



ELSEVIER

Contraception

Contraception 67 (2003) 415-419

Artículo original de investigación

Tratamiento postcoital con levonorgestrel no interfiere con eventos postfecundación en la rata

A.L. Müller, C.M. Lladós, H.B. Croxatto*

Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Reproducción y Desarrollo, Av. Alameda Bernardo O'Higgins 340, Santiago, Chile

** Correspondencia al autor: Tel.: +56-2-686-2878; fax: +56-2-222-55 15; dirección E-mail: hbcroxat@genes.bio.puc.cl (H.B. Croxatto)*

Traducido por: Andrés Müller

Resumen

Levonorgestrel (LNG), una progestina ampliamente usada para anticoncepción hormonal regular, también es usada en anticoncepción de emergencia (AE) para prevenir el embarazo después de un coito no protegido. Sin embargo, su modo de acción en AE sólo se entiende parcialmente. Una pregunta no resuelta es si AE previene el embarazo interfiriendo con eventos postfecundación. Aquí, nosotros reportamos los efectos del tratamiento agudo con LNG sobre la ovulación, fecundación e implantación en la rata. LNG inhibió la ovulación total o parcialmente, dependiendo del momento del tratamiento y/o la dosis total administrada, mientras que no tuvo efecto en la fecundación ni la implantación cuando se administró justo antes o después del coito, o antes de la implantación. Se concluyó que la administración postcoital aguda de LNG, a dosis varias veces mayor que la usada para AE en mujeres, que es capaz de inhibir la ovulación, no tenía ningún efecto postfecundación disminuyendo la fertilidad en la rata.

Palabras claves: Levonorgestrel; Anticoncepción de emergencia; Ovulación; Fecundación; Implantación; Rata

1. Introducción

Levonorgestrel (LNG), una progestina ampliamente usada para anticoncepción hormonal regular, también es usada en anticoncepción de emergencia (AE), sola o combinada con estrógeno. AE hormonal es tomada después de un coito no protegido para prevenir el embarazo. El modo de acción de AE se ha vuelto un asunto de debate acalorado en varios países latinoamericanos y del Caribe. La pregunta principal se centra en si la AE previene el embarazo interfiriendo con eventos postfecundación. Este problema es de importancia para muchas personas, que consideran que una nueva vida humana empieza cuando el proceso de fecundación finaliza. De acuerdo a esto, la interferencia con eventos postfecundación llevaría a la pérdida de vida humana.

Cuando una mujer toma AE, ella no sabe si toma las píldoras antes o después de la ovulación y antes o después de la fecundación. Por razones éticas y logísticas, no ha sido posible segregar grupos de mujeres que tomen AE después de la fecundación para evaluar su efecto en el establecimiento del embarazo. No hay evidencia directa, a favor o en contra, de que el tratamiento agudo con LNG previene el embarazo por interferencia con eventos postfecundación. Por otro lado, la experimentación animal permite segregar grupos tratados antes o después de eventos críticos, como la ovulación, fecundación e implantación en orden a definir la contribución de eventos pre y postfecundación a la eficacia anticonceptiva de la droga. Aunque la extrapolación de los resultados al humano tiene limitaciones considerables, los experimentos en animales frecuentemente dan un indicio respecto de los posibles mecanismos que operan en el humano.

Se sabe que el tratamiento agudo con LNG administrado durante la fase folicular puede inhibir o retrasar la ovulación en varias especies, incluso en el humano [1]. También, el tratamiento agudo con LNG administrado dentro

de las primeras 10 h después del coito disminuyó el número de espermatozoides recuperados desde la cavidad uterina en mujeres [2]. Según nuestro conocimiento, tal efecto no se ha descrito en animales. Además, su acción cuando es dado después del coito no ha sido bien documentada. Por consiguiente, nosotros emprendimos experimentos en animales para investigar la posible ocurrencia de efectos postfecundación.

En este artículo, nosotros describimos los efectos del tratamiento agudo con LNG dado antes o después de la ovulación o fecundación, o antes de la implantación sobre los parámetros de fertilidad en la rata. La variable principal de intervención fue el momento de la administración relativa a la ovulación, coito y fecundación. Las variables medidas fueron el porcentaje de animales que ovularon, el número medio de huevos ovulados, el porcentaje medio de huevos fecundados y el número medio de embriones implantados.

2. Material y métodos

2.1. Animales

Ratas hembras adultas de la cepa Sprague Dawley que pesaron aproximadamente 200 g y ratas machos adultos de 5-7 meses de edad se usaron. Todos los animales se mantuvieron en la misma pieza con agua y alimento *peleteado ad libitum*, iluminación desde las 7:30 a.m. a las 9:30 p.m. y temperatura entre 20-24°C.

Las hembras se sometieron diariamente a frotis vaginal. Los estados del ciclo estral se clasificaron según Turner [3]. Para obtener animales preñados, cada hembra en proestro o estro se enjauló individualmente con dos machos intactos por 1 h o toda la noche. Al final de este periodo, la presencia de semen, sangre o un tapón en la vagina y/o la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal era indicación de que el coito había ocurrido. Si el coito ocurrió, el día del estro se designó día 1 de preñez (P1).

El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales se hicieron conforme con las pautas éticas del Comité de Ética Institucional.

2.2. Soluciones de LNG

LNG en polvo se obtuvo desde los implantes Norplant (Leiras, Turku, Finlandia) o desde Schering AG, Berlín, Alemania. LNG se disolvió en 100 μ L de etanol (Merck, Darmstadt, Alemania) y luego se diluyó con 1,2-propanediol (Sigma, St. Louis, MO, USA) a una concentración final de 100 μ g/mL.

2.3. Tratamientos

Cada rata se inyectó subcutáneamente con LNG 50 μ g/kg de peso corporal por inyección o con vehículo, excepto en un grupo control que no se inyectó. Esta dosis es aproximadamente cuatro veces mayor que la dosis usada para AE y se presume que su biodisponibilidad es mayor debido a la administración sistémica. Esta dosis se dio una a cuatro veces con intervalos de 12-h. El momento del tratamiento relativo a la ovulación, coito, fecundación e implantación se resume en Figs. 1 y 2.

2.4. Efecto del tratamiento preovulatorio sobre la ovulación

Cada rata se inyectó con LNG o vehículo dos veces por día (8:00 a.m. y 8:00 p.m.) en diestro y en proestro [Grupo 1 (G1)] o con una sola inyección a las 8:00 p.m. del diestro (G2) o a las 8:00 a.m. del proestro (G3). Estas ratas se sacrificaron en estado de estro para evaluar el porcentaje de animales que ovularon y el número medio de huevos ovulados por rata.

2.5. Efecto del tratamiento antes del coito y ovulación sobre la fecundación e implantación

Los resultados del experimento anterior indicaron que una sola inyección de LNG en proestro no afectaba la ovulación. Por consiguiente, era factible estudiar los efectos del tratamiento preovulatorio (en proestro) sobre la fecundación e implantación.

Ratas en proestro se inyectaron con LNG o vehículo una vez a las 4:00 p.m. Cada rata se enjauló con dos machos desde las 9:30 a las 10:30 p.m. Si el coito se verificó, la hembra se aisló y se sacrificó en P2 para evaluar el porcentaje de huevos fecundados (G4). Si el coito no había tenido lugar a las 10:30 p.m., la hembra permaneció toda la noche con los machos. Cuando el coito se verificó a la mañana siguiente, la hembra se aisló y se sacrificó en P2

para evaluar el porcentaje de huevos fecundados o se sacrificó en P12 para evaluar el número de embriones implantados (G5). El número de hembras que no se cruzaron (que no participaron del coito) fue muy bajo y estas hembras se desecharon.

2.6. Efecto del tratamiento después del coito y antes de la ovulación sobre la fecundación e implantación

Las ratas en proestro se enjaularon con machos desde las 9:00 a las 10:00 p.m. A aquellas que participaron del coito se les inyectó LNG a las 11:00 p.m. (G6) o LNG o vehículo a las 11:00 p.m. y de nuevo 12 h después (G7). Estas ratas se sacrificaron en P2 o P 12.

2.7. Efecto del tratamiento después de la ovulación y antes del coito sobre la fecundación e implantación

Las hembras se inyectaron con LNG o vehículo una vez a las 8:00 a.m. en el día del estro e inmediatamente se enjaularon con machos hasta las 9:00 a.m. (G8). Aquellas que participaron del coito se aislaron y se sacrificaron en P2 o P12.

2.8. Efecto del tratamiento después de la ovulación y coito sobre la fecundación e implantación

Las hembras se enjaularon con machos desde las 8:00 a 9:00 a.m. en el día de estro. Si el coito se verificó, la hembra se inyectó inmediatamente con LNG o vehículo y se sacrificó en P2 o P12 (G9).

2.9. Efecto del tratamiento después de la fecundación sobre la implantación

Las ratas en proestro se enjaularon toda la noche con machos. En las que se verificó el coito, se inyectó LNG o vehículo a las 11:00 p.m. de P1 y a las 11:00 a.m. de P2 (G10) o a las 11:00 p.m. de P3 y a las 11:00 a.m. de P4 (G 11) y se sacrificaron en P12. Un experimento aparte (no mostrado) determinó que si el coito ocurre durante la noche, la fecundación se completaba aproximadamente al mediodía en nuestra colonia de ratas. Entonces, estos dos tratamientos se dieron después que la fecundación había tenido lugar.

2.10. Evaluación de la ovulación, fecundación e implantación

Las ratas de los tratamientos preovulatorios (G1-3) se sacrificaron por una sobredosis de éter al mediodía del estro para evaluar el número de ovocitos presentes en sus oviductos. Las ratas de los demás experimentos (G4-11) se sacrificaron entre las 3:00 y las 4:00 p.m. en P2 o P12 para evaluar el número de huevos fecundados y no fecundados o el número de embriones implantados, respectivamente. En estro o P2, los oviductos se removieron y perfundieron con solución salina para contar el número de huevos usando baja amplificación (250x). Cuando fue necesario, los complejos cúmulo-huevo se dispersaron con hialuronidasa (Sigma). Para evaluar la ocurrencia de fecundación, los huevos se pusieron entre cubre y portaobjetos, y se examinaron usando microscopía de campo claro (400x). Los huevos se consideraron fecundados cuando una cola de espermatozoide se vio en el citoplasma o en el espacio perivitelino. En P12, cada sitio de implantación se disecó, usando una lupa, para verificar la presencia o ausencia de un embrión (60X). Sólo los sitios de implantación que contenían embriones vivos se presentan en los resultados.

2.11. Análisis de datos

Los datos respecto de la ovulación son expresados como el porcentaje de ratas que ovularon calculado sobre el número total de animales tratados y también como el número medio de ovocitos ovulados por rata que ovuló \pm EE. Todas las ratas que participaron del coito tenían huevos fecundados o embriones implantados. Así, sólo el porcentaje medio de huevos fecundados y el número medio de embriones implantados es presentado para cada grupo. Las pruebas estadísticas One-sided Fisher's Exact y Chi Cuadrado se aplicaron apropiadamente a las Tablas de Contingencia de Dos Vías del porcentaje de ratas que ovularon. La prueba estadística Kruskal Wallis se usó para el número medio de ovocitos ovulados y el número medio de embriones implantados. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a un $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo dentro del Programa computacional Intercooled Stata 6.0 para Windows (Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

3. Resultados

3.1. Efecto del tratamiento preovulatorio sobre la ovulación (G1, G2 y G3)

El porcentaje de ratas que ovularon después de la inyección de LNG o vehículo, dos veces por día en diestro y proestro (G1), fue 0% y 83%, respectivamente. El número medio de huevos ovulados en el grupo control fue 8.0 ± 1.6 (Fig. 1). El porcentaje de ratas que ovularon entre aquellas tratadas en la tarde del diestro (G2) o en la mañana del proestro (G3) fue 25% y 63%, respectivamente, con LNG, y 88% en los dos grupos controles. La diferencia entre experimental y control en G2 es estadísticamente significativa ($p = 0.02$). El número medio de huevos ovulados fue 6.0 ± 3.0 y 9.0 ± 2.0 , respectivamente, para ratas tratadas con LNG; y 4.7 ± 0.8 y 7.1 ± 0.8 para los controles. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

3.2. Efecto del tratamiento antes del coito y ovulación sobre la fecundación e implantación (G4 y G5)

Todas las ratas en estos experimentos tuvieron los huevos fecundados en P2 o los embriones implantados en P12. El porcentaje medio de huevos fecundados después de inyectar LNG o vehículo a las 4:00 p.m. del proestro y coito entre 9:30 y 10:30 p.m. (G4), fue 100% en ambos grupos. Entre aquellas que tuvieron coito (G5), el porcentaje medio de huevos fecundados fue 100% en el grupo de LNG y $98 \pm 1.8\%$ en los controles, y el número medio de embriones implantados fue 9.2 ± 1.1 y 10.2 ± 0.5 , respectivamente (Fig. 2). Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

3.3. Efecto del tratamiento después del coito y antes de la ovulación sobre la fecundación e implantación (G6 y G7)

Todas las ratas tuvieron huevos fecundados en P2 o embriones implantados en P12. El porcentaje medio de huevos fecundados en ratas que participaron del coito entre las 9:00 y las 10:00 p.m. (en proestro) y se les inyectó con LNG a las 11:00 p.m. (G6) fue 100% y el número medio de embriones implantados fue 11.2 ± 0.4 . El número de embriones implantados en animales contemporáneos no tratados (no inyectados) fue 11.0 ± 0.5 (indicado con asterisco en Fig. 2). En aquellas inyectadas con LNG a las 11:00 p.m. del proestro y 11:00 a.m. del estro (G7), el porcentaje medio de huevos fecundados fue $94 \pm 5.6\%$ y el número medio de embriones implantados fue 10.8 ± 0.5 para LNG y 10.0 ± 0.7 para los controles (Fig. 2). Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

3.4. Efecto del tratamiento después de la ovulación y antes del coito sobre la fecundación e implantación (G8)

El porcentaje medio de los huevos fecundados en ratas tratadas a las 8:00 a.m. del estro y que participaron del coito dentro de la siguiente hora fue $75 \pm 14.8\%$ para LNG y $97 \pm 3.3\%$ para los controles. El número medio de embriones implantados fue 15.3 ± 0.6 y 12.9 ± 0.8 , respectivamente (Fig. 2). Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

3.5. Efecto del tratamiento después de la ovulación y coito sobre la fecundación e implantación (G9)

El porcentaje medio de huevos fecundados en ratas inyectadas inmediatamente después del coito en estro temprano fue $97 \pm 3.3\%$ para LNG y 100% para el vehículo, y el número medio de embriones implantados fue 11.8 ± 1.6 para LNG y 12.8 ± 0.8 para los controles (Fig. 2). Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

3.6. Efecto del tratamiento después de la fecundación sobre la implantación (G10 y G11)

Todas las ratas tuvieron embriones implantados en P12. El número medio de embriones implantados en aquellas tratadas a las 11:00 p.m. de P1 y a las 11:00 a.m. de P2 (G 10) fue 11.0 ± 0.8 para LNG y 10.6 ± 0.7 para los controles. En aquellas inyectadas con LNG o vehículo a las 11:00 p.m. de P3 y a las 11:00 a.m. de P4 (G 11), el número medio de embriones implantados fue 11.8 ± 0.8 y 10.0 ± 0.9 , respectivamente (Fig. 2). Ninguna de las diferencias fue estadísticamente significativa.

4. Discusión

Los resultados presentados demuestran que el tratamiento agudo con LNG, brevemente antes o después del coito, antes o después de la fecundación, o antes de la implantación, no tiene efecto sobre el establecimiento de la preñez en la rata intacta (Fig. 2). Esto excluye que LNG interfiere con pasos postfecundación en esta especie y está de acuerdo con el hecho que el tratamiento diario con LNG a ratas castradas es capaz de sostener la preñez [4]. Ninguna evidencia de efecto antifertilidad atribuible a la interferencia con eventos postfecundación pudo demostrarse. Por contraste, el tratamiento preovulatorio con LNG pudo inhibir ovulación. La supresión de la ovulación fue altamente dependiente de cómo se efectuó la administración (Fig. 1). El porcentaje de animales que no ovuló fue 100%, 75% y

37%, después de la(s) inyección(es) de LNG dos veces por día, una vez en la tarde del diestro o una vez en la mañana del proestro, respectivamente. La efectividad de una sola inyección disminuyó cuando el tratamiento se acercó estrechamente al momento esperado del episodio ovulatorio. Por consiguiente, LNG inhibió la ovulación total o parcialmente dependiendo del momento del tratamiento y posiblemente la dosis total administrada. La relación dosis-respuesta no se examinó adecuadamente. La posibilidad que la ovulación pudiera haber sido retrasada no puede excluirse, porque nosotros no realizamos las autopsias en el tercer día después del estro para probar la ocurrencia de ovulación retardada.

La inhibición de la ovulación en la rata después de la administración de una dosis de LNG se ha documentado previamente. La ovulación se retrasó en ratas inyectadas por la tarde del metaestro con LNG 50 μ g/kg disuelto en aceite, mientras que se suprimió totalmente con 200 μ g/kg (5). Cuando LNG disuelto en aceite se inyectó en la tarde del diestro, bloqueó la ovulación de una manera dosis-dependiente; la dosis antiovulatoria fue 200-400 μ g/kg (6). Las diferencias más obvias con nuestros experimentos son el vehículo usado y el momento de administración. En nuestro estudio, 50 μ g/kg de LNG disueltos en 1,2-propanediol inyectados en la tarde del diestro inhibió la ovulación en 75% de los animales y cuatro dosis administradas cada 12 h comenzando en la mañana del diestro (en total = 200 μ g/kg) suprimieron completamente la ovulación.

Hay mucha información acerca de los efectos de LNG en la ovulación en mujeres. En forma resumida, LNG puede inhibir la ovulación cuando se administra uno o más días antes de la ruptura folicular [7-9]. Es conocido que LNG afecta la ovulación en animales [5,10] y mujeres [11], por lo menos a través de la interferencia con la señalización de la pituitaria. Se han reportado los efectos inconsistentes de LNG sobre los marcadores de la receptividad endometrial en mujeres [8,9]. El efecto de LNG sobre los marcadores de receptividad en la rata no se estudiaron en el presente estudio.

En conclusión, la administración postcoital de LNG, a dosis capaces de afectar la ovulación, no tuvo efecto antifertilidad atribuible a la interferencia con eventos postfecundación en la rata.

Agradecimientos

Apoyo para este estudio lo proporcionó Fundación Instituto Milenio de Investigación en Biología Fundamental y Aplicada, Cátedra Presidencial en Ciencias, Fondecyt #898000-8 y RF98024#98.

Referencias

- [1] Croxatto HB, Devoto L, Durand M, et al. Mechanism of action of hormonal preparations used for emergency contraception: a review of the literature. *Contraception* 2001;63:111-21.
- [2] Kesserü F, Garmendia F, Westphal N, Parada J. The hormonal and peripheral effects of d-norgestrel in postcoital contraception. *Contraception* 1974;10:411-24.
- [3] Turner CD, editor. *General endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders, 1960.
- [4] Kuhnz W, Beier S. Comparative progestational and androgenic activity of norgestimate and levonorgestrel in the rat. *Contraception* 1994;49:275-89.
- [5] Beattie CW, Corbin A. The differential effects of diestrous progestogen administration on proestro gonadotrophin levels. *Endocrinology* 1975;97:885-90.
- [6] Upton GV, Corbin A. The relevance of the pharmacological properties of a progestational agent to its clinical effects as a combination oral contraceptive. *Yale J Biol Med* 1989;62:445-57.
- [7] Hapangama D, Glasier AF, Baird DT. The effects of peri-ovulatory administration of levonorgestrel on the menstrual cycle. *Contraception* 2001;63:123-9.
- [8] Durand M, Cravioto M, Raymond EG, et al. On the mechanism of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception* 2001;64:227-34.
- [9] Marions L, Hultenby K, Lindell I, et al. Emergency contraception with mifepristone and levonorgestrel: mechanism of action. *Obstet Gynecol* 2002; 100:65-71.
- [10] Spona J, Schneider WHF, Bieglmayer C, Schroeder R, Pirker R. Ovulation inhibition with different doses of levonorgestrel and other progestogens: clinical and experimental investigations. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1979;88(Suppl):7-15.
- [11] Croxatto HB. Mechanisms that explain the contraceptive action of progestin implants for women. *Contraception* 2002;65:21-7.

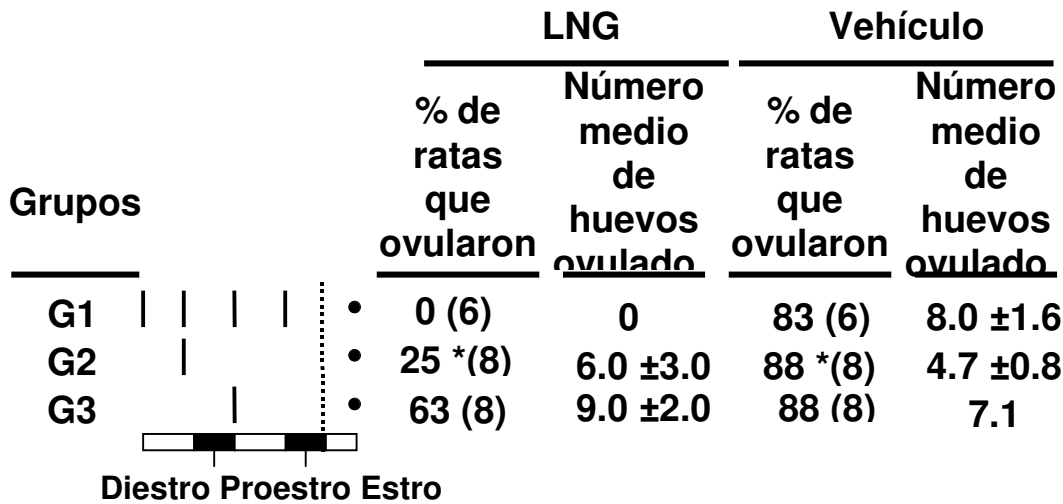


Fig. 1. Efectos de la administración preovulatoria de levonorgestrel (LNG) o vehículo sobre la ovulación en la ratas. | = momento de cada inyección de LNG o vehículo; | = momento aproximado de ovulación (línea entrecortada); • = autopsia. La escala de tiempo indica los días del ciclo estral, con los periodos de luz y oscuridad pintados con barras blancas y negras, respectivamente. n = número de animales tratados. † Por ratas que ovuló; *p = 0.02.

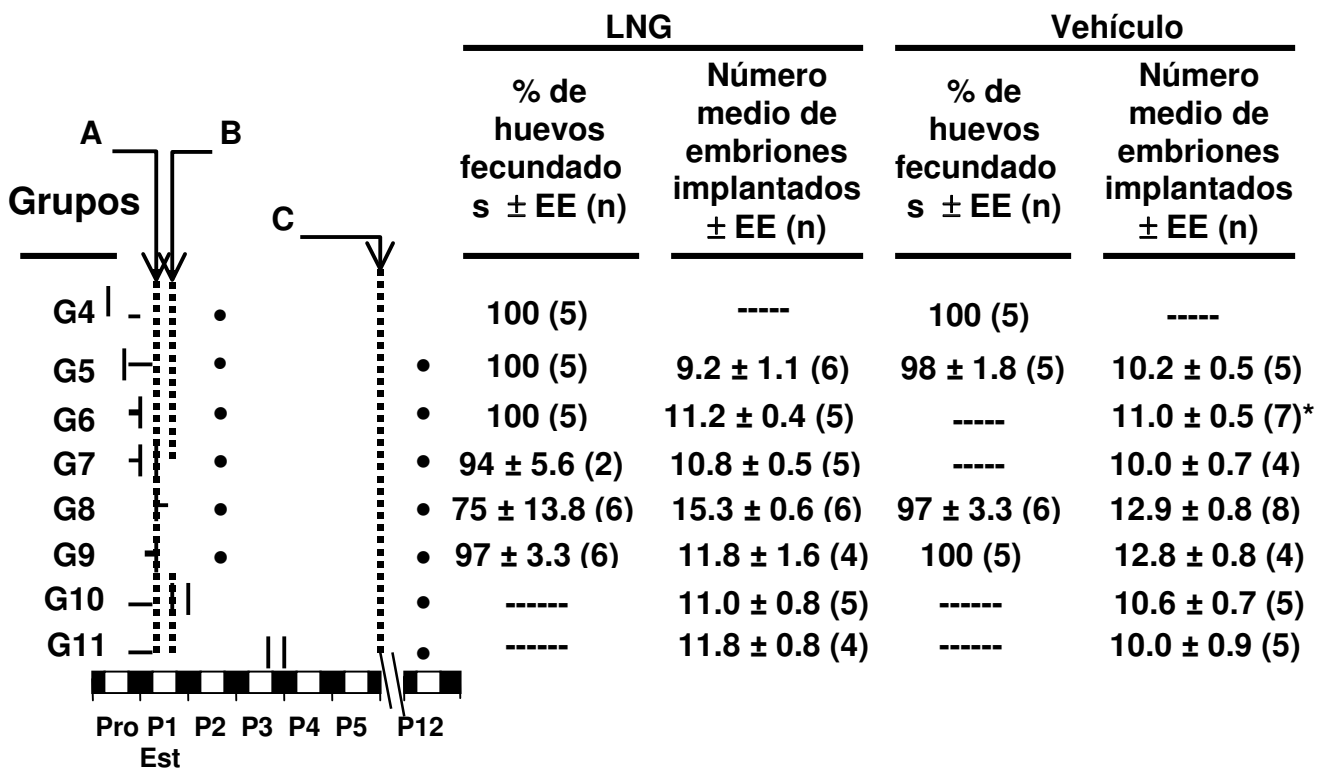


Fig. 2. Efectos de levonorgestrel (LNG) o vehículo sobre la fecundación e implantación en la ratas. | = momento de cada inyección de LNG o vehículo; — = periodo de apareamiento que resultó en coito; A, B, y C = momentos aproximados de ovulación, fecundación e implantación, respectivamente; • = autopsia. La escala de tiempo indica los días del ciclo de estral (Pro: proestro; Est: estro) y días de preñez (P1-P12). n = número de animales tratados. *Animales no inyectados con vehículo. Ninguna de las diferencias fue estadísticamente significativa.