - aborto.

**Figura 10. Procedimientos para determinar el efecto del LNG sobre la fertilidad en la mona *Cebus apella*.**



#### Fases del ciclo

= Obtención de muestras de sangre; = Comienzo del apareamiento; = espermatozoides en el frotis vaginal

#### 4. Tratamiento.

En el primer ciclo, seis monas fueron tratadas con una dosis de LNG y otras seis con una dosis de vehículo vía s.c.. El tratamiento con LNG consistió en la administración de 0,75 mg de LNG s.c. obtenido de los implantes de Norplant® (Leiras, Turku, Finlandia), disuelto en 75 µL de benzilbenzoato y aceite de maíz, hasta un volumen final de 0,5 mL. El tratamiento con vehículo consistió en la administración de 0,5 mL de una mezcla de benzilbenzoato diluido en aceite de maíz. En el segundo ciclo el tratamiento se administró p.o.. Para administrar el LNG, se disolvió un comprimido de Postinor® - 2 (Gedeon Richterl, Budapest, Hungría), que contiene 0,75 mg de LNG, en 5 mL de leche con cereales. Los animales controles recibieron 5 mL de leche con cereales.



En el tercer ciclo se administraron dos dosis, separadas por 12 horas, de 0,75 mg de LNG y dos dosis de vehículo, ambas vía s.c.. En el cuarto ciclo se administraron dos dosis, separadas por 12 horas, de 0,75 mg de LNG o dos dosis de vehículo, ambas p.o..

Las hembras que no se preñaron fueron apareadas en el ciclo subsiguiente. Durante el ciclo post - tratamiento se tomaron frotis vaginales para reconocer el primer día (menstruación) del ciclo de reincorporación al estudio.

Las hembras que no copularon, fueron retiradas de la jaula del macho al final del período periovulatorio y fueron reincorporadas al estudio al ciclo siguiente.

## **5. Procedimientos y técnicas.**

### **5.1 Frotis vaginales.**

Los frotis vaginales se obtuvieron mediante un procedimiento descrito con anterioridad (Ortiz, A., 2000). Brevemente: para tomar los frotis vaginales los animales son atraídos contra la parte delantera de la jaula, mediante un fondo falso que se puede desplazar a voluntad. Cuando el animal ha adoptado una posición adecuada, se le introduce en la vagina una tórula humedecida con suero fisiológico. La muestra obtenida se extiende sobre un portaobjetos previamente rotulado con el número del animal y fecha (Figura 11). Los extendidos se tiñeron con el método de Papanicolau (Bales y Durfee, 1979). Para definir las fases del ciclo se consideró la presencia de eritrocitos, células eosinofílicas, mucus o leucocitos (Nagle y Denari, 1983).

**Figura 11. Obtención de frotis vaginales.**



## **5.2 Apareamiento.**

Para el apareamiento, cada hembra fue anestesiada con ketamina (Ketostop®, Drag Pharma Invetec, Santiago, Chile) en dosis de 10 mg/kg más atropina (Atropina sulfato Reg. ISP F - 1221 - 98, Laboratorio Sanderson S.A., Santiago, Chile) en dosis de 0,04 mg/kg, vía intramuscular (i.m.) y posteriormente trasladada a la jaula de un macho afín con ella durante el período periovulatorio. Los animales permanecieron en la misma jaula hasta que se verificó la cópula por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal o hasta el final del período periovulatorio. Después del apareamiento, las hembras fueron trasladadas a su jaula.

## **5.3 Exámenes ecográficos.**

Los exámenes ecográficos se realizaron manteniendo a las hembras anestesiadas con ketamina (10 mg/kg) más atropina (0,04 mg/kg) i.m. y colocadas en decúbito dorsal sobre el mesón de exámenes (Figura 12). Los exámenes se hicieron vía transabdominal, utilizando un ecógrafo, en modo B de tiempo real, con un transductor electrónico convexo de 7,5 Mhz. Las imágenes obtenidas se imprimieron en una impresora de video. Las mediciones se realizaron colocando el transductor sobre la línea media del abdomen bajo. Para la ubicación de los ovarios se tomó como referencia el corte transversal del útero (Ortiz R, 2000).

Una vez ubicado el útero se desplazó el transductor a ambos lados del órgano, lo que permitió la observación de los ovarios en un plano transversal. Se midieron los folículos mayores de 2,5 mm y los cuerpos lúteos. El tamaño del folículo dominante se determinó calculando el promedio de dos mediciones de diámetros perpendiculares entre sí. En las hembras preñadas, el tamaño del saco gestacional se determinó calculando el promedio de los diámetros céfalocaudal y ventrodorsal (Corradini *et al*, 1998).

**Figura 12. Exámen ultrasonográfico de los ovarios y del útero en una mona *Cebus apella*.**



#### **5.4 Toma de muestra de sangre.**

Las muestras de sangre se tomaron manteniendo a la hembra anestesiada con ketamina - atropina. Se extrajo 1 mL de sangre desde la vena safena, con jeringa heparinizada (Figura 13). Estas muestras fueron centrifugadas a 1700 g por 5 minutos, para separar el plasma, que posteriormente fue congelado a  $-18^{\circ}$  C, hasta el momento en que se realizaron las determinaciones de  $E_2$  y  $P_4$  por RIA.

**Figura 13. Obtención de muestras de sangre.**



Las concentraciones plasmáticas de  $E_2$  y  $P_4$  se determinaron por RIA utilizando reactivos proporcionados por la OMS y un método previamente validado para RIA de esteroides de *Cebus apella* (Recabarren et al, 1998). Las mediciones fueron hechas en duplicado de alícuotas reconstituidas de extractos con éter. Los límites de sensibilidad para  $E_2$  y  $P_4$  fueron 190 pmol/L y 29 nmol/L, respectivamente. Los coeficientes de variación inter e intra ensayos fueron 11 % y 7 % para  $E_2$  y 15 % y 5 % para  $P_4$ .

Los microhematocritos se determinaron de acuerdo al método descrito por Schalm (1965).

## **6. Biodisponibilidad del LNG.**

Para determinar la biodisponibilidad del LNG después de administrar 0,75 mg s.c. o p.o. se midió el LNG por RIA, en muestras de sangre obtenidas a distintos tiempos después del tratamiento. Para esto se utilizaron tres hembras, una de ellas contribuyó con dos ciclos. En el primer ciclo, el LNG fue administrado s.c. y después de dos ciclos de descanso, el LNG se administró p.o.. Las otras dos hembras fueron utilizadas en un ciclo. En una de ellas el LNG se administró p.o. y en la otra se administró s.c..

Las concentraciones de LNG se determinaron en muestras de sangre que se tomaron antes de administrar el LNG y posteriormente a las 2, 4, 24, 48 y 72 horas. A los animales tratados s.c. se les tomó una muestra de sangre adicional a las 96 horas después del tratamiento. El LNG plasmático se determinó utilizando los reactivos adquiridos en Immunometrics (UK) Ltda. y el procedimiento descrito por el fabricante en el protocolo de noviembre 2001.

La precisión del ensayo se evaluó determinando los coeficientes de variación intra e inter ensayo en el rango óptimo del ensayo. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 5,4 y 14 %, respectivamente. El límite de sensibilidad del ensayo fue 2,3 nmol/L.

## **7. Análisis de resultados.**

Los datos se analizaron con el test de “t” de Student. Se conformaron grupos estadísticamente comparables, con igual número de ciclos tratados y controles y según la dosis y la vía de administración s.c o p.o. de LNG. Para ésto, se construyó una tabla de distribución al azar que indicó el tratamiento (LNG o Vehículo) para cada ocasión, dependiendo de la vía de administración y del ritmo horario utilizado. En cada hembra, en sus diferentes tratamientos, se analizaron las siguientes variables:

- a) Duración de la fase folicular y del período periovulatorio, duración de la fase lútea y duración total del ciclo de las hembras no preñadas. Las comparaciones de la duración de la fase lútea y del ciclo completo en ciclos tratados v/s controles se realizaron sólo en hembras no gestantes debido a que sólo ellas presentaron la longitud del ciclo sin alteraciones provocadas por la gestación ni por la interrupción de la misma, como se hizo en las hembras gestantes.
- b) Tamaño del folículo dominante al inicio del apareamiento, en el día del tratamiento y durante los días que siguieron al tratamiento cuando éste se administró antes de la ovulación.
- c) Estimación de la relación temporal entre cópula y ovulación.
- d) Tamaño del saco gestacional.

- e) Concentración plasmática de  $E_2$  y  $P_4$  en el día 1 del ciclo (M1), en los días 1, 12 y 15 de la fase lútea (L1, L12 y L15) y en el primer día de sangrado post-aborto (M1 PA).
- f) Microhematocrito.
- g) Duración del sangrado endometrial consecuente a la menstruación y a la interrupción de la gestación.

Además, se comparó la tasa de preñez entre hembras tratadas y controles mediante chi cuadrado. En todas las comparaciones se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue  $\leq 0,05$ . Todos los resultados fueron expresados como  $X \pm DE$ .

## **RESULTADOS**

### **1. Evaluación clínica inicial.**

Las características clínicas consideradas en la evaluación inicial previa a la administración del tratamiento con LNG o con vehículo no mostraron diferencias entre ambos grupos de animales. Los valores de los microhematocritos en las hembras tratadas fueron  $41,0 \pm 3,6 \%$  y en las hembras controles  $41,7 \pm 2,6 \%$ ; el diámetro de los ovarios en las hembras tratadas fue  $11,9 \pm 0,8$  mm y en las hembras controles  $11,8 \pm 0,9$  mm; el grosor endometrial en las hembras tratadas fue  $7,7 \pm 0,6$  mm y en las hembras controles  $7,7 \pm 0,7$  mm y las concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> en las hembras tratadas fueron  $560,6 \pm 193,4$  pmol/L y en las controles  $603,7 \pm 219,3$  pmol/L, así como las concentraciones plasmáticas de P<sub>4</sub> en las hembras tratadas fueron  $46,0 \pm 69,6$  nmol/L y en las controles  $33,5 \pm 11,1$  nmol/L.

### **2. Efecto post - coital del LNG sobre la fertilidad.**

En los 24 ciclos tratados se registraron 13 hembras preñadas y el mismo número se registró en los 24 ciclos controles. Esta proporción de hembras preñadas se traduce en una tasa de fertilidad de  $54,2 \%$  en cada grupo (Tabla 3).

**Tabla 3. Distribución de las gestaciones en los ciclos tratados con LNG y en los controles (vehículo) en 12 hembras *Cebus apella*.**

N° asignado	N° de la ♀	Secuencia de tratamiento post - coital en 4 ciclos			
		0,75mg sc	0,75mg po	0,75mgx2 sc	0,75mgx2 po
1	120	V	LNG	LNG	V
2	46	LNG	LNG	V	V
3	174	V	LNG	LNG	V
4	124	LNG	V	LNG	V
5	109	LNG	LNG	V	V
6	140	V	V	LNG	LNG
7	68	V	LNG	V	LNG
8	170	LNG	V	V	LNG
9	8	V	V	LNG	LNG
10	233	LNG	V	V	LNG
11	111	LNG	V	LNG	V
12	49	V	LNG	V	LNG
<b>Total de hembras preñadas</b>		V : 4/6 LNG : 3/6	V : 4/6 LNG : 4/6	V : 3/6 LNG : 3/6	V : 2/6 LNG : 3/6

LNG, V: Tratadas con LNG o vehículo no preñadas.

LNG, V: Tratadas con LNG o vehículo preñadas.

En la secuencia de tratamiento post - cópula de los 4 ciclos con diferente vía de administración y dosis de LNG o vehículo, no hubo diferencias significativas, por lo tanto, se agruparon los datos sólo como tratadas y controles.

### 3. Duración y secuencia de las fases del ciclo menstrual según la citología vaginal.

De acuerdo a la citología vaginal, los 48 ciclos estudiados presentaron una duración y secuencia normal de menstruación, fase folicular, período periovulatorio y fase lútea. La duración del ciclo y de cada una de las fases de hembras tratadas fue semejante a la de hembras controles (Tabla 4).



**Tabla 4. Duración del ciclo y de sus fases en las hembras tratadas y controles, no gestantes y gestantes.**

FASES DEL CICLO	Estado Fisiológico	LNG	VEHÍCULO	p
		Días (X ± DE)(n)	Días (X ± DE)(n)	
Fase Folicular *	NG	7,5 ± 1,0 (11)	7,8 ± 1,3 (11)	ns
	G	7,3 ± 0,9 (13)	7,9 ± 0,7 (13)	ns
Menstruación	NG	2,8 ± 0,8 (10)	3,0 ± 0,8 (13)	ns
	G	3,1 ± 0,9 (13)	3,1 ± 0,7 (11)	ns
Período Periovulatorio	NG	4,0 ± 1,1 (11)	4,2 ± 1,6 (11)	ns
	G	3,8 ± 0,9 (13)	4,4 ± 0,9 (13)	ns
Fase Lútea	NG	12,0 ± 2,2 (11)	12,5 ± 1,6 (11)	ns
Ciclo Completo	NG	19,0 ± 2,8 (11)	20,4 ± 1,4 (11)	ns

\* Incluye menstruación y período periovulatorio; NG: No Gestantes; G: Gestantes; ns: no significativo ( $p > 0,05$ ).

#### **4. Tamaño del folículo dominante y relación temporal entre cópula y ovulación.**

El tamaño del folículo dominante al inicio del apareamiento en las hembras tratadas ( $6,0 \pm 1,0$  mm), fue semejante al de hembras controles ( $5,8 \pm 1,0$  mm) ( $p > 0,05$ ). En 41 de 48 ciclos, la cópula ocurrió en un período de tres días al final del período periovulatorio (dos días antes de la ovulación y el mismo día de la ovulación) y en los 7 restantes, la cópula precedió a la ovulación entre 3 y 5 días. En 39 de 48 ciclos (18 tratados y 21 controles), el tratamiento se administró en distintos días antes de la ovulación dependiendo del día de la cópula (Tabla 5). En estos casos el tamaño del folículo preovulatorio en el día del tratamiento fue de  $6,9 \pm 1,1$  mm en ambos grupos. En los 9 ciclos restantes (6 tratados y 3 controles) la cópula ocurrió el día de la ovulación. Por lo tanto, en esos ciclos el tratamiento fue post - ovulatorio.

En los 6 ciclos tratados, el tamaño del cuerpo lúteo inicial (folículo post - ovulatorio) fue  $5,8 \pm 0,8$  mm y en los 3 ciclos controles fue  $6,1 \pm 1,2$  mm (Tabla 6).

**Tabla 5. Número de cópulas y gestaciones registradas en diferentes días relativos a la ovulación.**

Días de la cópula relativos a la ovulación	Número de cópulas (Cópulas acumuladas)	Número de gestaciones / Total de cópulas	
		LNG %	VEHÍCULO %
0	9 (9)	5/6 (83,3)	2/3 (66,6)
-1	18 (27)	5/10 (50,0)	5/8 (62,5)
-2	14 (41)	3/6 (50,0)	4/8 (50,0)
-3	6 (47)	0/2 (00,0)	2/4 (50,0)
-4	0 (47)	-	-
-5	1 (48)	-	0/1 (00,0)
<b>TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>13/24 (54,2)</b>	<b>13/24 (54,2)</b>

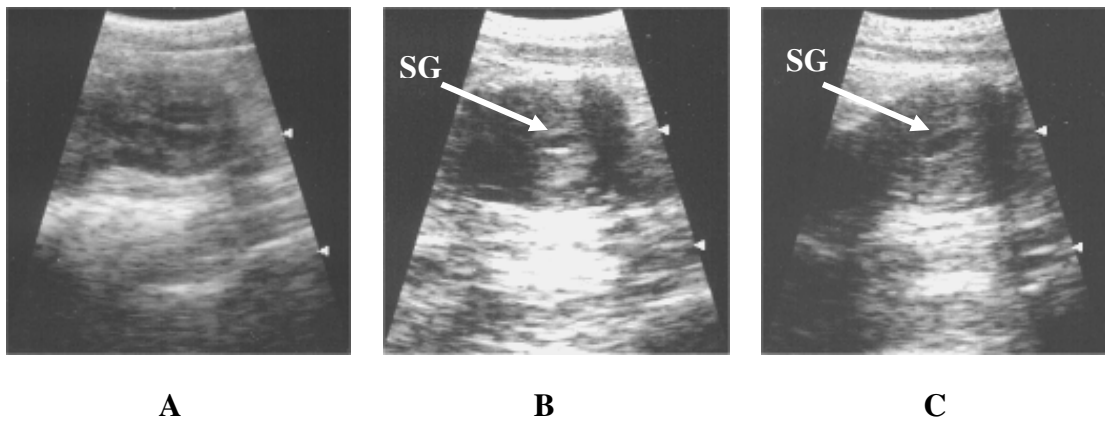
**Tabla 6. Tamaño del folículo dominante en el día del tratamiento en hembras tratadas y controles.**

Período relativo a la ovulación	LNG mm (X ± DE) (n)	VEHÍCULO mm (X ± DE) (n)	P
Pre - ovulatorio	$6,9 \pm 1,1$ (18)	$6,9 \pm 1,1$ (21)	ns
Post - ovulatorio	$5,8 \pm 0,8$ (6)	$6,1 \pm 1,2$ (3)	ns

## 5. Evaluación del saco gestacional.

En la imagen ultrasonográfica del útero en el día 12 de la fase lútea de hembras no gestantes, se observó el endometrio y miometrio (Figura 14 A). El mismo día, en las hembras gestantes se observó el saco gestacional (Figura 14 B). El tamaño y la imagen ultrasonográfica del saco gestacional en hembras tratadas y controles fueron semejantes en los mismos tiempos de gestación. En el día 12 el tamaño fue  $2,7 \pm 0,6$  mm en las tratadas y  $2,4 \pm 0,2$  mm en las controles ( $p > 0,05$ ). En el día 15 el diámetro del saco gestacional fue  $3,8 \pm 0,8$  mm en las tratadas y  $4,0 \pm 0,7$  mm en las controles ( $p > 0,05$ ) (Figura 14 C).

**Figura 14. Imágenes ultrasonográficas del útero de la mona *Cebus apella*.**

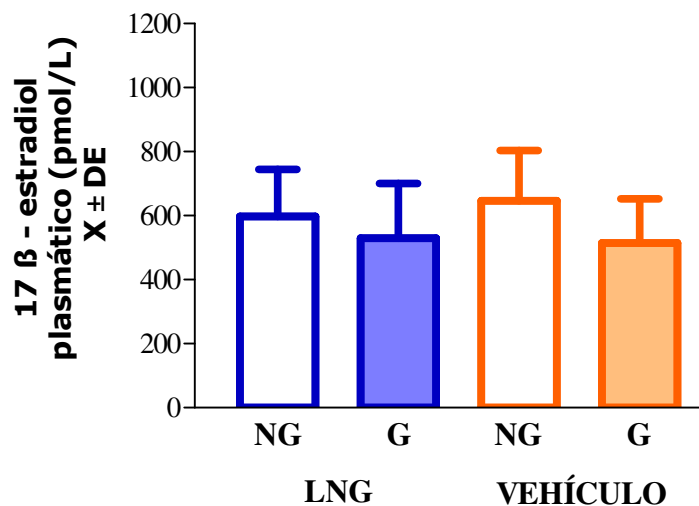


A: Hembra no gestante; B: Hembra gestante en día 12 de la fase lútea; C: Hembra gestante en día 15 de la fase lútea. SG: Saco gestacional.

## 6. Concentraciones plasmáticas de esteroides ováricos.

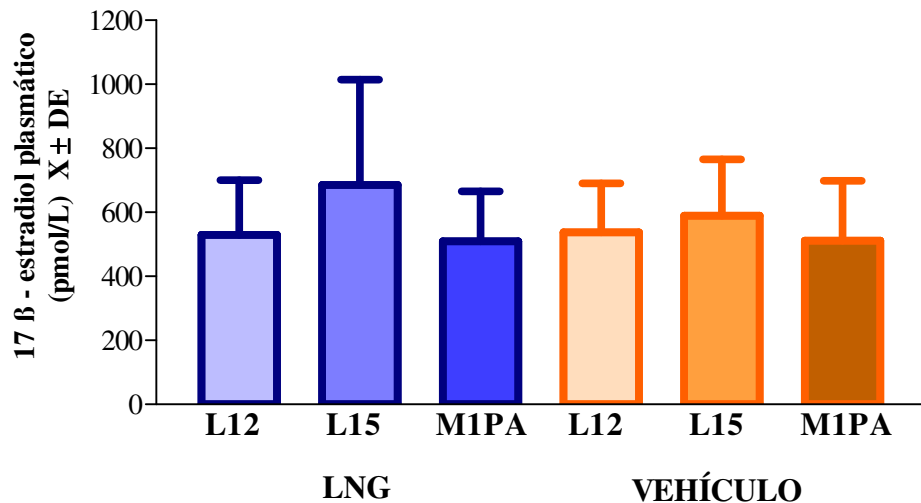
En el día 12 de la fase lútea, las concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> fueron semejantes en todas las hembras, independiente del tratamiento y de la presencia o ausencia de gestación. (Figura 15). Tampoco se observaron diferencias entre tratadas y controles preñadas, en el día 15 de la fase lútea y en el primer día post - aborto ( $p > 0,05$ ) (Figura 16).

**Figura 15. Concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> en el día 12 de la fase lútea en hembras tratadas y controles no gestantes y gestantes.**



NG: no gestantes; G: gestantes.

**Figura 16. Concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> en distintos momentos de la fase lútea en hembras gestantes tratadas y controles.**

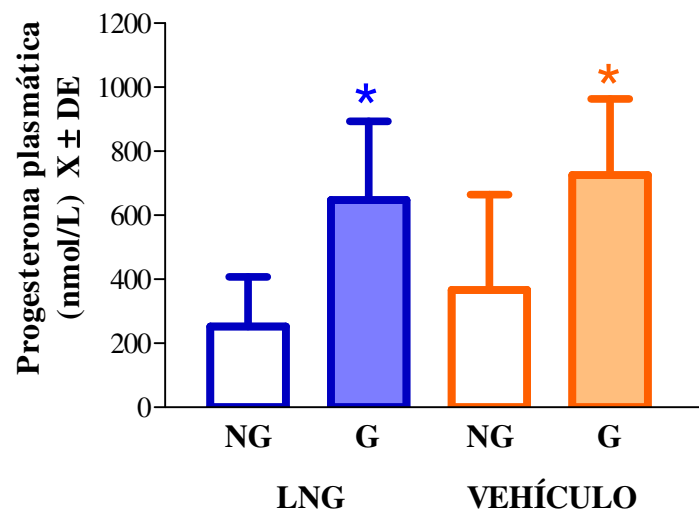


L12 y L15: días 12 y 15 de la fase lútea; M1PA: primer día del ciclo posterior al aborto inducido.

En el día 12 de la fase lútea, la concentración plasmática de P<sub>4</sub> de hembras gestantes tratadas y controles fue mayor que la de las no gestantes. Ese mismo día, no hubo diferencia entre hembras tratadas y controles preñadas ( $p > 0,05$ ), ni entre tratadas y controles no gestantes ( $p > 0,05$ ) (Figura 17).

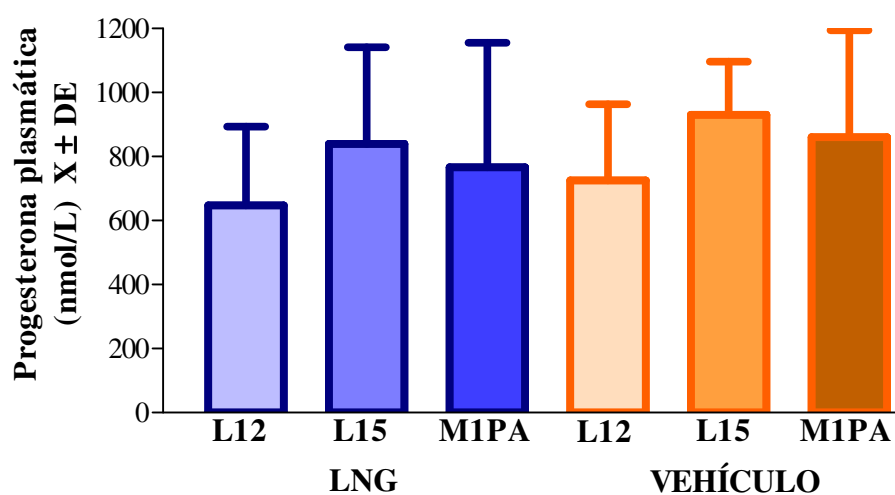
Tampoco hubo diferencia en las concentraciones plasmáticas de P<sub>4</sub> entre hembras tratadas y controles preñadas, en el día 15 de la fase lútea y en el día posterior al aborto inducido ( $p > 0,05$ ) (Figura 18).

**Figura 17. Concentraciones plasmáticas de P<sub>4</sub> en el día 12 de la fase lútea en hembras tratadas y controles no gestantes y gestantes.**



NG: no gestantes; G: gestantes. \*  $p < 0,0029$  y \*  $p < 0,0101$  en relación a las hembras no gestantes del grupo respectivo.

**Figura 18. Concentraciones plasmáticas de P<sub>4</sub> en distintos momentos de la fase lútea en hembras gestantes tratadas y controles.**



L12 y L15: días 12 y 15 de la fase lútea; M1PA: primer día del ciclo posterior al aborto inducido.

## 7. Duración del sangrado endometrial consecuente con la menstruación y con la interrupción de la gestación.

El tiempo del sangrado posterior al aborto inducido con RU 486, se prolongó aproximadamente en 1 día respecto del tiempo de sangrado propio de la menstruación, en ambos grupos (Tabla 7), pero no hubo diferencias en el tiempo de sangrado post - aborto entre hembras tratadas y controles.

**Tabla 7. Duración de la menstruación en los ciclos gestantes y del sangrado que se produce después de la interrupción de la gestación en los mismos ciclos.**

Tipo de sangrado	Duración (días) X ± DE (rango) (n)		p
	LNG	VEHÍCULO	
Menstruación	3,2 ± 0,8 (2 - 4) (13)	2,9 ± 0,7 (2 - 4) (13)	ns
Sangrado post - aborto	4,4 ± 0,8 (3 - 6) (11)	4,3 ± 0,7 (3 - 5) (11)	ns
<b>p</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0001</b>	

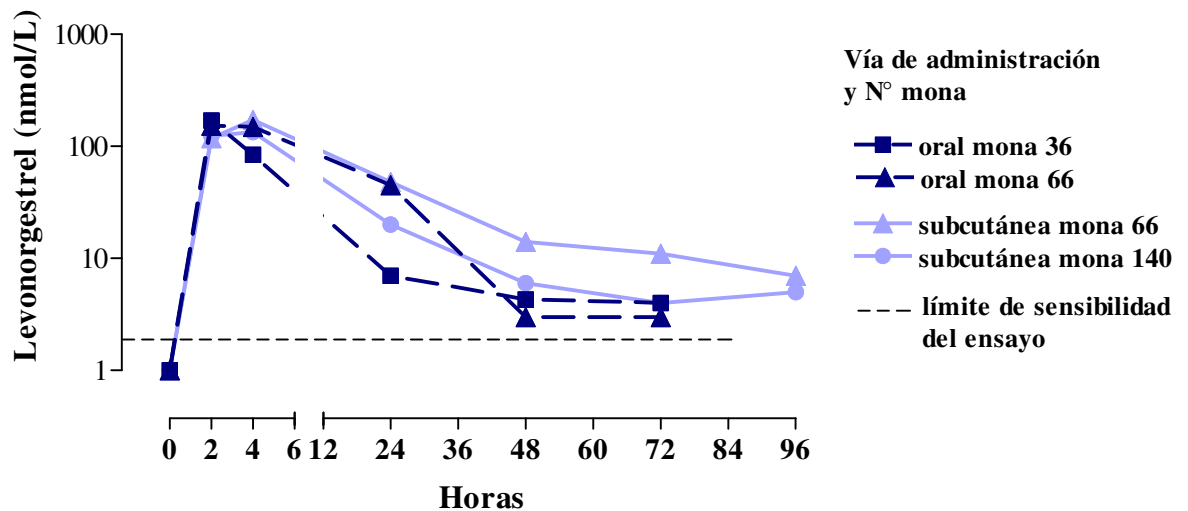
## 8. Microhematocrito.

Los valores de microhematocrito obtenidos en diferentes días del ciclo y en distintas condiciones fisiológicas fluctuaron entre 39,9 ± 4,9 % (X ± DE) en el día 1 del ciclo de hembras no gestantes y 42,4 ± 2,0 % (X ± DE) en el día 12 de la fase lútea de hembras gestantes. No hubo diferencia entre hembras tratadas y controles (p > 0,05).

## 9. Biodisponibilidad del LNG.

La máxima concentración plasmática de LNG fue cercana a los 170 nmol/L y se alcanzó a las 2 horas después de la administración vía oral y a las 4 horas después de la administración subcutánea. Posteriormente, se produjo un descenso marcado en la concentración plasmática hasta las 48 horas, para continuar descendiendo lentamente hasta las 96 horas (Figura 19).

**Figura 19.** Concentraciones plasmáticas de LNG en la mona *Cebus apella*, a distintos tiempos después de administrar 0,75 mg vía oral o subcutánea.





## DISCUSIÓN

Este estudio muestra que en la mona *Cebus apella*, la administración post - coital de LNG, en el período preovulatorio inmediato o en el día de la ovulación, no interfiere con la probabilidad de gestación. Tampoco modifica la duración de las fases del ciclo menstrual, la relación temporal entre tratamiento y ovulación, la concentración plasmática de esteroides ováricos, el sangrado endometrial consecuente a la interrupción de la gestación ni los valores del hematocrito.

La tasa de fertilidad (54,2 %) de los ciclos tratados no sólo fue idéntica a la de los controles sino, además, fue semejante a la tasa histórica (48 - 50 %) de la colonia de *Cebus apella* de la Pontificia Universidad Católica (Dra. Alejandra Ortiz, comunicación personal). Por lo tanto, en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, la administración post - coital de LNG no interfiere con los procesos posteriores a la fecundación, que el embrión requiere para la implantación. Esta falta de efectividad resulta diferente al 75 % de efectividad del LNG para prevenir el embarazo cuando se administra como anticonceptivo de emergencia en la mujer (Ho y Kwan, 1993; WHO, 1998).

La absoluta ineficacia del LNG para prevenir la gestación en la mona *Cebus apella* no debería ser atribuida a una dosis insuficiente, ya que la dosis administrada por kg de peso fue 10 - 20 veces mayor que la que se utiliza como anticonceptivo de emergencia en la mujer y las concentraciones plasmáticas alcanzaron niveles 6 veces más altos que los reportados en la mujer (Johansson *et al*, 2002), manteniéndose en niveles superiores a la concentración mínima detectable por el ensayo durante más de 72 horas. Por lo tanto, estuvo biodisponible en cantidad y tiempo suficientes para ejercer algún efecto.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en la rata por Müller *et al* (2003), quienes demostraron que la administración post - coital de 50 µg/kg de LNG no interfiere con la fertilidad. Sin embargo, las mismas dosis fueron capaces de interferir con el proceso ovulatorio cuando el LNG se administra en la fase folicular temprana.

Resultados semejantes han sido reportados en la mujer por Durand *et al* (2001) y por Brache *et al* (2003), quienes observaron que la administración post - coital de LNG en la fase folicular temprana inhibe o posterga la ovulación, lo que puede interferir con la fertilidad en la mujer. Por otra parte, resultados preliminares de otro estudio realizado en las mismas monas, muestran que la administración subcutánea de dos dosis 0,75 mg de LNG inhibe o retarda la ovulación cuando se administra en la fase folicular temprana (Ortiz *et al*, 2003). Este conjunto de resultados sugiere que en la mona *Cebus apella*, el LNG no es capaz de interferir con la gestación si el tratamiento post - coital se administra cuando la ovulación ya ocurrió o en un momento del desarrollo folicular cuando el LNG no puede inhibir o retrasar la ovulación.

Una diferencia importante entre la mujer y la mona, que puede explicar la diferente eficacia para prevenir el embarazo radica en el hecho que la mujer puede tener relaciones sexuales en cualquier momento de su ciclo y por eso normalmente no sabe en qué día respecto de la ovulación recibe el tratamiento. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio muestran que las monas copulan en el día de la ovulación o cuando la ovulación es inminente.

El conjunto de resultados descritos anteriormente apoya la hipótesis de que la administración de LNG puede evitar la gestación solamente cuando el tratamiento interfiere con la ovulación.

La falta de efectividad del LNG para interferir con la gestación en la mona también concuerda con los resultados de Durand *et al* (2001) y Marions *et al* (2002), quienes observaron que la administración de LNG durante la fase folicular tardía no afecta la estructura ni la expresión de moléculas que se asocian a la receptividad del endometrio en la mujer.

La expansión del saco gestacional observada entre el día 12 y el día 15 de la fase lútea y la mantención de los niveles de P<sub>4</sub> indican que al menos hasta el día 15 el LNG no interfiere con las etapas tempranas de la gestación.

Estos mismos resultados sugieren que en las hembras tratadas al igual que en las controles, la gestación habría seguido un desarrollo normal.

Por otra parte, la duración de la fase lútea y los niveles de P<sub>4</sub> semejantes en tratadas y controles no preñadas, señalan que el LNG administrado en la fase folicular tardía, no tiene efecto luteolítico.

El mayor sangrado post - aborto, que fue semejante en las hembras tratadas y controles, no perjudicó la fertilidad de los ciclos posteriores y tampoco influyó en el hematocrito.

La similitud de las concentraciones plasmáticas de LNG obtenidas a distintos tiempos después de administrarlo s.c. o p.o. muestra que la vía de administración no modificó la biodisponibilidad y por lo tanto, ésta fue semejante en ambos casos.

Para inducir aborto en estas hembras se utilizó RU 486. Esta droga se utiliza en mujeres como anticonceptivo de emergencia y como abortivo, siendo en este último caso combinado con prostaglandinas para obtener un mayor efecto. Si se administra durante la fase folicular produce disminución de la liberación de E<sub>2</sub> y de LH. Además, retrasa o inhibe la ovulación. Si se administra posterior a la ovulación inhibe el desarrollo endometrial y por lo tanto impide la implantación (Marions *et al*, 2002; Glasier, 1997).

Considerando el conjunto de los resultados, podemos especular que la eficacia del LNG como anticonceptivo de emergencia en la mujer, dependería del momento del ciclo en que sea administrado. Se postula que el LNG actúa como anticonceptivo al interferir con el proceso ovulatorio y que falla como anticonceptivo cuando la administración ocurre en un momento de fase folicular en que ya no puede interferir con la ovulación. En estos casos se producirían las fallas del método.

Dado que la mayoría de los animales domésticos copula en un período preovulatorio cercano a la ovulación, la administración de LNG como anticonceptivo post - coital, no sería recomendable para ellos.

La posibilidad de usar LNG como anticonceptivo de uso regular en implantes subdérmicos en animales domésticos, requiere de estudios sistemáticos para determinar las dosis y los efectos colaterales.

## CONCLUSIONES

En la mona *Cebus apella*, la administración post - coital de una o dos dosis de 0,75 mg de LNG vía oral o subcutánea:

- No inhibió la ovulación, lo cual es probablemente la causa de la ineficacia del tratamiento para evitar la gestación.
- No modificó el desarrollo normal de la fase lútea.
- No alteró las concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>.
- No interfirió con los procesos posteriores a la fecundación.
- No disminuyó la tasa de fertilidad.
- No es recomendable como anticonceptivo de emergencia en esta especie.

## BIBLIOGRAFÍA

- **BALES, C.E.; DURFEE, G.R.** 1979. Cytologic techniques. **In:** Koss, L.G. Diagnostic cytology and its histopathologic bases part three: techniques in diagnostic cytology. 3ª edition. JB Lippincott Company. Philadelphia, USA. 1187-1266.
- **BERTHOIS, Y.; SALAT - BAROUX, J.; CORNET, D.; DE BRUX, J.; KOPP, F.; MARTIN, P.M.** 1991. A multiparametric analysis of endometrial estrogen and progesterone receptors after post - ovulatory administration of mifepristone. Fert Ster. 55:547-554.
- **BRACHE, V.; CROXATTO, H.B.; COCHON, L.; MASSAI, R.; ALVAREZ, F.; FORCELLEDO M.L.; FAUNDES, A.; PAVEZ, M.; SALVATIERRA, A.M.** 2003. Efecto de la administración de levonorgestrel solo como anticonceptivo de emergencia (AE) sobre la función ovulatoria. XVIII Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH 2003). Revista Cubana de Salud Pública. 29:1:R.111.
- **CHANDRASEKHAR, Y.A.; MELNER, M.H.; NAGALLA, S.R.; STOUFFER, R.L.** 1994. Progesterone receptor, but not estradiol receptor messenger ribonucleic acid is expressed in luteinizing granulosa cells and the corpus luteum in rhesus monkey. Endocrinology. 135:307-314.
- **CLARKE, C.L.; SUTHERLAND, R.L.** 1990. Progestin regulation of cellular proliferation. Endocrine Review. 11:266-301.
- **COLLINS, R.L.; HODGEN, G.D.** 1986. Blockade of the spontaneous midcycle gonadotropin surge in monkeys by RU 486: a progesterone antagonist or agonist? J Clin Endocrinol Metab. 63:1270-1276.
- **CORRADINI, P.; RECABARREN, M.; SERÓN - FERRÉ, M.; PARRAGUEZ, V.H.** 1998. Study of prenatal growth in the capuchin monkey (*Cebus apella*) by ultrasound. J Med Primatol. 27:287-292.
- **CROXATTO, H.B.; SALVATIERRA, A.M.; FUENTEALBA, B.; LEIVA, L.** 1995. Follicle stimulating hormone - granulosa cell axis involving in antifolliculotropic effect of low dose mifepristone (RU 486). Hum Reprod. 10:1987-1991.
- **CROXATTO, H.B.; DEVOTO, L.; DURAND, M.; EZCURRA, E.;**

- LARREA, F.; NAGLE, C.; ORTIZ, M.E.; VANTMAN, D.; VEGA, M.; VON HERTZEN, H.** 2001. Mechanism of action of hormonal preparations used for emergency contraception: a review of the literature. *Contraception*. 63:111-121.
- **CROXATTO, H.B.; FUENTEALBA, B.; BRACHE, V.; SALVATIERRA, A.M.; ALVAREZ, F.; MASSAI, R.; COCHON, L.; FAUNDES, A.** 2002. Effects of the Yuzpe regimen given during the follicular phase, on ovarian function. *Contraception*. 65: 21-128.
  - **CROXATTO, H.B.; ORTIZ, M.E.; MÜLLER, A.** 2003. Mechanisms of action of emergency contraception. *Steroids*. 68(10-13):1095-1098.
  - **DIERSCHKE, D.J.; YAMAJI, T.; KARSCH, F.J.; WEICK, R.F.; WEISS, G.; KNOBIL, E.** 1973. Blockade by progesterone of estrogen - induced LH and FSH release in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 92:1496-1501.
  - **DIERSCHKE, D.J.; CHAFFIN, C.L.; HUTZ, R.J.** 1994. Role and site of estrogen action in follicular atresia. *Trends Endocrinol Metab*. 5:215-219.
  - **DUFFY, D.M.; HESS, D.L.; STOUFFER, R.L.** 1994. Acute administration of a 3  $\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor of rhesus monkeys at the mid - luteal phase of the menstrual cycle: evidence for possible autocrine regulation of the primate corpus luteum by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 79:1587-1594.
  - **DURAND, M.; CRAVIOTO, M.; RAYMOND, E.; DURÁN – SÁNCHEZ, O.; CRUZ – HINOJOSA, M.; CASTELL – RODRÍGUEZ, A.; SCHIAVON, R.; LARREA, F.** 2001. On the mechanism of action of short - term levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception*. 64:227-234.
  - **GEMZELL – DANIELSSON, K.; SVALANDER, P.; SWAHN, M.L.; JOHANNISSON, E.; BYGDEMAN, M.** 1994. Effects of a single post - ovulatory dose of RU 486 on endometrial maturation in the implantation phase. *Hum Reprod*. 9:2398-2404.
  - **GEMZELL – DANIELSSON, K.; SWAHN, M.L.; WESTHUND, P.; JOHANNISSON, E.; SEPPALA, M.; BYGDEMAN, M.** 1997. The effect of various doses of mifepristone on endometrial leukaemia inhibition factor expression in the midluteal phase an immunohistochemical study. *Hum Reprod*. 12:1293-1297.

- **GHOSH, D.; SENGUPTA, J.** 1993. Anti - nidatory effect of a single early post - ovulatory administration of RU 486 in the rhesus monkey. *Hum Reprod.* 8:552-558.
- **GHOSH, D.; NAYAK, N.R.; SENGUPTA, J.** 1997. Effect of follicular phase administration of mifepristone (RU 486) on blastocyst implantation in the rhesus monkey. *Contraception.* 56:117-122.
- **GLASIER, A.** 1997. Emergency post - coital contraception. *N Engl J Med.* 337(15):1058-1064.
- **GRAHAM, R.A.; APLIN, J.D.; LI, T.C.; COOKE, I.D.; SEIF, M.W.** 1991. The effects of the antiprogestrone RU 486 (mifepristone) on an endometrial secretory glycan: an immunocytochemical study. *Fert Ster.* 55:1132-1136.
- **GREB, R.R.; HEIKINHEIMO, O.; WILLIAMS, R.F.; HODGEN, G.D.; GOODMAN, A.L.** 1997. Vascular endothelial growth factor in primate endometrium is regulated by estrogen - receptor and progesterone - receptor ligands *in vivo*. *Hum Reprod.* 12:120-129.
- **GREENE, K.E.; KETTEL, L.M.; YEN, S.S.C.** 1992. Interruption of endometrial maturation without hormonal changes by an antiprogestrone during the first half of luteal phase of the menstrual cycle: a contraceptive potential. *Fert Ster.* 58:338.
- **GREENWALD, GS.** 1967. Species differences in egg transport in response to exogenous estrogen. *Anat Rec.* 157:163-172.
- **HIBBERT, M.L.; HESS, D.L.; STOUFFER, R.L.; WOLF, D.P.; ZELINSKI – WOOTEN, MB.** 1996. Midcycle administration of a progesterone synthesis inhibitor prevents ovulation in primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:1897-1901.
- **HO, P.C.; KWAN, M.S.W.** 1993. A prospective randomized comparison of levonorgestrel with the Yuzpe regimen in post - coital contraception. *Hum Reprod.* 8(3):389-392.
- **HUTCHISON, J.S.; KUBIK, C.J.; NELSON, P.B.; ZELEZNIK, A.L.** 1987. Estrogen induces premature luteal regression in rhesus monkeys during spontaneous menstrual cycles, but not in cycles driven by exogenous gonadotropin - releasing hormone. *Endocrinology.* 121:466-474.



- **HUTZ, R.J.; DIERSCHKE, D.J.; WOLF, R.C.** 1986. Markers of atresia in ovarian follicular components from rhesus monkeys treated with estradiol 17 - 36. *Biol Reprod.* 34:65-70.
- **JOHANSSON, E.; BRACHE, V.; ÁLVAREZ, F.; ALVAREZ, F.; FAÚNDEZ, A.; COCHON, L.; RANTA, S.; LOVERN, M.; KUMAR, N.** 2002. Pharmacokinetic study of different dosing regimen of levonorgestrel for emergency contraception in healthy women. *Hum Reprod.* 17(6):1472-1476.
- **KARSCH, F.J.; WEICK, R.F.; BUTLER, W.R.; DIERSCHKE, D.J.; KREY, L.C.; WEISS, G.; HOTCHKISS, J.; YAMAJI, T.; KNOBIL, E.** 1973. Induced LH surges in the rhesus monkey: strength - duration characteristics of the estrogen stimulus. *Endocrinology.* 92:1740-1747.
- **KESSERU, E.; GARMENDIA, F.; WESTPHAL, N.; PARADA, J.** 1974. The hormonal and peripheral effects of DL - norgestrel in post - coital contraception. *Contraception.* 10:411-424.
- **KINZEY, W.** 1989. *New World Primates: ecology, evolution, and behavior.* Aldine De Gruyter. New York, USA.
- **LAHTEENMAKI, P.; HEIKINHEIMO, O.; CROXATTO, H.; SPITZ, I.; SHOUBE, D.; BIRGERSON, L.** 1987. Pharmacokinetics and metabolism of RU 486. *J Steroid Bioch.* 27:859-863.
- **MARIONS, L.; GEMZELL – DANIELSSON, K.; SUN, X.; HULTENBY, K.; LINDELL, I.; STABY, B.; BYGDAMAN, M.** 2002. Emergency contraception with levonorgestrel and mifepristone: mechanism of action. *Obstet Gynecol.* 100:65-71.
- **MITTERMEIER, R.; COIMBRA – FILHO, A.F.** 1983. Distribution and conservation of new world primate species used in biomedical research: reproduction in new world primates, new models in medical sciences. JP Hearn. MTP Press Limited International Medical Publishers. Lancaster – Boston, USA. The Hague. 1:1-37.
- **MORRIS, J.Mc.L.** 1973. Mechanism involved in progesterone contraception and estrogen interception. *Am J Obstet Gynecol.* 117:167-176.

- **MOSCOSO, H.; ELLIES, J.; VERA, R.; CROXATTO, H.B.** 1984. Varying response of ovum transport in mice related to dose and time of administration of oestradiol. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.* 34:253-261.
- **MÜLLER, A.L.; LLADOS, C.M.; CROXATTO, H.B.** 2003. Post - coital treatment with levonorgestrel does not disrupt post - fertilization events in the rat. *Contraception.* 67:415-419.
- **NAGLE, C.A.; RIARTE, A.; QUIROGA, S.; AZORERO, R.M.; CARRIL, M.; DENARI, J.H.; ROSNER, J.M.** 1980. Temporal relationship between ovulation and ovarian hormonal profile in the Capuchin monkey (*Cebus apella*). *Biol Reprod.* 23:629-635.
- **NAGLE, C.A.; DENARI, J.H.** 1983. The Cebus Monkey (*Cebus apella*): Reproduction in new world primates, new models in medical sciences. JP Hearn. MTP Press Limited International Medical Publishers. Lancaster – Boston, USA. The Hague. 2:39-67.
- **OKULICZ, W.C.; BALSAMO, M.; TAST, J.** 1993. Progesterone regulation of endometrial estrogen receptor and cell proliferation during the late proliferative and secretory phase in artificial menstrual cycles in the rhesus monkey. *Biol Reprod.* 49:24-32.
- **ORTIZ, A.** 2000. Estudio ultrasonográfico del endometrio durante el ciclo menstrual en el mono capuchino (*Cebus apella*). Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. p 40.
- **ORTIZ, M.E.; VILLALÓN, M.; CROXATTO, H.B.** 1979. Ovum transport and fertility following postovulatory treatment with estradiol in rats. *Biol Reprod.* 21:1163-1167.
- **ORTIZ, M.E.; FUENTES, M.A.; ORTIZ, R.E.; PARRAGUEZ, V.H.; CROXATTO, H.B.** 2003. Mecanismo de acción del levonorgestrel administrado como anticonceptivo de emergencia en la mona *Cebus apella*. XVIII Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH 2003). *Revista Cubana de Salud Pública.* 29:1: R-83.
- **ORTIZ, R.** 2000. Dinámica morfológica de los ovarios durante el ciclo menstrual en el mono capuchino (*Cebus apella*) mediante ultrasonografía. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. p 37.

- **PERMEZEL, J.M.; LENTON, E.A.; ROBERTS, I.; COOKE, I.D.** 1989. Acute effects of progesterone and the antiprogestin RU 486 on gonadotrophin secretion in the follicular phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 68:960-965.
- **PIAGGIO, G.; VON HERTZEN, H.; GRIMES, D.; VAN LOOK, P.** 1999. Timing of emergency contraception with levonorgestrel or the Yuzpe regimen. *The Lancet.* 353(9154):1612-1613.
- **PSYCHOYOS, A.; PRAPAS, I.** 1987. Inhibition of egg development and implantation in rats after post - coital administration of the progesterone antagonist RU 486. *J Reprod Fert.* 80:487-491.
- **RECABARREN, M.P.; VALENZUELA, G.J.; SERÓN – FERRÉ, M.** 1998. Proteic - caloric restriction during pregnancy affects the adrenal - placental axis and decreases birth weight in a primate, *Cebus apella*, without affecting gestational length. *Pren Neon Med.* 3:309-313.
- **RYLANDS, A.; MITTERMEIER, R.; RODRÍGUEZ – LUNA, E.** 1997. Conservation of neotropical primates: threatened species and an analysis of primate diversity by country and region. *Folia Primatologica.* 68:134-160.
- **SAUNDERS, F.J.** 1958. The effects of several steroids on mating behavior, ovulation, and pregnancy in female rats. *Endocrinology.* 63:566-569.
- **SCHALM, O.W.** 1965. *Hematología Veterinaria.* Filadelfia, EEUU. 44-54.
- **SPIES, H.G.; NISWENDER, G.D.** 1971. Blockade of the surge of preovulatory serum luteinizing hormone and ovulation with exogenous progesterone in cycling rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys. *J Clin Endocrinol.* 32:309-316.
- **SWAHN, M.L.; WESTLUND, P.; JOHANNISSON, E.; BYGDEMAN, M.** 1996. Effect of post - coital contraceptive methods on the endometrium and the menstrual cycle. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 75:738-744.
- **WEBB, A.M.C.; RUSSELL, J.; ELSTEIN, M.** 1992. Comparison of Yuzpe regimen, danazol, and mifepristone (RU 486) in oral post - coital contraception. *British Med J.* 305:927-931.

- **WHO TASK FORCE ON POST - OVULATORY METHODS FOR FERTILITY REGULATION.** 1998. Randomized controlled trial of levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. *The Lancet.* 352:428-433.
- **WHO TASK FORCE ON POST - OVULATORY METHODS FOR FERTILITY REGULATION.** 1999. Comparison of three single doses of mifepristone as emergency contraception: a randomised trial. *The Lancet.* 353:697-702.
- **WHO TASK FORCE ON POST - OVULATORY METHODS FOR FERTILITY REGULATION.** 2002. Low dose mifepristone and two regimens of levonorgestrel for emergency contraception: a WHO multicentre randomised trial. *The Lancet.* 360:1803-1810.
- **WILLIAMS, C.L.; STANCEL, G.M.** 1996. Estrógenos y Progestágenos. **In:** Goodman Gilman, A. *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* 9º edición. Interamericana Mc Graw - Hill. México D.F., México. pp 1497-1529.
- **YAMAJI, T.; DIERSCHKE, D.J.; HOTCHKISS, J.; BHATTACHARYA, A.N.; SURVE, A.H.; KNOBIL, E.** 1971. Estrogen induction of LH release in the rhesus monkey. *Endocrinology.* 89:1034-1041.
- **ZELINSKI – WOOTEN, M.B.; STOUFFER, R.L.** 1996. Steroid receptors and action in the primate follicle. *Trends Endocrinol Metab.* 7:177-183.