



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

**MECANISMOS DE ACCIÓN DE LEVONORGESTREL Y
MIFEPRISTONA COMO ANTICONCEPTIVOS DE EMERGENCIA:
EFECTOS SOBRE LA UNIDAD HIPOTÁLAMO HIPOFISARIA Y EL
ENDOMETRIO.**

TESIS

PRESENTA: DRA. ANA ELENA BARRIOS HERNÁNDEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

ASESOR DE TESIS:
DR. FERNANDO LARREA GALLO
DRA. MARTA MARGARITA DURAND CARBAJAL

Ciudad de México, 12 de julio del 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"DR. SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DR. FERNANDO LARREA GALLO
PROFESOR TITULAR DEL CURSO Y JEFE DEL DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DR. CARLOS GUAL CASTRO

DRA. MARTA MARGARITA DURAND CARBAJAL
PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO Y ASESOR DE TESIS, DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DR. CARLOS GUAL CASTRO

TÍTULO DE TESIS

**MECANISMOS DE ACCIÓN DE LEVONORGESTREL Y MIFEPRISTONA
COMO ANTICONCEPTIVOS DE EMERGENCIA: EFECTOS SOBRE LA
UNIDAD HIPOTÁLAMO HIPOFISARIA Y EL ENDOMETRIO.**

A mi familia, maestros y amigos.

ÍNDICE

	Página
Resumen	5
Antecedentes	8
Definición del problema y justificación	13
Hipótesis	13
Objetivos	13
Material y métodos	15
Resultados	21
Discusión y conclusiones	45
Agradecimientos	51
Referencias	52

RESUMEN

Antecedentes: La investigación en salud reproductiva representa una de las áreas de mayor importancia en salud pública. A este respecto, el desarrollo de nuevos métodos para el control de la fertilidad en población de alta vulnerabilidad como es el caso de las y los adolescentes es una prioridad a nivel mundial. En este trabajo se estudiaron los mecanismos de acción de levonorgestrel (LNG), una progestina sintética con actividad agonista del receptor de la progesterona o de mifepristona (MFP) un antagonista de los receptores de la progesterona, con la finalidad de conocer sus efectos a nivel endometrial y proveer con información científica y basada en evidencias a médicos, a la población usuaria y autoridades sanitarias.

Objetivos: El objetivo principal de este estudio fue el análisis de los cambios a nivel transcripcional en el endometrio durante la ventana de implantación en mujeres tratadas con LNG y MFP el día de la ruptura folicular.

Metodología: Se estudiaron 10 mujeres sanas en edad reproductiva durante dos ciclos consecutivos, uno control y en otro donde recibieron LNG a la dosis de 1.5 mg (5 mujeres) o 50 mg de MFP (5 mujeres) por vía oral el día de la ruptura folicular (RF). Se tomaron muestras de endometrio seis días después de la RF para la extracción y análisis de los ácidos nucleicos. Los perfiles de expresión diferencial en el endometrio se estudiaron en muestras de RNA total mediante su análisis por medio de micromatrices utilizando la plataforma de Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0. Después de la normalización de los

perfiles de fluorescencia, los resultados fueron analizados a través del uso de diferentes plataformas bioinformáticas para el análisis funcional de los resultados. La validación de los resultados de expresión diferencial se realizó mediante el análisis de muestras de RNA total por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

Resultados: La administración de LNG seis días previos a la ventana de implantación demostró la presencia de cambios en los perfiles de expresión de genes en el endometrio. Los cambios más relevantes se observaron en procesos biológicos relacionados con embarazo femenino y biofunciones asociadas a receptividad del útero. El análisis de predicción molecular con base a las listas de genes diferencialmente expresados para estas biofunciones fue predicha como activada a diferencia de los resultados con MFP que fue inhibida.

Conclusiones:

La administración de LNG resultó en un perfil de expresión génica en el endometrio compatible con el desarrollo de un fenotipo receptivo a diferencia de MFP en donde la expresión génica en el endometrio durante la ventana de implantación fue compatible con su efecto antagonista de la progesterona. Los cambios más significativos estuvieron confinados a procesos de respuestas agudas, inflamatorias e inmunológicas. Dentro de los cambios a nivel transcripcional, aquellos relacionados con la expresión de genes regulatorios de la transición a la fase de receptividad endometrial como *LIF* fue el que mostró mayor relevancia biológica de acuerdo a la información disponible en la actualidad, así

como las vías canónicas involucradas en respuesta inflamatoria aguda y de la familia de las cinasas JAK en la vía de señalización de citocinas tipo IL-6. Estos resultados permiten apoyar con evidencia científica las características y los cambios del transcriptoma endometrial y su respuesta a la administración de agonistas o antagonistas utilizados ampliamente en anticoncepción y en particular en anticoncepción de emergencia. Consideramos que estos resultados son de utilidad en el establecimiento de los mecanismos de acción de la anticoncepción de emergencia y permite sugerir que LNG a la dosis utilizada en anticoncepción de emergencia el día de la ruptura del folículo ovárico (ovulación) no posee efectos anti implantación en el endometrio humano.

ANTECEDENTES

La ciencia aplicada a la biomedicina ha impactado con importantes beneficios a los seres vivos de tal manera que en la actualidad la esperanza de vida es considerablemente mayor en comparación con la del siglo pasado. Las aportaciones derivadas de la investigación científica han transformado a generaciones a través de sus tiempos. Así, las mujeres hoy en día comparadas con generaciones anteriores son beneficiadas en relación a sus derechos, libertades y sobre todo a su autonomía reproductiva. Las mujeres, gracias al desarrollo de métodos anticonceptivos, pueden separar, por así decirlo, su vida sexual de la reproductiva. En el mundo de hoy las mujeres tienen acceso a métodos más seguros y reversibles de uso diario, mensual, anual o más años y cerca del 75% de las parejas utilizan alguno de ellos. Aún a pesar del importante avance científico y tecnológico que representó el desarrollo de métodos para el control de la fertilidad, existen todavía rezagos que deben considerarse y tomarse en cuenta para ampliar la oferta de métodos y satisfacer las demandas de las y los usuarios. Existen cuatro eventos en la fisiología de la reproducción humana que han sido y son todavía blancos potenciales de la ciencia moderna en anticoncepción: la ovulación, la producción y desarrollo del espermatozoide, el proceso de la fecundación y la implantación del ovocito fecundado. Hasta ahora solo la interferencia con el proceso de la ovulación ha sido de manera exitosa la mejor opción abordada por la ciencia moderna.

Los métodos utilizados en anticoncepción se clasifican en métodos temporales o reversibles y los permanentes. El término reversible se refiere al retorno de la fecundidad. Dentro de los métodos temporales se incluyen a los anticonceptivos hormonales combinados o de progestina sola, los de uso poscoital o de emergencia, de administración oral, parenteral, subdérmica y transdérmica, los dispositivos intrauterinos medicados, anillos vaginales, los métodos de barrera como el condón y los espermicidas y los métodos naturales o de abstinencia periódica (1-4). Los métodos permanentes incluyen la salpingoclasia bilateral y la vasectomía

Dentro de los métodos anticonceptivos, la anticoncepción hormonal de emergencia (AHE) representa una opción confiable para la prevención de embarazos no deseados sobre todo en casos de violencia o de falla del método, particularmente en la población adolescente (5). La utilización de la AHE, también conocida como anticoncepción poscoital, es un método eficaz para la prevención de embarazos. La AHE consiste en la administración combinada de estrógenos y progesterona o de un agonista sintético de la progesterona como el levonorgestrel (LNG) dentro de las primeras 72 horas posteriores al coito. El uso de este método está indicado en mujeres en edad reproductiva con vida sexual activa, incluyendo las adolescentes. En general la AHE no es de uso regular y sus recomendaciones son la ocurrencia de coitos no protegidos y la falla u olvido de un método anticonceptivo, entre otros. La ocurrencia de náusea y vómito representan los efectos secundarios más frecuentes. La eficacia del método depende de la fase del ciclo en la que el coito y el tratamiento tienen lugar. Esta cifra es de alrededor

del 75%, es decir que tres de cada cuatro embarazos esperados durante la fase fértil del ciclo (30%) son prevenidos. El retraso en el tratamiento, sobre todo para el caso del LNG, disminuye de manera significativa la eficacia del método.

En caso de que el embarazo (implantación) haya ocurrido, el método no afecta la evolución y desarrollo del embarazo (6). Existen otros compuestos, además de los ya mencionados, algunos de ellos en fases de desarrollo como los moduladores selectivos del receptor de la progesterona con actividad antagonista como el acetato de ulipristal y la mifepristona (7, 8), o bien los nuevos antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas hipofisarias (GnRH). La AHE fue incorporada a la Norma Oficial de los Servicios de Planificación Familiar en el año del 2004 y en el 2005 se incorporó LNG al cuadro básico de medicamentos del Sector Público.

En relación al mecanismo de acción de la AHE, existen todavía pocos estudios sobre su efecto a nivel endometrial y en especial en los procesos responsables de la implantación del embrión sobre todo para el caso del LNG utilizado como progestina sola para la prevención del embarazo. La mayoría de los estudios realizados con diferentes dosis y esquemas de tratamiento establecen que la administración durante la fase preovulatoria suprime la liberación aguda de la hormona luteinizante (LH), así como la esteroidogénesis a nivel de la unidad teca-granulosa del ovario (9); sin embargo, su administración durante la fase ovulatoria del ciclo menstrual no se acompaña de alteraciones en los mecanismos involucrados en la liberación de LH hipofisaria y por lo tanto del fenómeno de la

ovulación (10, 11). Estas observaciones indican que la eficacia de LNG para inhibir la ovulación es mayor en los días del ciclo menstrual con menor probabilidad de embarazo y menor en las fases con mayor probabilidad (fase periovulatoria), por lo que otros mecanismos de acción de LNG, además de la inhibición de la ovulación, deben ser considerados para explicar su elevada eficacia anticonceptiva.

Nuestro grupo está interesado en estudiar a nivel de biología de sistemas aplicada a la reproducción humana la expresión de distintos biomarcadores endometriales asociados con el fenómeno de la implantación (12). Este estudio está encaminado a proporcionar información sobre las características que identifican al endometrio como receptivo; es decir, que posea la capacidad de anidar un huevo fecundado. El análisis de la expresión génica en el endometrio durante las fases de mayor receptividad (ventana de implantación), que ocurre aproximadamente 7 días posteriores a la ocurrencia de la ovulación, permite conocer los cambios que ocurren y caracterizan al fenotipo receptivo del endometrio bajo diferentes condiciones clínicas y experimentales. Es importante señalar que gracias al desarrollo de tecnología en biología molecular la que aunada a la identificación de los productos finales de transcripción y traducción génica (transcriptoma y proteoma) hace factible contar con biomarcadores endometriales de mayor sensibilidad que los tradicionalmente utilizados (histológicos, hormonales, ultrasonido, etc.) para el estudio del efecto sobre el endometrio de hormonas naturales y sintéticas, algunas de ellas utilizadas en AHE.

En este trabajo de tesis se describen y discuten los resultados del análisis de las firmas de expresión génica de biopsias del endometrio obtenidas durante la fase meso lútea del ciclo menstrual de mujeres sanas tratadas el día de la ovulación con LNG a la dosis utilizada en AHE. Los resultados fueron comparados con los obtenidos con mifepristona (MFP), un antagonista del receptor de progesterona, con efectos antiimplantación en el endometrio humano (13). El objetivo general fue establecer los efectos de la administración de LNG en mujeres sanas durante la ovulación sobre el endometrio en biopsias obtenidas durante la fase de implantación del ciclo menstrual.

DEFINICIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La eficacia de LNG para inhibir la ovulación es mayor en los días del ciclo menstrual con menor probabilidad de embarazo y menor en las fases con mayor probabilidad (fase periovulatoria), por lo que otros mecanismos de acción de LNG, además de la inhibición de la ovulación, deben considerarse para explicar su elevada eficacia anticonceptiva.

HIPÓTESIS

La administración de LNG a diferencia de MFP durante la fase ovulatoria del ciclo menstrual no modifica de manera significativa el patrón de expresión del genoma completo en el endometrio comparado con el obtenido en el ciclo control.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo principal de este estudio fue el análisis de los cambios a nivel transcripcional en el endometrio durante la ventana de implantación en mujeres tratadas con LNG y MFP el día de la ruptura folicular.

Objetivos específicos

- Cuantificar las concentraciones circulantes de gonadotropinas y hormonas esteroides en un grupo control y grupo tratado con LNF o MFP a la dosis de anticoncepción de emergencia.

- Analizar el efecto de la administración el día de la ruptura folicular de LNF o MFP sobre el perfil de expresión genómica en el endometrio en la fase mesolútea del ciclo menstrual.
- Validar los cambios de la expresión diferencial del genoma endometrial.
- Establecer la relevancia biológica de los cambios de expresión diferencial del genoma endometrial en mujeres tratadas con LNG o MFP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de la muestra

Este estudio fue aprobado para su realización por los Comités de Ética e Investigación y de Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Se reclutaron, previo consentimiento informado, 10 mujeres voluntarias sanas sin riesgo de embarazo (salpingoclasia bilateral, pareja vasectomizada o en abstinencia sexual) entre los 22 y 35 (29 ± 4.5) años de edad, con ciclos menstruales regulares con duración de 28.5 ± 3.05 días (26 – 33.5) y sin el antecedente del uso de anticonceptivos u otra medicación en los últimos 6 meses previos al estudio. La población estudiada fue clínica y metabólicamente sana para su evaluación mediante la elaboración de una historia clínica completa y exploración física, además de estudios de laboratorio como citología hemática completa, examen general de orina y citología cérvico-vaginal, incluyendo las determinaciones en suero de LH, E₂ y P₄. Cada una de las sujetos fue estudiada durante un ciclo menstrual control (C) y en el ciclo consecutivo fueron aleatorizadas en 2 grupos de 5 mujeres cada uno y tratadas (T) cada uno con 1.5 mg de levonorgestrel (T-LNG) o 50 mg de mifepristona (T-MFP) por vía oral, respectivamente al momento de la ruptura folicular. En todas las participantes se obtuvieron muestras de tejido endometrial como se describe a continuación.

Procedimientos

La ruptura folicular (ovulación) se documentó por ultrasonido seriado por vía transvaginal realizados por un solo observador en un equipo ACUSON X150 Siemens (Siemens Medical Solutions CA, EU) con transductores de multifrecuencia de 5 y 7.5 Hz. Seis días después de la ruptura folicular se obtuvieron muestras de tejido endometrial bajo anestesia local para su procesamiento posterior, las cuales fueron identificadas como C-LH+7, T-LNG y T-MFP. Las muestras de endometrio se obtuvieron de la pared posterior de la cavidad uterina, así como una muestra de sangre de la vena antecubital para la cuantificación de P_4 en suero. El tejido endometrial fue procesado para su análisis histológico utilizando los criterios descritos por Noyes (14), así como, para la extracción de ácidos nucleicos.

Determinaciones hormonales

Las concentraciones circulantes de LH, E_2 y P_4 se cuantificaron en muestras de suero obtenidas durante las fases periovulatoria y lútea del ciclo menstrual por análisis inmunoradiométricos utilizando anticuerpos específicos. Los coeficientes de variación y otros criterios de control de calidad para estos análisis han sido previamente descritos (12, 15).

Preparación del RNA

El RNA se obtuvo de las biopsias de endometrio por el método de TRIzol (Life Technologies) (16). Brevemente: cada muestra de tejido se homogenizó en 1 ml de TRIzol y se añadieron 200 μ l de cloroformo. La fase acuosa se purificó en

columnas de Qiagen RNeasy, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de RNA se trataron con DNAsa 1 (Ambion) y su calidad se determinó utilizando un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) y el RNA total se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop).

Con la finalidad de generar fragmentos de cDNA amplificados y biotilados de cadena líder para su análisis en micromatrices de expresión, se utilizó el estuche Affymetrix GeneChip Whole-Transcript PLUS (WT) Sense Target Labeling (Affymetrix, Inc.).

Análisis de expresión

Las muestras de RNA fueron procesadas utilizando el estuche comercial de marcado Affymetrix Whole Transcript Sense. Brevemente: 200 ng de RNA de tres réplicas biológicas serán procesados para la síntesis de la primera cadena de cDNA utilizando el estuche comercial Superscript II reverse transcriptase cebado con oligomeros poli (T), para posteriormente sintetizar la segunda cadena y la transcripción de cRNA. Los productos de cRNA fueron utilizados como plantados para un segundo ciclo de síntesis de cDNA donde se incorporaron dUTPs a la nueva cadena. El cDNA fue fragmentado (40-70 mers) y los fragmentos marcados con biotina fueron hibridados a las micromatrices GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0) (Affymetrix)). La micromatriz representa 28,407 transcritos totales RefSeq cubiertos con una mediana de 22 sondas por gen, lo que asegura la detección precisa para los cambios de expresión de transcritos de genoma completo (<http://www.affymetrix.com>). Para el análisis de la expresión génica

diferencial entre las muestras control (C) y tratadas (T) se utilizaron micromatrices desarrolladas por Affymetrix (GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0). La hibridación de los fragmentos de cDNA blanco biotilados con la micromatriz se llevó a cabo durante 17 h a 45°C. Posterior al período de incubación, las micromatrices fueron lavadas con soluciones de alta y baja astringencia para su tinción con estreptavidina-ficoeritrina de acuerdo al protocolo de Affymetrix Fluidics Station 450 FS450_0007. Las señales de fluorescencia se analizaron utilizando el equipo GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Inc.) cuya intensidad y calidad de los datos se obtuvieron con el programa Expression Console (Affymetrix, Inc.). La identificación de genes diferencialmente expresados se llevó a cabo con el lenguaje estadístico R (V 2.13). Los valores de p absolutos se ajustaron de acuerdo a la proporción esperada de errores de tipo 1 entre las hipótesis rechazadas (tasas de descubrimiento falsas; FDR). La expresión diferencial se determinó utilizando modelos de estadística lineal con coeficientes arbitrarios; los contrastes de interés se analizaron utilizando la librería *limma* de bioconductor (12). La corrección para múltiples hipótesis se aplicó utilizando la tasa de descubrimiento falso (FDR). El análisis funcional se llevó a cabo con Fatigo de Babelomics 5.0 (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>) utilizando términos de ontología génica (procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares) generado a partir de la lista de genes diferencialmente expresados (GDE)(17). El estudio de los efectos de las progestinas sintéticas sobre las biofunciones ováricas asociadas con estos tratamientos se utilizó el análisis de ingenuidad de vías (<http://www.ingenuity.com>). Un proceso o vía fue considerada como estadísticamente significativa cuando el valor de obtenido sea $p < 0.05$ utilizando

la prueba exacta de Fisher de cola derecha. La validación de los resultados de las micromatrices se llevó a cabo por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de los genes más relevantes y de mayor expresión.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La obtención del cDNA se llevó a cabo a partir de 1 microgramo de RNA total a través de la reacción de la transcriptasa reversa y oligo-dT del RNA total de acuerdo a las indicaciones del estuche comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis de Roche en un termociclador LightCycler® 2.0. Para el RT-qPCR de RNA total, se utilizaron los estuches comerciales Light Cycler Taqman Master de Roche y TaqMan Assay (Ambion-Applied Biosystems). Los cDNAs fueron amplificados en un volumen final de 10 µL, utilizando una mezcla de reacción que contiene agua grado PCR, cDNA, los iniciadores y DNA polimerasa Taqman (Master Mix, 5x). La mezcla se colocó en capilares de vidrio, los cuales se centrifugaron y colocaron en el termociclador, LightCycler® 2.0. Los oligonucleótidos para la amplificación en tiempo real de cada gen (Tabla 1) se diseñaron con base al programa en línea del fabricante (Universal Probe Library Assay Design Center, ROCHE, <https://www.roche-applied-science.com>), y su alineación con la secuencia de interés se verificó en la página del Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>); se utilizaron sondas de hidrólisis tipo Taqman (Universal Probe Library, ROCHE). Incubaciones en paralelo en presencia de agua bidestilada o en ausencia de transcriptasa reversa se incluyeron como controles negativos. La abundancia relativa de la expresión

génica se obtuvo por la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando a *GAPDH* como el gen constitutivo para la normalización de los datos (18).

Tabla 1. Oligonucleótidos sentido y antisentido utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Gen	No. de acceso	Sentido (5', 3')	Antisentido (5', 3')
<i>PAEP</i>	NM_001018049.1	CCTGTTTCTCTGCCTACAGGA	CGTCCTCCACCAGGACTCT
<i>LIF</i>	NM_176870.2	TGCCAATGCCCTCTTTATTC	GTCCAGGTGGTGGGGAAC
<i>SAT3</i>	NM_139276.2	GAGCAGAGATGTGGGAATGG	CGGTCTCAAAGGTGATCAGG
<i>PRL</i>	NM_O00948.5	CAAAGGATCGCCATGGAA	CACAGGAGCAGGTTTGACAC
<i>PGR</i>	NM_001202474.1	CTTTGCATGTCTGTCCAACC	CTGCTCTAGTCTTACCCGTGTG

Análisis estadístico

Las correlaciones entre los resultados obtenidos por RT-qPCR y las micromatrices de expresión fueron calculadas por el análisis del momento del producto de Pearson. La significancia estadística de las diferencias de expresión génica entre las medias de los grupos C y T se realizó con la prueba t de Student pareada, en caso de distribución normal, o de su equivalente no paramétrico. En el caso de variables categóricas se utilizó la prueba de ji cuadrada. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Number Cruncher Statistical System (NCSS) 2004 (329 North 1000 East, Kaysville), considerando como significativo un valor de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Características Clínicas y efectos de LNG y MFP sobre el ciclo menstrual

Las características clínicas de la población de estudio se muestran en la Tabla 2. Todas las voluntarias tuvieron ciclos menstruales regulares tanto durante el ciclo control como en ciclos tratados con LNG y MFP (Tablas 3 y 4), así como por las determinaciones de las concentraciones circulantes en suero de LH, E₂ y P₄ (Figuras 1 y 2).

Tabla 2. Características clínicas de los sujetos de estudio.

Variable	(n=10)
Edad	29 ± 4.5
[Valor máximo-mínimo]	[22-35]
Presión arterial	
Sistólica	98 ± 9.1 mmHg
[Valor máximo-mínimo]	[80-110]
Diastólica	65 ± 5.2 mmHg
[Valor máximo-mínimo]	[60-70]
IMC	25.85 kg/m ² ± 2.60
[Valor máximo-mínimo]	[19.92-28.26]

Los resultados están expresados en la media ± DE.

Tabla 3. Efecto de LNG sobre las características del ciclo menstrual.

Variable	C-LH+7	T-LNG	p
Duración del ciclo menstrual	26 ± 2.44	25.4 ± 2.19	0.607
[Valor máximo-mínimo]	[24-30]	[22-28]	
Duración de la fase folicular	13 ± 2.54	12.8 ± 1.92	0.847
[Valor máximo-mínimo]	[11-17]	[10-15]	
Duración de la fase lútea	13 ± 1.22	12.6 ± 0.54	0.477
[Valor máximo-mínimo]	[12-15]	[12-13]	
Ruptura folicular	13.4 ± 2.3	12.8 ± 1.92	0.553
[Valor máximo-mínimo]	[11-17]	[10-15]	
Diámetro folicular máximo	23 ± 1.42	19.12 ± 7.15	0.292
[Valor máximo-mínimo]	[21.2-25.2]	[6.6-23.7]	

Los resultados están expresados en la media ± DE.

Tabla 4. Efectos de MFP sobre las características del ciclo menstrual.

Variable	C-LH+7	T-MFP	p
Duración del ciclo menstrual [Valor máximo-mínimo]	31 ± 3.67 [28-37]	28.6 ± 2.7 [26-33]	0.299
Duración de la fase folicular [Valor máximo-mínimo]	18.2 ± 4.20 [14-25]	15.6 ± 2.7 [13-19]	0.098
Duración de la fase lútea [Valor máximo-mínimo]	12.8 ± 0.83 [12-14]	13 ± 2.54 [9-15]	0.828
Ruptura folicular [Valor máximo-mínimo]	16 ± 3.16 [12-20]	15.6 ± 2.7 [13-19]	0.757
Diámetro folicular máximo [Valor máximo-mínimo]	22.22 ± 1.44 [20.1-24]	22.8 ± 2.53 [21-27.3]	0.676

Los resultados están expresados en la media ± DE.

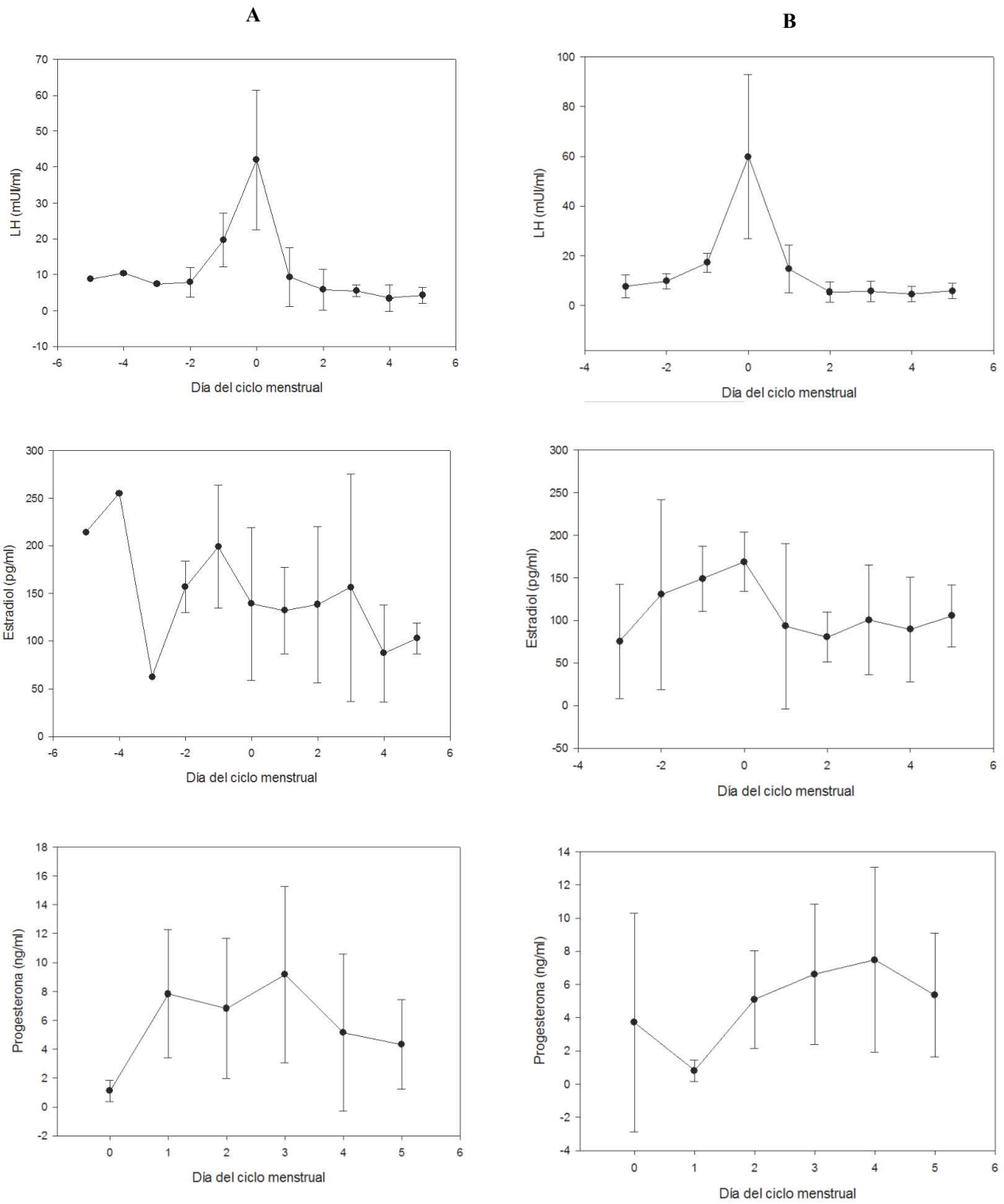


Figura 1. Concentraciones circulantes en suero de LH, E₂ y P₄ durante un ciclo control (A) y tratado con LNG (B). Ver material y métodos para detalles.

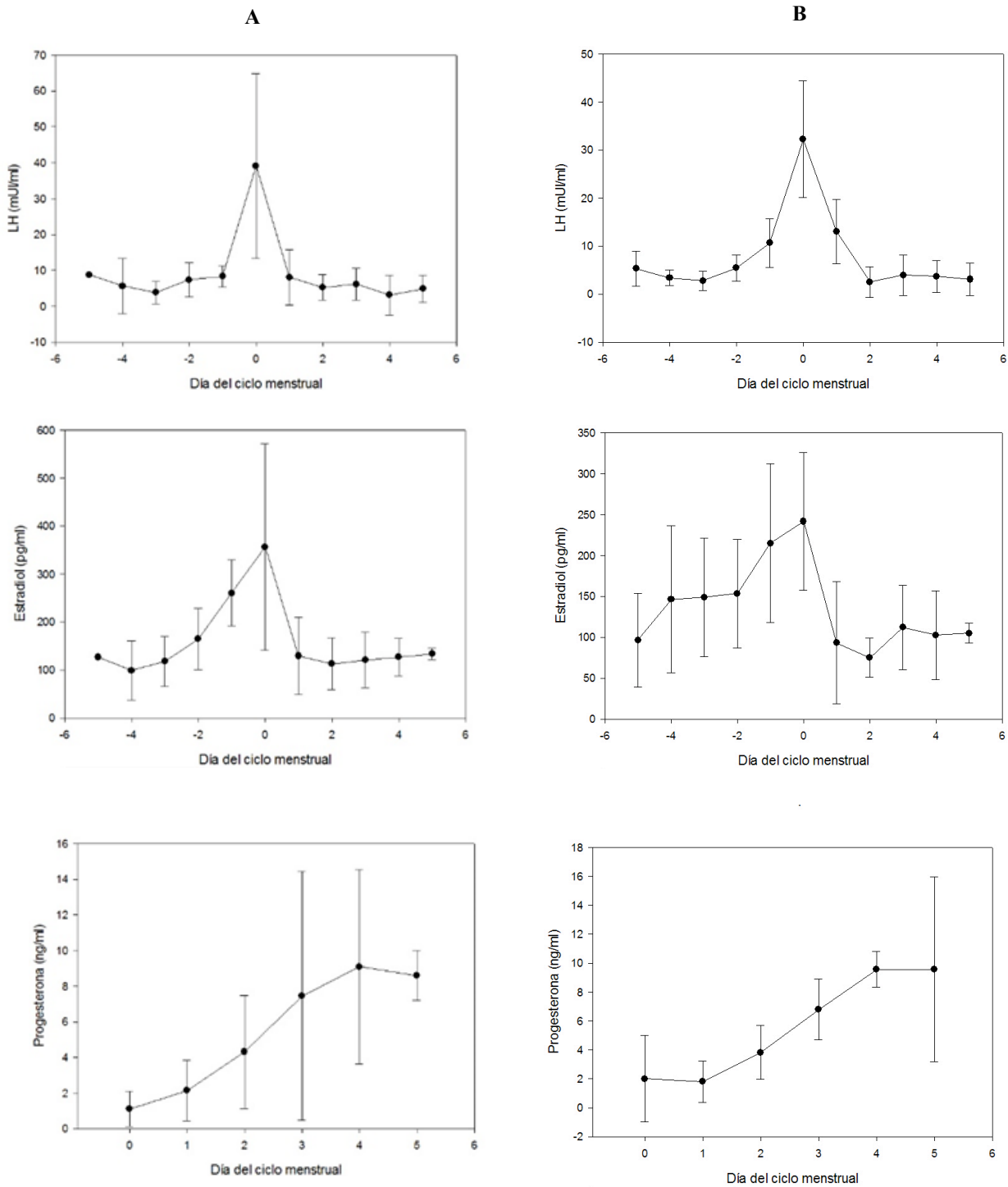


Figura 2. Concentraciones circulantes en suero de LH, E₂ y P₄ durante un ciclo control (A) y tratado con MFP (B). Ver material y métodos para detalles.

Perfil de expresión génica diferencial en tejido endometrial de mujeres tratadas con LNG y MFP

Con la finalidad de determinar los efectos de LNG y MFP sobre la expresión genómica en tejido endometrial, se utilizaron 20 microarreglos, C-LH+7 (10), T-LNG (5) y T-MFP (5). El análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado mostró la identificación de dos grupos bien definidos correspondientes a los contrastes T-LNG vs C-LH+7 y T-MFP vs C-LH+7. En el primer grupo, 1223 genes mostraron expresión diferencial representados por 599 (48.98%) genes sobreexpresados y 624 (51.02%) subexpresados. El grupo T-MFP vs C-LH+7 mostró 2334 genes diferencialmente expresados; 1051 (45.03%) sobreexpresados y 1283 (54.97%) subexpresados. En ambas condiciones el cambio de 1.3 veces en la tasa de expresión génica y un valor de $p < 0.05$ fue utilizado para la selección de los genes diferencialmente expresados. En las Tablas 5 y 6 se muestran los 10 genes con mayor tasa de sobreexpresión y subexpresión diferencial en ambos grupos, respectivamente. La direccionalidad de la expresión de varios de estos genes en los microarreglos fue confirmada por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Tabla 5. Lista de los genes con mayor expresión diferencial en T- LNG vs C-LH+7.

Gen	Denominación del Gen	VC	p
Hyaluronan binding protein 2	<i>HABP2</i>	5.20	1.59E-04
Glutathione peroxidase 3	<i>GPX3</i>	3.65	1.53E-03
Aldehyde oxidase 1	<i>AOX1</i>	2.69	7.05E-03
C-type lectin domain family 4 member E	<i>CLEC4E</i>	2.66	1.57E-03
Complement component 4 binding protein alpha	<i>C4BPA</i>	2.64	3.68E-03
Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5	<i>CYP3A5</i>	2.58	1.34E-02
Adhesion G protein-coupled receptor F1	<i>ADGRF1</i>	2.57	3.59E-02
Dipeptidyl peptidase 4	<i>DPP4</i>	2.57	3.17E-02
Cation channel sperm associated auxiliary subunit beta	<i>CATSPERB</i>	2.55	4.03E-04
Adrenoceptor alpha 2A	<i>ADRA2A</i>	2.51	6.40E-03
Matrix metalloproteinase 26	<i>MMP26</i>	- 5.90	4.34E-02

Sulfotransferase family 1E member 1	<i>SULT1E1</i>	- 5.54	1.21E-04
Calpain 6	<i>CAPN6</i>	- 5.17	9.55E-04
Tissue factor pathway inhibitor 2	<i>TFPI2</i>	- 4.79	7.22E-03
PKHD1 like 1	<i>PKHD1L1</i>	- 4.50	1.10E-03
Opiorphin prepropeptide	<i>PROL1</i>	- 4.50	2.27E-02
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 6	<i>TRPM6</i>	- 5.47	4.83E-03
Serpin family B member 9	<i>SERPINB9</i>	- 4.32	2.28E-04
Cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1	<i>CYP26A1</i>	- 4.32	2.59E-02
Solute carrier family 37 member 2	<i>SLC37A2</i>	- 4.29	8.92E-03
VC: Veces de cambio			
Valores negativos significan subexpresión			

Tabla 6. Lista de los genes con mayor expresión diferencial en T-MFP vs C- LH+7.

Gen	Denominación del Gen	VC	p
Thyrotropin releasing hormone	<i>TRH</i>	7.31	1.36E-07
Solute carrier family 47 member 1	<i>SLC47A1</i>	6.15	3.91E-03
Solute carrier family 14 member 1 (Kidd blood group)	<i>SLC14A1</i>	6.10	2.93E-02
SAM pointed domain containing ETS transcription factor	<i>SPDEF</i>	5.54	3.78E-03
ADCYAP receptor type I	<i>ADCYAP1R1</i>	5.28	1.28E-04
Oviductal glycoprotein 1	<i>OVGP1</i>	5.24	1.20E-02
Neuronal PAS domain protein 3	<i>NPAS3</i>	4.53	1.01E-02
Secreted frizzled related protein 4	<i>SFRP4</i>	3.76	9.02E-04
Rho GTPase activating protein 26	<i>ARHGAP26</i>	3.60	2.41E-04
Interleukin 17 receptor B	<i>IL17RB</i>	3.48	2.73E-02
Metallothionein 1G	<i>MT1G</i>	- 71.01	1.37E-05
Metallothionein 1H	<i>MT1H</i>	- 49.18	1.42E-04
Secretoglobin family 1D member 4	<i>SCGB1D4</i>	- 42.52	2.68E-05
Metallothionein 1M	<i>MT1M</i>	- 32.67	7.08E-05
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	<i>ENPP3</i>	- 22.32	1.57E-04
Cysteine rich secretory protein 3	<i>CRISP3</i>	- 21.71	2.47E-04
Indoleamine 2,3-dioxygenase 2	<i>IDO2</i>	- 17.15	4.11E-05
Metallothionein 1F	<i>MT1F</i>	- 15.14	1.24E-04
Cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1	<i>CYP26A1</i>	- 13.09	1.81E-03
Progesteragen associated endometrial protein	<i>PAEP</i>	- 13.00	7.06E-03

VC: Veces de cambio

Valores negativos significan subexpresión

Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados

Con la finalidad de identificar los procesos biológicos (PB) asociados con receptividad endometrial, se llevó a cabo análisis por ontología génica (OG) de los genes que mostraron expresión diferencial de acuerdo con los parámetros establecidos. Este análisis, realizado con la lista de los 1223 y 2334 genes

diferencialmente expresados en el endometrio de los grupos T-LNG vs LH+7 y T-MFP vs LH+7, mostró 333 y 1763 PB sobrerrepresentados, respectivamente. En las Tablas 7 y 8 se muestran los PB con mayor sobrerrepresentación y asociados con el objetivo de este estudio. El proceso biológico “desarrollo embrionario “in utero” mostro, en ambos grupos tratados, junto con “embarazo femenino”, mayor significancia estadística. Por otra parte, otros términos de OG asociados significativamente con receptividad endometrial, tales como la regulación de IL-6, curación de heridas y el remodelamiento de tejidos y vasos sanguíneos fueron identificados dentro de los principales PB en el grupo T-LNG. Además, la respuesta inflamatoria también fue identificada con alta significancia estadística asociada con receptividad endometrial en el grupo T-MFP, de manera similar a lo observado con acetato de ulipristal, un modulador selectivo del receptor de progesterona con actividad antagonista, en un estudio previo publicado por nuestro laboratorio (12).

Los resultados del análisis por ingenuidad de vías (IPA) de la lista de genes diferencialmente expresados en el grupo T-LNG vs LH+7 no mostro cambios significativos en las vías canónicas asociadas con receptividad endometrial lo que sugiere que el grupo T-LNG no difiere de manera significativa con el grupo C-LH+7. Este análisis en el grupo T-MFP vs LH+7, resultó en la identificación de varias vías canónicas asociadas con receptividad endometrial tales como la de las integrinas, endotelina-1, quimiocinas, VEGF, Il-6, prolactina y STAT 3 entre otras (Tabla 7). Estos resultados se correlacionan con la BP “respuesta inflamatoria” un

término de OG altamente asociado con las vías canónicas identificadas en el grupo T-MFP.

Tabla 7. Procesos biológicos (BP) identificados en biopsias endometriales del grupo T-LNG vs C-LH+7

GO ID	BP	log10 p-value	Genes
0001701	<i>in utero</i> embryonic development	-12.29	<i>USP9X, SNAI1, NLRP5, NLE1, BRD4, IHH, WDR74, ELL, COL4A3BP, LIF, NRK, EDNRA, TTPA, SRF, ITGA4, EPAS1, APBA2, HEY1, HEY2, KRT19, LIG4, TEAD4</i>
0044706	Multi-multicellular organism process	-11.41	<i>MBD2, KLK14, SULT1E1, PCSK5, DSG2, NLRP5, CD55, TFCP2L1, ACR, IHH, RAMP2, LIF, NRK, ADRA2A, EDNRA, PSG9, HPGD, TEAD4</i>
0098656	Anion transmembrane transport	-11.14	<i>SLC7A10, SLC35B1, ANO10, TTYH2, SLC26A1, SLC26A7, SLC22A4, CD36, SLC20A1, GABRA3, PRKAG2, CPT1A, CLCN5, SLC12A2, SLC12A3, SLC12A9, SLC16A7, ADAMTS8, ANKH, SLC43A1, SLC7A1</i>
0015850	Organic hydroxy compound transport	-10.00	<i>LDLRAP1, ABCA1, ABCA5, ABCG1, NOS1, SLC22A4, ABCA12, CD36, SELM, PRKAG2, CPT1A, CHRNA6, PPARG, ADRA2A, SLC16A7, AGTR2, LDLR</i>
0072593	Reactive oxygen species metabolic process	-9.63	<i>NRROS, DDIT4, NQO1, CD36, RIPK3, DUOXA1, GPX3, NNT, PAX2, XDH, AOX1, PDK4, DUOX1, BIRC3, FBLN5, GADD45A</i>
0043270	Positive regulation of ion transport	-9.57	<i>EDN3, NEDD4L, WFS1, KCNJ2, F2RL3, NOS1, ADRA2A, EDNRA, ANK3, MAP2K6, PKP2, CNKSR3, TRPC6, CYP4F2, HBP1, PRELID1</i>
0003002	Regionalization	-9.49	<i>IRX3, SF3B1, PCSK5, TULP3, CYP26A1, MLLT3, CHRD, SNAI1, COBL, SOX1, PRKACB, SEMA3C, PAX2, SRF, DISP1, FOXB1, HEY1, HEY2, LRP4</i>
0009612	Response to mechanical stimulus	-9.35	<i>KCNJ2, SLITRK6, ETV1, NTRK2, PPARG, SLC12A2, ATP1A1, PAX2, EDNRA, TLR5, PSPH, STRBP, TXNIP, INHBB, GADD45A</i>
0015718	Monocarboxylic acid transport	-9.19	<i>PLA2G4A, PLA2G4F, SLC27A2, SLC22A4, CD36, PLIN2, PRKAG2, CPT1A, PPARG, SLC16A7, SLC16A6, MAP2K6, AGTR2, CYP4F2</i>
0055067	Monovalent inorganic cation homeostasis	-9.02	<i>NEDD4L, KCNJ2, CLN6, SCNN1A, CA2, ATP6V1H, ATP1A1, TTPA, PDK4, AGTR2, CYP4F2, SLC9A2</i>
0015908	Fatty acid transport	-8.85	<i>PLA2G4A, PLA2G4F, SLC27A2, CD36, PLIN2, PRKAG2, CPT1A, PPARG, MAP2K6, AGTR2, CYP4F2</i>
0032675	Regulation of interleukin-6 production	-8.69	<i>IL36B, ARRB1, CD36, RIPK2, TNFAIP3, NLRP12, TLR1, TLR6, BANK1, MAPKAPK2, PRG4</i>
0048771	Tissue remodeling	-7.43	<i>MC4R, IL20RA, TNFAIP3, IHH, CA2, SEMA3C, LIF, ITGA4, EPAS1, PDK4, TGM2, AGTR2</i>
0043297	Apical junction assembly	-7.17	<i>PARD6B, NEDD4L, DLG5, SNAI1, OCLN, RAMP2, SRF, PKP2, INADL</i>

0001890	Placenta development	-6.96	<i>SNAI1, PPARG, LIF, NRK, TTPA, ITGB8, ITGA4, EPAS1, HEY1, HEY2, KRT19</i>
0007565	Female pregnancy	-6.84	<i>SULT1E1, PCSK5, DSG2, NLRP5, TFCP2L1, IHH, RAMP2, LIF, ADRA2A, PSG9, HPGD, TEAD4</i>
0016072	rRNA metabolic process	-6.21	<i>NUDT16, GEMIN4, RRP9, NOP2, NOL6, RPS19, RPS28, PES1, UTP20, RRP1B, NOP14</i>
0050886	Endocrine process	-6.05	<i>EDN3, EDN2, PCSK5, INHA, AVPR1B, SELM, AGTR2, INHBB</i>
0051098	Regulation of binding	-5.98	<i>BTAF1, WFIKKN1, DPH3, LDLRAP1, ARRB1, BRD4, HERPUD1, TFAP4, ITGA4, HMGB2, BAMBI, HEY1, HEY2, IFIT2</i>
0002683	Negative regulation of immune system process	-5.94	<i>INHA, MERTK, RPS19, CD55, TNFAIP3, PTPRJ, IHH, SERPING1, TRIM27, BANK1, HTRA1, IFNA2, C4BPA, HLA-DOB</i>
0002790	Peptide secretion	-5.91	<i>MC4R, EDN3, ABCA1, ARRB1, PRKACB, EPHA5, CPT1A, STXBP3, SYBU, PASK, ADRA2A, PCLO, INHBB, CACNA1C</i>
0034614	Cellular response to reactive oxygen species	-5.90	<i>ZNF580, NQO1, CD36, TNFAIP3, GPX3, PAX2, OSER1, DUOX1, TRPC6, FBLN5</i>
0061041	Regulation of wound healing	-5.78	<i>KLKB1, DMTN, PROS1, CD36, TNFAIP3, PTPRJ, TSPAN8, ADRA2A, SERPING1, CYP4F2</i>
0001974	Blood vessel remodeling	-5.75	<i>SEMA3C, LIF, ITGA4, EPAS1, TGM2, AGTR2</i>
0030217	T cell differentiation	-5.73	<i>MPZL2, IL36B, IL23R, RIPK3, RIPK2, IHH, SRF, SLC46A2, HLA-DQA1, LIG4, IFNA2, PRELID1</i>
0070482	Response to oxygen levels	-5.71	<i>DDIT4, DPP4, NR4A2, LIMD1, NOS1, SDC2, RAMP2, HIF3A, PPARG, EDNRA, SRF, EPAS1, TRPC6, APOLD1</i>
0003158	Endothelium development	-5.61	<i>SCUBE1, DMD, RDX, XDH, HEY1, HEY2, SLC40A1, APOLD1, HAPLN2</i>
0045446	Endothelial cell differentiation	-5.60	<i>SCUBE1, DMD, RDX, XDH, HEY1, HEY2, APOLD1, HAPLN2</i>
0048762	Mesenchymal cell differentiation	-5.59	<i>EDN3, CYP26A1, LDLRAD4, SNAI1, SEMA3C, HNRNPAB, PAX2, EDNRA, BAMBI, HEY1, HEY2</i>
0055088	Lipid homeostasis	-5.46	<i>LDLRAP1, ABCA1, ABCG1, ABCA12, COL4A3BP, PPARG, TMEM97, PKP2, LDLR</i>

GO ID = Ontología génica código de identificación.

Tabla 8. Procesos biológicos (BP) identificados en biopsias endometriales del grupo T-MFP vs C-LH+7

GO ID	BP	log10 p-value	Genes
0097305	Response to alcohol	-38.04	<i>CDKN1A, FBXO32, IL15, SLC34A2, CRYAB, PRKCE, RORC, ANXA1, STAT3, JUNB, ARNT2, ABCA1, UNC79, CCND1, NQO1, CD14, SOCS2, SPP1, ESR1, STAR, STC1, NCOR2, H2AFZ, GGH, TFF1, FYN, IHH, IGFBP2, APOE, AQP3, RAMP2, GPX1, OXCT1, JUP, PTCH1, SLIT3, TFAP4, TK1, TRH, ITGB1, TP53INP1, SERPINF1, SERPINA1, GPER1, HMGCR, MAOB, CSF2RA, ADCY7, AGTR2, PLAT, FOSL2, LRP8, TNFRSF1A</i>
0001701	<i>in utero</i>	-32.79	<i>SLC30A1, AR, XRCC2, SLC34A2, HS6ST1, MSX1,</i>

	embryonic development		<i>MYH9, E2F7, E2F8, VEGFA, ZFP42, HAND2, NEK2, JUNB, ARNT2, NFE2, CCNB1, SOX17, SRSF1, SBDS, NMT1, NOS3, FLVCR1, CCM2, CITED2, HORMAD1, OVOL2, STK3, NCOR2, ADM, PTPRR, GRN, IHH, B9D1, ARNT, PTCH1, NDEL1, ANGPT1, TTPA, ADAM10, ITGB1, ITGA4, TPM1, GATA6, GATA4, FZD5, ZMIZ1, DUSP3, UBE2B, RPGRIP1L, ACVR1, SLC8A1</i>
0010038	Response to metal ion	-26.49	<i>MDM2, SLC30A1, ECT2, KCNMB2, MTF1, MTL5, MT1A, MT1E, MT1H, MT1G, MT1F, MT1M, MT1X, MT2A, MEF2A, DPEP1, PDCD6, JUNB, JUND, CCND1, CCNB1, CD14, RYR3, ITPR3, STAR, B2M, GGH, TFF1, IGFBP2, BSG, AQP3, ANXA11, MBP, FSTL3, SPHK1, TK1, SERPINF1, SERPINA1, NDRG1, BNIP3, MAOB, ADCY1, CAPN3, TNFRSF11B, WNT5A</i>
0044706	Multi-multicellular organism process	-26.11	<i>AR, SULT1E1, OVGP1, IDO1, DRD5, JUNB, SFRP4, CD55, CITED2, SPP1, ESR1, STC1, PPP1R1B, ADM, HFE, GRN, IHH, IGFBP2, BSG, RAMP2, CLDN4, PGR, PTHLH, NPAS3, PAPP, ADRA2C, SPHK1, RXFP1, KLF9, TK1, APOL2, ITGB1, ADCY7, PRLR, UCP2, STOX2, FOSL2, LAMB1, NAMPT</i>
0007565	Female pregnancy	-22.75	<i>AR, SULT1E1, OVGP1, IDO1, JUNB, SFRP4, CITED2, SPP1, ESR1, STC1, ADM, HFE, GRN, IHH, IGFBP2, BSG, RAMP2, CLDN4, PGR, PTHLH, PAPP, ADRA2C, SPHK1, KLF9, APOL2, ITGB1, ADCY7, PRLR, UCP2, STOX2, FOSL2, LAMB1, NAMPT</i>
0070482	Response to oxygen levels	-21.99	<i>MDM2, CDKN1A, CRYAB, PRKCE, MYOCD, VEGFA, ARNT2, NR4A2, CCNB1, MTHFR, NOX4, NPEPPS, CITED2, ITPR1, STC1, ADM, CAT, RAMP2, ARNT, SLC2A8, HIF3A, ATP1B1, HIGD1A, TRH, SERPINA1, GATA6, NDRG1, BNIP3, PDK1, CYB5R4, PLAT, PLAU, FOXO1, UCP2, ALAS2, UBE2B, ACTN4, TNFRSF1A, TCEB1, LPAR1</i>
0050727	Regulation of inflammatory response	-21.31	<i>C7, C2, IL15, PTGER3, PRKCA, PROS1, IDO1, ZFP36, MYD88, TLR10, RPS19, CD55, BCL6, CCL24, TNFAIP3, SBNO2, APOD, APOE, DUOXA1, PBK, GPX1, OSMR, KLF4, ZYX, EDNRB, NLRP12, SERPINE1, SERPING1, SERPINF1, GPER1, ANKRD42, TLR3, TLR4, BIRC3, BIRC2, CASP4, WNT5A, TNFRSF1A, C4BPA, SLC7A2, CALCRL</i>
0042593	Glucose homeostasis	-20.83	<i>IRS2, INSR, STXBP5L, PRKCE, TCF7L2, STAT3, ARRB1, NOX4, STAR, NCOR2, OXCT1, PTCH1, MET, MCU, TMEM27, NMB, SLC16A1, SERPINF1, GATA4, GPER1, ANKRD26, HMGCR, PDK4, BIRC5, CYB5R4, FOXO1, PLS3, POMC, UCP2, PYGL, SIDT2, ERO1LB</i>
0043409	Negative regulation of MAPK cascade	-20.17	<i>MAPK8IP1, PRKCA, RGS4, VRK3, TAOK3, SFRP4, CBLC, HIPK3, PTPRJ, PTPRR, APOE, PBK, MYC, PAQR3, KLF4, NLRP12, RPS6KA6, ANKRD26, TLR4, AIDA, HMGCR, FOXO1, FOXM1, SMPD1, DUSP3, DUSP2, DUSP6, C3orf33, DUSP18, DUSP19, DUSP21</i>
0043627	Response to estrogen	-19.99	<i>MDM2, SLC34A2, CRYAB, ANXA1, STAT3, ARNT2, CCND1, NQO1, CITED2, SOCS2, ESR1, STAR, NCOR2, H2AFZ, TFF1, GAL, IHH, IGFBP2, RAMP2, ARSB, GPX1, PTCH1, SERPINA1, SERPINB9, GATA6, GATA4, GPER1, TNFRSF11B, TNFRSF1A</i>
0003018	Vascular process in circulatory	-19.56	<i>P2RY1, EDN3, ASIC2, KCNMB2, KCNJ8, VEGFA, DRD5, NOS3, NPR1, ACE, ADM, PTPRJ, PTPRM, EPHX2, APOE, RAMP2, GCLM, ARHGAP35, GPX1,</i>

	system		<i>ANGPT1, ADRA2C, EDNRB, GPER1, GUCY1A3, PER2, HMGCR, AGTR2, HRH1, SLC8A1</i>
0001666	Response to hypoxia	-19.43	<i>MDM2, CRYAB, PRKCE, MYOCD, VEGFA, ARNT2, NR4A2, CCNB1, MTHFR, NOX4, NPEPPS, CITED2, ITPR1, STC1, ADM, CAT, RAMP2, ARNT, SLC2A8, HIF3A, ATP1B1, HIGD1A, TRH, SERPINA1, GATA6, NDRG1, BNIP3, PDK1, PLAT, PLAU, UCP2, ALAS2, UBE2B, ACTN4, TNFRSF1A, TCEB1</i>
0045926	Negative regulation of growth	-19.19	<i>EAF2, CDKN1A, CRYAB, MSX1, MT1A, MT1E, MT1H, MT1G, MT1F, MT1M, MT1X, MT2A, RAI1, MYD88, JADE1, TCF7L2, SCGB3A1, RERG, SOX17, NPR1, CD36, NTN1, ENO1, BCL6, SPP1, STK3, GAL, PTPRJ, PTCH1, SLIT3, BDKRB1, ANKRD26, AGTR2, PLXNA3, ENPP1, WNT5A, LGMN</i>
0070661	Leukocyte proliferation	-18.43	<i>IRF1, IRS2, CDKN1A, MND A, IL15, HELLS, IDO1, MYD88, ERBB2, NCK1, CCND3, VTCN1, CD55, FLT3, RIPK3, CBLB, BCL6, TNFAIP3, ACE, ADK, AHR, GAL, FYN, IHH, IL7, IGFBP2, CLCF1, VSIG4, PNP, LGALS3, TLR4, FOXJ1, TNFRSF14, TNFRSF21, IFNA4, H-LAG, HLA-DMB</i>
0045765	Regulation of angiogenesis	-18.05	<i>DDAH1, PRKCA, CHI3L1, PROK1, VEGFA, EFNA1, ERBB2, PDCD6, STAB1, RRAS, NOS3, FGF1, NPR1, THBS2, HTATIP2, CCL24, TNFAIP3, ADM, PTPRM, HGF, CXCL13, ID1, RAMP2, SPHK1, KLF4, SERPINE1, SERPINF1, GATA6, GATA4, HDAC5, SULF1, WNT5A, TNFRSF1A</i>
0001101	Response to acid chemical	-17.60	<i>MDM2, ASIC2, BRINP1, CYP26A1, DKK1, RORB, ABCA1, CCNB1, MTHFR, DNMT1, IGFBP2, CPT1A, APOE, ATP6V0E1, AQP3, GPX1, SLC10A3, OSR1, PTCH1, MBP, ATP2B4, ZEB1, TWF2, KLF4, PID1, SERPINF1, SERPINA1, GATA4, PDK4, FZD4, UCP2, WNT5A, TNFRSF1A, COL18A1</i>
0031099	Regeneration	-17.56	<i>CDKN1A, CCND1, CCNB1, NNMT, FLT3, BCL9, SPP1, BIN3, ADM, HGF, PTPN3, EPHA4, APOD, APOE, GPX1, NDEL1, RTN4RL1, CFLAR, UCP2, CAPN3, MAPK14, LPIN1, CSPG5</i>
0051384	Response to glucocorticoid	-17.49	<i>CDKN1A, FBXO32, ANXA1, JUNB, CCND1, FLT3, STAR, STC1, ADM, IGFBP2, AKAP13, PTGDS, SLIT3, MDK, TFAP4, TK1, TRH, SERPINF1, MAOB, AGTR2, PLAT, FOSL2, ACVR1</i>
0002790	Peptide secretion	-17.16	<i>IRS2, EDN3, STXBP5L, PRKCA, PRKCE, TCF7L2, ANXA1, ABCA1, ABCC8, ARRB1, GLUD1, ITPR3, ITPR1, PRKACB, GAL, CPT1A, STXBP1, STXBP3, OXCT1, MCU, TMEM27, ADRA2C, SLC16A1, TRH, RAP1B, GPER1, PER2, HMGCR, BIRC5, CYB5R4, UCP2, LTBP4, SIDT2, PRKAR1B, HADH</i>
0071496	Cellular response to external stimulus	-17.13	<i>MDM2, IRF1, CDKN1A, IL15, LZTS1, MYOCD, DSC2, MYD88, TCF7L2, NR4A2, ATG16L1, GABARAPL1, WDFY3, HFE, RAB23, HIGD1A, SPHK1, ITGB1, ITGA6, TP53INP2, TLR3, TLR4, BNIP3, MAP1LC3B, PDK4, FOXO1, IFT88, UCP2, KIAA1324, PSEN1, ATG9B, ATG13, TNFRSF1A, GADD45A, LDHA, UPP1</i>
0002683	Negative regulation of immune system process	-16.73	<i>IRF1, MND A, IDO1, ERBB2, STAT6, VTCN1, RPS19, CD55, FLT3, CBLB, BCL6, NRARP, TNFAIP3, GAL, PTPRJ, IHH, APOD, VSIG4, GPX1, LGALS3, SERPING1, GPER1, TRIM38, FOXJ1, DUSP3, TNFRSF14, TNFRSF21, LGR4, C4BPA, HLA-DOB,</i>

			<i>HLA-A, HLA-B, HLA-E, HLA-G</i>
0003002	Regionalization	-16.41	<i>XRCC2, HOXB7, MNS1, CYP26A1, CHRD, MSX1, DKK1, BTG2, NKD1, SOX17, CDON, CITED2, EMX2, NRARP, OVOL2, PRKACB, CELSR1, TCAP, OSR1, PTCH1, RAB23, GLI1, ZBTB16, CXXC4, GATA4, AIDA, FZD5, FOXJ1, HES7, IFT88, PSEN1, DUSP6, WNT5A, RPGRIP1L, ACVR1</i>
0009896	Positive regulation of catabolic process	-16.14	<i>MDM2, IRS2, ZC3HAV1, INSR, PRKCE, ENTPD5, TBC1D30, ZFP36, BTG2, NKD1, SOX17, PNPLA2, CBLB, USP6NL, SNX9, TNFAIP3, SH3D19, WDFY3, CPT1A, APOE, ARNT, ATP1B1, SVIP, TP53INP2, TOB1, TP53INP1, BNIP3, FOXO1, PLK1, PSEN1, WNT5A, PCAT1, C4BPA</i>
0072593	Reactive oxygen species metabolic process	-15.85	<i>CDKN1A, PREX1, PRDX1, CRYAB, DRD5, NOX4, NQO1, CD36, RIPK3, EPHX2, CAT, DUOXA1, GPX1, XDH, PID1, BNIP3, PDK4, MAOB, DUOX1, BIRC3, CYB5R4, FOXO1, FOXM1, PXDN, MAPK14, GADD45A, NDUFS4, NFE2L2</i>
0006575	Cellular modified amino acid metabolic process	-15.62	<i>PLA2G16, DDAH1, IDO2, IDO1, DPEP1, VNN1, MTHFR, MTHFD1, MTHFD2, FASN, NOX4, ALDH5A1, OCLN, GCNT4, RIMKLB, GSR, SLC5A6, APIP, CBS, CKM, DUOXA1, GCLM, GSTA1, PLA1A, GPX1, KMO, ATP2B4, SERINC5, SERINC1, P4HA1, ETHE1, DUOX1, MGST1, ERO1LB</i>
1901617	Organic hydroxy compound biosynthetic process	-14.77	<i>P2RY1, HAND2, NR4A2, ABCG1, SEC14L2, FGF1, STAR, ACER3, APOE, EBP, PHOSPHO1, TYR, TPH1, GPER1, PER2, HMGCR, INSIG1, DHCR7, AGTR2, CYB5R1, CYB5R2, PSAT1, HRH1, SLC44A1, SLC44A2, AGPAT6, LPIN1, LPIN3, PCAT1, DHCR24</i>
0032355	Response to estradiol	-14.60	<i>SLC34A2, CRYAB, ANXA1, STAT3, ARNT2, NQO1, SOCS2, ESR1, NCOR2, H2AFZ, TFF1, IHH, IGFBP2, RAMP2, GPX1, PTCH1, SERPINA1, GPER1, TNFRSF1A</i>
0090068	Positive regulation of cell cycle process	-14.58	<i>MDM2, TMOD3, CDKN1A, EDN3, RHNO1, ECT2, RAD51C, INSR, NUDT16, PRKCE, MSX1, E2F7, E2F8, ANXA1, CCND1, CDC6, SMC5, PIWIL2, NEUROG1, TRIAP1, GTSE1, GATA6, NDRG1, BIRC5, PSMB8, PSMB9, PSMC1, PSME1, PKP4, PLK1, NUSAP1, UBE2B, WNT5A</i>
0010631	Epithelial cell migration	-14.42	<i>BCAR1, PRKCA, PRKCE, MYH9, VEGFA, EFNA1, PDCD6, NOS3, FGF7, MARVELD3, STC1, MACF1, PIK3CA, PTPRM, PTPRR, CXCL13, ID1, APOE, GPX1, MET, ANGPT1, SH3BGRL3, KLF4, ITGB1, SERPINF1, HDAC5, AGTR2, PRKX, WNT5A</i>
0044106	Cellular amine metabolic process	-14.39	<i>PLA2G16, IDO2, IDO1, NR4A2, SAT1, PNPLA8, NQO1, APIP, DUOXA1, KMO, ATP2B4, PHOSPHO1, TRH, APOC1, TPH1, AMD1, MAOA, MAOB, PSMB8, PSMB9, PSMC1, PSME1, SMPDL3B, SMPD1, SLC44A1, SLC44A2, AGPAT6, LPIN1, LPIN3, PCAT1</i>

GO ID = Ontología génica código de identificación. Las flechas indican la direccionalidad de la expresión génica.

El hallazgo de que “embarazo femenino” fue uno de los PB derivados del análisis de OG más sobrerrepresentados tanto en el grupo T-LNG y T-MFP comparados

con el grupo C-LH+7, se procedió al análisis *in silico* de varias biofunciones asociadas con receptividad endometrial. Este análisis se realizó a través de consultar la base de datos Ingenuity®Knowledge Base utilizando las listas de genes diferencialmente expresados en ambos grupos. En las Figuras 3 y 4 se muestra el análisis de predicción de actividad molecular (MAP) de las biofunciones “decidualización del útero e implantación del embrión y blastocisto”.

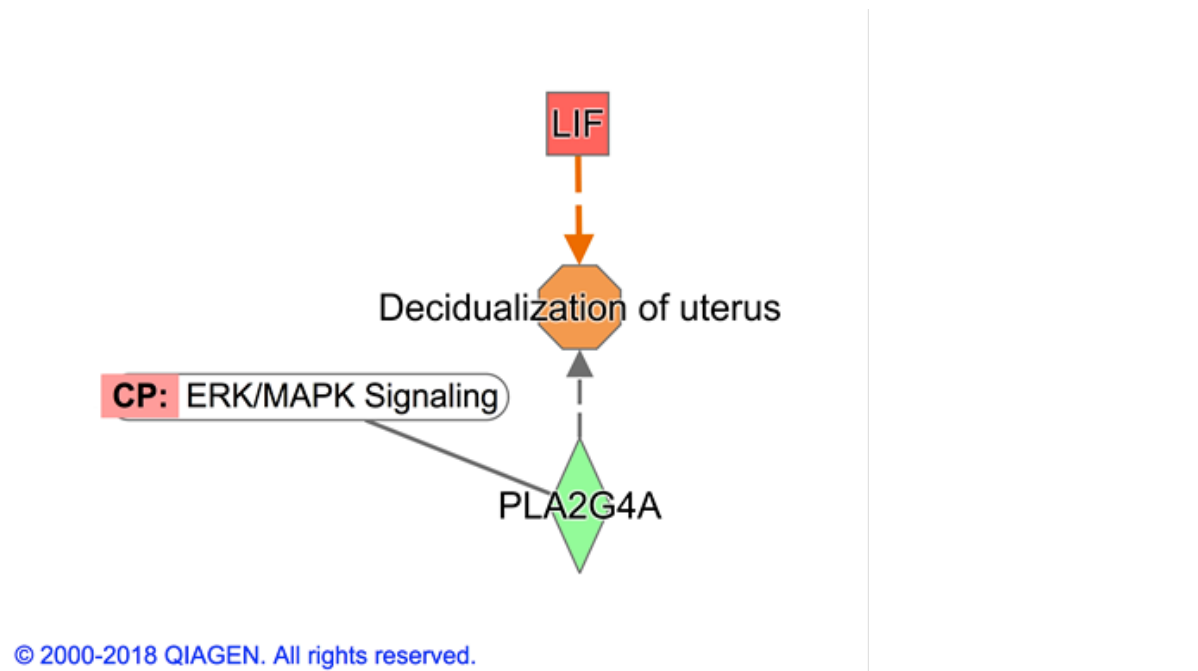
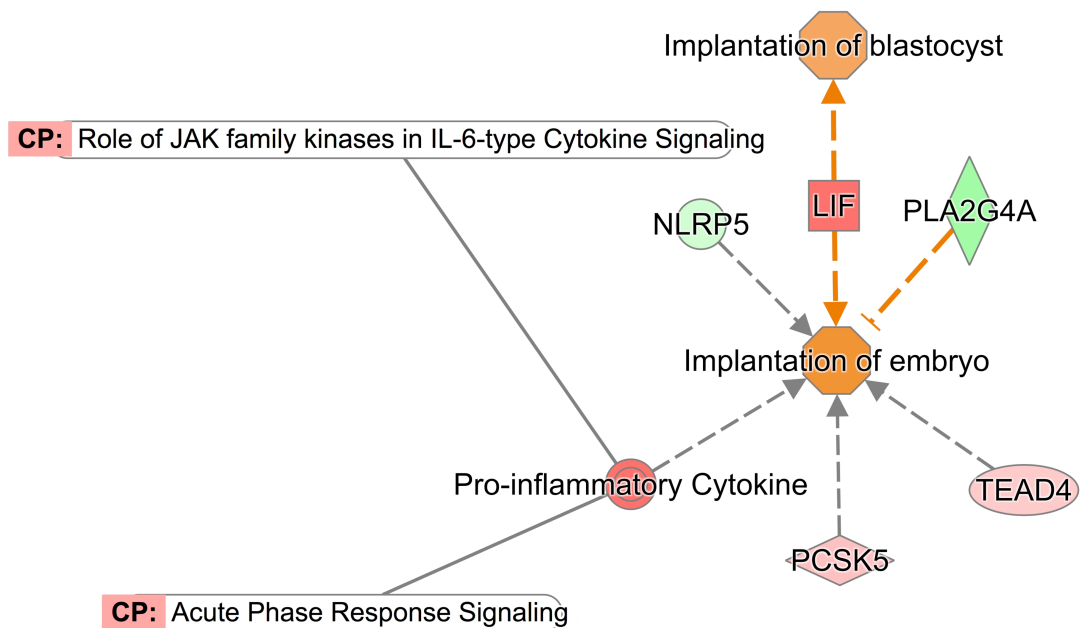


Figura 3. Predicción de la actividad molecular de la función biológica decidualización del útero utilizando la lista de genes diferencialmente expresados en biopsias endometriales del grupo T-LNG vs C-LH+7 en LH + 7. La señalización ERK / MAPK es una vía canónica (CP) involucrada en el proceso de decidualización. Los colores indican las relaciones predichas en las tasas de expresión génica y de las funciones biológicas: Verde: genes regulados a la baja; Rojo: genes regulados al alza; Naranja: biofunción activada; Línea naranja: conduce a la activación; Línea gris: efecto no predicho; Líneas grises sólidas: gen asociado con CP (<http://ingenuity.com>). Intensidad de color significa el grado de expresión génica o actividad de la biofunción.

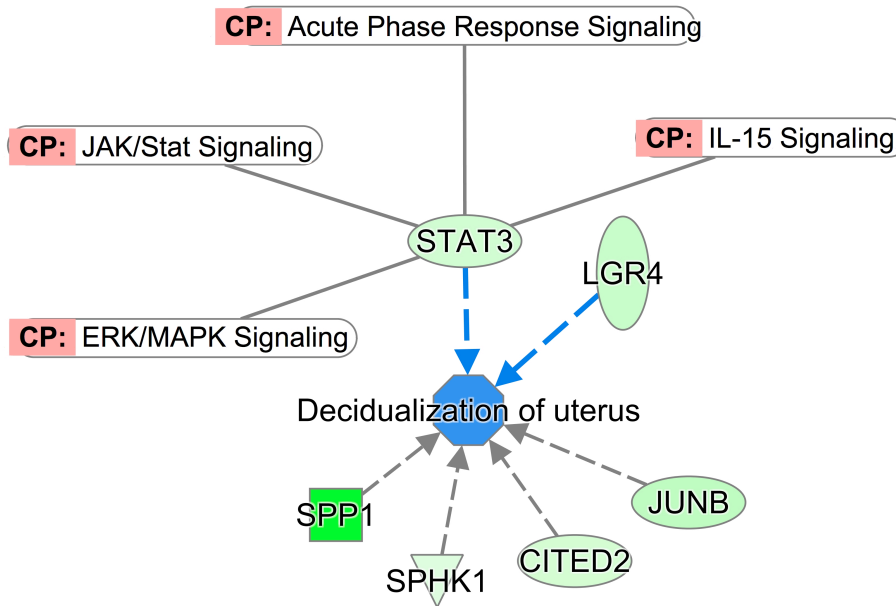


© 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 4. Predicción de la actividad molecular de las funciones biológicas implantación del embrión y del blastocisto utilizando la lista de genes diferencialmente expresados en las biopsias endometriales del grupo T-LNG vs C-LH+7. Las vías canónicas (CP) de la familia de las cinasas JAK en la vía de señalización de citocinas tipo IL-6, incluyendo las vías de respuesta de fase aguda son las vías canónicas identificadas en estas biofunciones. Los colores indican las relaciones predichas de los niveles de expresión génica y las funciones biológicas: Verde: genes regulados a la baja; Rojo: genes regulados al alza; Naranja: biofunción activada; Línea naranja: conduce a la activación; Línea gris: efecto no predicho; Líneas grises sólidas: gen asociado con CP (<http://ingenuity.com>). Intensidad de color significa el grado de expresión génica o actividad de la biofunción.

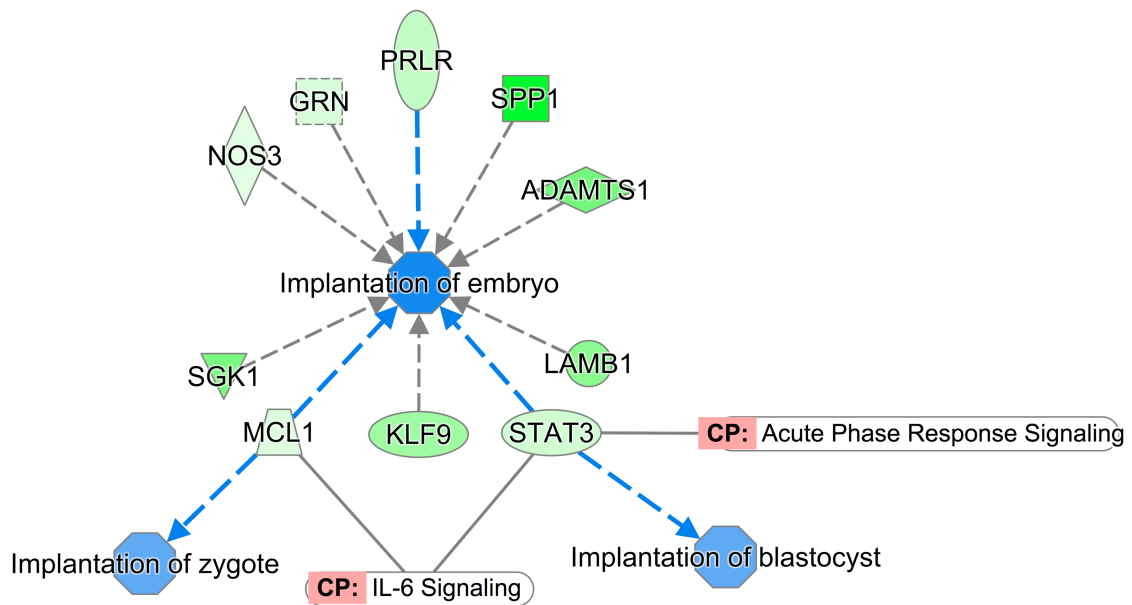
Para el caso del grupo T-LNG vs LH+7, estas tres biofunciones significativamente asociadas con receptividad endometrial y bajo el control principalmente de la expresión de *LIF* (leukemia inhibitory factor) fueron predichas por IPA como activadas, sugiriendo que el patrón de expresión diferencial de genes en el endometrio de mujeres T-LNG durante la fase meso lútea del ciclo menstrual (fase

implantatoria) no difiere de la observada en el grupo C-LH+7. Para el caso del grupo T-MFP vs LH+7, el análisis por MAP de las tres biofunciones fue predicha como inhibida sobre todo por la regulación a la baja de *STAT3* (Figuras 5 y 6).



© 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

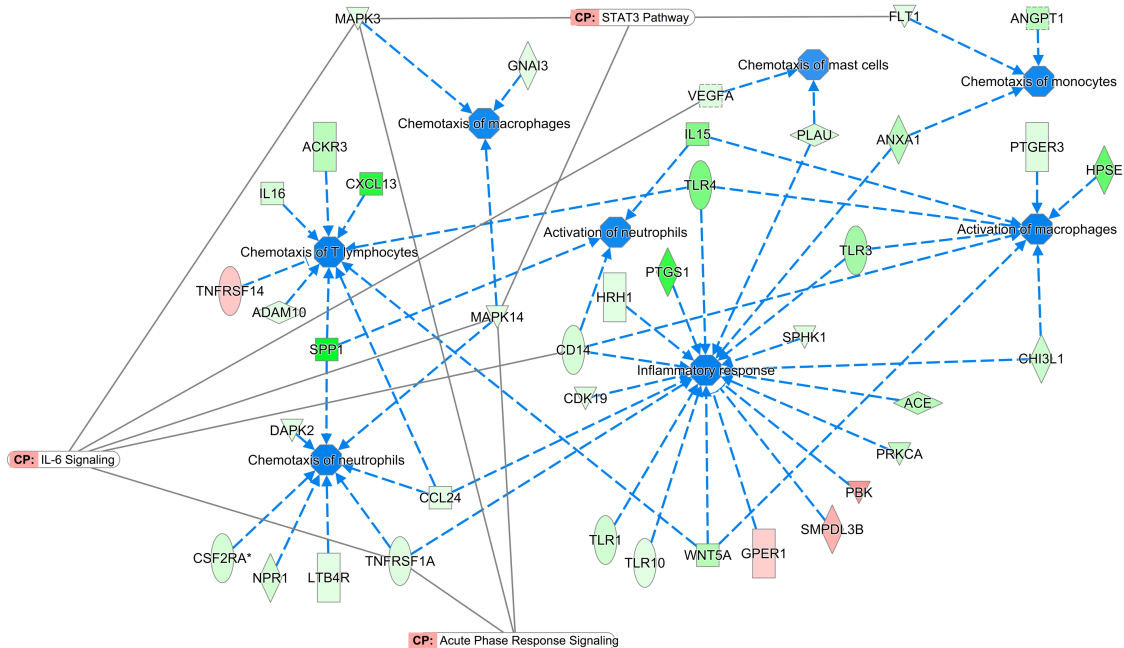
Figura 5. Predicción de la actividad molecular de la función biológica decidualización del útero utilizando la lista de genes diferencialmente expresados en biopsias endometriales del grupo T-MFP vs C-LH+7. La señalización ERK /MAPK, JAK/Stat, IL-15 y la vía de señalización de fase aguda son vías canónicas (CP) involucradas en el proceso de decidualización. Los colores indican las relaciones predichas en las tasas de expresión génica y de las funciones biológicas: Verde: genes regulados a la baja; Rojo: genes regulados al alza; Naranja: biofunción activada; Línea naranja: conduce a la activación; Línea gris: efecto no predicho; Líneas grises sólidas: gen asociado con CP (<http://ingenuity.com>). Intensidad de color significa el grado de expresión génica o actividad de la biofunción.



© 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 6. Predicción de la actividad molecular de las funciones biológicas implantación del embrión y del cigoto utilizando la lista de genes diferencialmente expresados en las biopsias endometriales del grupo T-MFP vs C-LH+7. Las vías IL-6 de la familia de cinasas JAK en la vía de señalización de citocinas tipo IL-6 y la de respuesta de fase aguda son las vías canónicas identificadas en estas biofunciones. Los colores indican las relaciones predichas de los niveles de expresión génica y las funciones biológicas: Verde: genes regulados a la baja; Rojo: genes regulados al alza; Naranja: biofunción activada; Línea naranja: conduce a la activación; Línea gris: efecto no predicho; Líneas grises sólidas: gen asociado con CP (<http://ingenuity.com>). Intensidad de color significa el grado de expresión génica o actividad de la biofunción.

De manera similar, otras biofunciones analizadas tales como “quimiotaxis y la activación de células inmunes, incluyendo las vías canónicas de ERK/MAPK, JAK7Stat, la fase de respuesta aguda, Il-15, IL-6 y la vía de STAT3”, en este grupo, también estas biofunciones fueron predichas como inhibidas (Figura 7).



© 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 7. Predicción de la actividad molecular de las funciones biológicas respuesta inflamatoria y otras biofunciones involucradas en quimiotaxis y activación de células inmunes utilizando la lista de genes diferencialmente expresados en las biopsias endometriales del grupo T-MFP vs C-LH+7. Las vías IL-6 y STAT3 son las vías canónicas involucradas en estas biofunciones. Los colores indican las relaciones predichas de los niveles de expresión génica y las funciones biológicas: Verde: genes regulados a la baja; Rojo: genes regulados al alza; Naranja: biofunción activada; Línea naranja: conduce a la activación; Línea gris: efecto no predicho; Líneas grises sólidas: gen asociado con CP (<http://ingenuity.com>). Intensidad de color significa el grado de expresión génica o actividad de biofunción.

Relevancia biológica de los efectos de LNG y MFP sobre la expresión global del genoma en el endometrio

Con la finalidad de establecer la significancia biológica de los resultados obtenidos en este estudio, se decidió realizar un análisis comparativo a partir de las listas de genes diferencialmente expresados con otras obtenidas en estudios previamente publicados. A este respecto, existe de manera ya estandarizada y con suficiente información en varios estudios clínicos del llamado microarreglo de receptividad

endometrial (ERA; endometrial receptivity array) el cual es ampliamente utilizado en pacientes con infertilidad para establecer la capacidad receptiva del endometrio (19). Los resultados en términos de la expresión de genes en la fase implantatoria de ciclo menstrual utilizando al ERA, fueron comparados con nuestros resultados en los grupos T-LNG vs LH+7 y T-MFP vs LH+7. En la figura 8 se muestran los análisis comparativos observándose las intersecciones en los diagramas de Venn entre las tres listas de genes diferencialmente expresados. En este análisis se muestra que un total de 60 genes de T-LNG vs LH+7 (Figura 6A) y 87 genes de T-MFP vs LH+7 (Figura 8B) fueron comunes con ERA y 21 genes fueron comunes entre las tres listas comparadas (Figura 8C). En la Tabla 9 se muestran los genes diferencialmente expresados y comunes entre T-LNG vs LH+7 con ERA. En este caso, la misma direccionalidad en la expresión se observó en todos los genes comunes. Para el caso de T-MFP, 79 genes de los 89 comunes con ERA mostraron un patrón de expresión opuesto (Tabla 10).

Tabla 9. Comparación de la direccionalidad de la expresión génica de 60 genes comunes diferencialmente expresados en biopsias endometriales del grupo T-LNG vs C-LH+7 con ERA.

Denominación del Gen	Gen	ERA (VC)	LNG (VC)
<i>GPX3</i>	Glutathione peroxidase 3 (plasma)	35.49	3.66
<i>LIF</i>	Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	15.03	2.14
<i>CXCL14</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand	14.02	2.23
<i>C4BPA</i>	Complement component 4 binding protein, alpha	13.14	2.64
<i>TSPAN8</i>	Tetraspanin 8	12.90	1.55
<i>GADD45A</i>	Growth arrest and DNA damage inducible, alpha	8.25	1.69
<i>NNMT</i>	Nicotinamide N-methyltransferase	7.74	1.62
<i>DPP4</i>	Dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	7.72	2.57
<i>S100P</i>	S100 calcium-binding protein P	6.95	1.30
<i>SNX10</i>	Sorting nexin 10	6.56	1.93
<i>CP</i>	Ceruloplasmin (ferroxidase)	6.34	1.64
<i>ADRA2A</i>	Adrenergic, alpha-2A, receptor	5.78	2.50
<i>TAGLN</i>	Transgelin	5.71	1.61

<i>THBS2</i>	Thrombospondin 2	5.17	1.60
<i>SERPING1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary), transcript variant 1	5.16	1.72
<i>AOX1</i>	Aldehyde oxidase 1	4.82	2.69
<i>CYP3A5</i>	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	4.82	2.58
<i>DHRS3</i>	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	4.72	2.08
<i>MYL9</i>	Myosin, light polypeptide 9, regulatory, transcript variant 2	4.72	1.42
<i>HABP2</i>	Hyaluronan-binding protein 2	4.09	5.20
<i>TBC1D2</i>	TBC1 domain family, member 2	4.07	1.26
<i>CDA</i>	Homo sapiens cytidine deaminase (CDA), mRNA [NM_001785]	4.00	1.94
<i>IMPA2</i>	Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2 3.91 2	3.91	1.78
<i>XCL2</i>	Chemokine (C motif) ligand 2	3.73	1.43
<i>CLDN10</i>	Claudin 10, transcript variant 1	3.68	2.06
<i>COTL1</i>	Coactosin-like 1 (Dictyostelium)	3.58	1.52
<i>SYNE2</i>	Spectrin repeat containing, nuclear envelope 2, transcript variant 5	3.52	1.88
<i>PROS1</i>	Homo sapiens protein S (alpha)	3.28	1.45
<i>HLA-DOB</i>	Major histocompatibility complex, class II, DO	-11.06	-2.35
<i>CTNNA2</i>	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 2	-8.02	-2.00
<i>NR4A2</i>	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2, transcript variant 1	-7.05	-2.00
<i>DUOX1</i>	Dual oxidase 1, transcript variant 1	-6.61	-3.05
<i>LRP4</i>	Low density lipoprotein receptor-related protein 4	-5.87	-1.37
<i>SLC16A6</i>	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6	-5.61	-2.14
<i>EDN3</i>	Endothelin 3, transcript variant 3	-5.30	-1.45
<i>ANK3</i>	Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G), transcript variant 1	-4.79	-2.73
<i>CAPN6</i>	Calpain 6 (CAPN6)	-4.76	-5.17
<i>HPGD</i>	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	-4.72	-2.00
<i>SLC7A1</i>	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 1	-4.72	-1.65
<i>MMP26</i>	Matrix metalloproteinase 26	-4.66	-5.90
<i>LRRC17</i>	Leucine-rich repeat containing 17, transcript variant 2	-4.64	-1.67
<i>ALPL</i>	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	-4.44	-2.14
<i>HEY2</i>	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	-4.07	-1.97
<i>COBL</i>	Cordon-bleu homologue (mouse)	-3.99	-1.79
<i>SERPINA5</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 5	-3.84	-2.73
<i>CREB3L1</i>	cAMP responsive element-binding protein 3-like 1	-3.77	-1.55
<i>IDH1</i>	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP ^b), soluble	-3.68	-1.61
<i>CBR3</i>	Carbonyl reductase 3	-3.66	-1.72
<i>ADAMTS8</i>	A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8	-3.59	-2.48
<i>BIRC3</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3), transcript variant 1	-3.58	-1.75
<i>DFNB31</i>	Deafness, autosomal recessive 31	-3.54	-2.19
<i>KCNJ2</i>	Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 2	-3.47	-1.60
<i>BARD1</i>	BRCA1-associated RING domain 1	-3.47	-1.78
<i>MAP2K6</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 6, transcript variant 1	-3.45	-2.58
<i>NDRG2</i>	NDRG family member 2, transcript variant 1	-3.40	-1.35
<i>LRRC1</i>	Leucine-rich repeat containing 1	-3.23	-3.16
<i>RASSF2</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2, transcript variant 1	-3.19	-1.43
<i>OPRK1</i>	Opioid receptor, kappa 1	-3.17	-1.66
<i>STEAP4</i>	STEAP family member 4	-3.04	-1.79
<i>HEY1</i>	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	-3.03	-1.95

VC= Veces de cambio; ERA = Microarreglo de receptividad endometrial (Díaz-Gimeno, et. al., 2011). Los valores negativos significan subexpresión

Tabla 10. Comparación de la direccionalidad de la expresión de genes diferencialmente expresados en biopsias endometriales del grupo T-MFP vs C-LH+7 con ERA.

Denominación del Gen	Gene	ERA (FC)	MFP (FC)
<i>PAEP</i>	Progestagen-associated endometrial protein (placental protein 14, pregnancy associated endometrial alpha-2-globulin, alpha uterine protein) (PAEP), transcript variant 2	31.43	-13.00
<i>C4BPA</i>	Complement component 4 binding protein, alpha	13.14	-5.43
<i>MAOA</i>	Monoamine oxidase A, nuclear gene encoding mitochondrial protein	9.39	-4.99
<i>GADD45A</i>	Growth arrest and DNA damage inducible, alpha	8.25	-1.66
<i>NNMT</i>	Nicotinamide N-methyltransferase	7.74	-1.85
<i>SCGB2A2</i>	Secretoglobin, family 2A, member 2	7.43	-3.43
<i>SNX10</i>	Sorting nexin 10	6.56	-1.53
<i>CP</i>	Ceruloplasmin (ferroxidase)	6.34	-3.60
<i>EFNA1</i>	Ephrin-A1, transcript variant 1	5.77	-2.19
<i>KLRC1</i>	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1, transcript variant 2	5.75	-2.07
<i>TAGLN</i>	Transgelin	5.71	-1.64
<i>SLC15A1</i>	Solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	5.59	-6.41
<i>THBS2</i>	Thrombospondin 2	5.17	-2.55
<i>HPSE</i>	Heparanase	5.17	-5.62
<i>SERPING1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary), transcript variant 1	5.16	-2.38
<i>CRISP3</i>	Cysteine-rich secretory protein 3	5.09	-21.71
<i>RPRM</i>	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	5.03	-1.50
<i>EDNRB</i>	Endothelin receptor type B, transcript variant 2	4.89	-3.03
<i>ABLIM3</i>	Actin-binding LIM protein family, member 3	4.87	-1.61
<i>GLIPR1</i>	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	4.83	-2.00
<i>CTSW</i>	Cathepsin W	4.78	-2.03
<i>AQP3</i>	Aquaporin 3 (Gill blood group)	4.63	-1.68
<i>S100A4</i>	S100 calcium-binding protein A4, transcript variant 1	4.59	-1.30
<i>NKG7</i>	Natural killer cell group 7 sequence	4.42	-1.66
<i>ARG2</i>	Arginase, type II, nuclear gene encoding mitochondrial protein	4.35	-7.95
<i>ANXA4</i>	Annexin A4	4.27	-2.62
<i>ARID5B</i>	AT-rich interactive domain 5B (MRF1-like)	4.19	-1.56
<i>SPP1</i>	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	4.15	-11.00
<i>DKK1</i>	Dickkopf homologue 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	4.10	-8.22
<i>HABP2</i>	Hyaluronan-binding protein 2	4.09	-1.72
<i>GZMA</i>	Granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	4.07	-2.75
<i>C10orf10</i>	Chromosome 10 open reading frame 10	3.98	-6.68
<i>STAR</i>	Steroidogenic acute regulator, nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	3.93	-1.83
<i>LMOD1</i>	Leiomodin 1 (smooth muscle)	3.92	-2.01
<i>HAND2</i>	Heart and neural crest derivatives expressed 2	3.91	-2.06
<i>CXCL13</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant)	3.90	-9.19
<i>RARRES3</i>	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	3.79	-1.49
<i>MT2A</i>	Metallothionein 2A	3.72	-3.16
<i>RRAS</i>	Related RAS viral (r-ras) oncogene homologue	3.70	-1.80
<i>COTL1</i>	Coactosin-like 1 (<i>Dictyostelium</i>)	3.58	-1.42
<i>ID4</i>	Inhibitor of DNA-binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	3.56	-2.33
<i>LMCD1</i>	LIM and cysteine-rich domains 1	3.53	-1.61

<i>MFAP5</i>	Microfibrillar associated protein 5	3.42	-3.86
<i>MT1G</i>	Metallothionein 1G	3.41	-71.01
<i>CLDN4</i>	Claudin 4	3.41	-2.11
<i>PTPRR</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R , transcript variant 1	3.40	-2.04
<i>DDX52</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 52, transcript variant 2	3.38	-2.43
<i>HAL</i>	Histidine ammonia lyase	3.37	-2.01
<i>ADAMTS1</i>	A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	3.32	-4.86
<i>PROS1</i>	Homo sapiens protein S (alpha)	3.28	-1.40
<i>FOSL2</i>	FOS-like antigen 2	3.26	-2.27
<i>AMIGO2</i>	Adhesion molecule with Ig-like domain 2	3.20	-1.85
<i>POLD4</i>	Polymerase (DNA-directed), delta 4	3.16	-1.38
<i>GBP2</i>	Guanylate-binding protein 2, interferon-inducible	3.14	-4.08
<i>GABARAPL1</i>	GABA(A) receptor-associated protein-like 1	3.13	-1.89
<i>MT1H</i>	Metallothionein 1H	3.12	-48.84
<i>ATP6V1A</i>	ATPase, H _p transporting, lysosomal 70 kDa, V1 subunit A	3.04	-1.49
<i>IL15</i>	Interleukin 15, transcript variant 1	3.03	-4.26
<i>BCL6</i>	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51), transcript variant 2	3.02	-2.27
<i>TRH</i>	Thyrotropin-releasing hormone	-21.69	7.31
<i>HLA-DOB</i>	Major histocompatibility complex, class II, DO	-11.06	-2.55
<i>CSRP2</i>	Cysteine and glycine-rich protein 2	-9.62	1.80
<i>SLC15A2</i>	Solute carrier family 15 (H _p /peptide transporter), member 2	-8.44	2.62
<i>SFRP4</i>	Secreted frizzled-related protein 4	-8.33	3.76
<i>NR4A2</i>	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2, transcript variant 1	-7.05	-2.17
<i>DUOX1</i>	Dual oxidase 1, transcript variant 1	-6.61	-3.51
<i>KIF20A</i>	kinesin family member 20A	-6.33	2.11
<i>PENK</i>	Proenkephalin	-6.16	1.68
<i>EDN3</i>	Endothelin 3, transcript variant 3	-5.30	1.78
<i>GALNT12</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 (GalNAc-T12)	-4.85	3.23
<i>CAPN6</i>	Calpain 6 (CAPN6)	-4.76	-2.53
<i>MMP26</i>	Matrix metalloproteinase 26	-4.66	-8.40
<i>LRRC17</i>	Leucine-rich repeat containing 17, transcript variant 2	-4.64	1.66
<i>KCNG1</i>	Potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1, transcript variant 1	-4.63	1.48
<i>SOX17</i>	SRY (sex determining region Y)-box 17	-4.24	1.81
<i>TOP2A</i>	Topoisomerase (DNA) II alpha 170 kDa	-3.98	2.51
<i>SPDEF</i>	SAM pointed domain-containing ets transcription factor	-3.78	5.54
<i>KMO</i>	Kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	-3.78	3.14
<i>ATP1B1</i>	ATPase, Na _p /K _p transporting, beta 1 polypeptide	-3.73	1.84
<i>ADAMTS8</i>	A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8	-3.59	-3.78
<i>BIRC3</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3), transcript variant 1	-3.58	-2.50
<i>PLA1A</i>	Phospholipase A1 member A	-3.42	1.61
<i>PBK</i>	PDZ-binding kinase	-3.42	2.08
<i>PRC1</i>	Protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1), transcript variant 1	-3.29	1.65
<i>MSX1</i>	Msh homeo box homologue 1 (Drosophila)	-3.26	1.93
<i>LRRC1</i>	Leucine-rich repeat containing 1	-3.23	-3.60
<i>EPHB3</i>	EPH receptor B3	-3.20	1.52

VC= Veces de cambio; ERA = Microarreglo de receptividad endometrial (Díaz-Gimeno, et. al., 2011). Los valores negativos significan subexpresión

Es importante hacer notar que para el caso de *PAEP*, un gen progesterona dependiente, fue el segundo gen más sobreexpresado en ERA y el décimo más subexpresado en T-MFP. En la Tabla 11 se muestra la direccionalidad en la expresión de los 21 genes comunes entre las tres listas de expresión diferencial comparadas. Como puede observarse los 11 genes comunes sobre expresados en ERA mostraron la misma direccionalidad en T-LNG y todos ellos subexpresados en T-MFP. De manera similar, los 10 genes subexpresados en ERA fueron también regulados a la baja en T-LNG y siete de 10 en T-MFP.

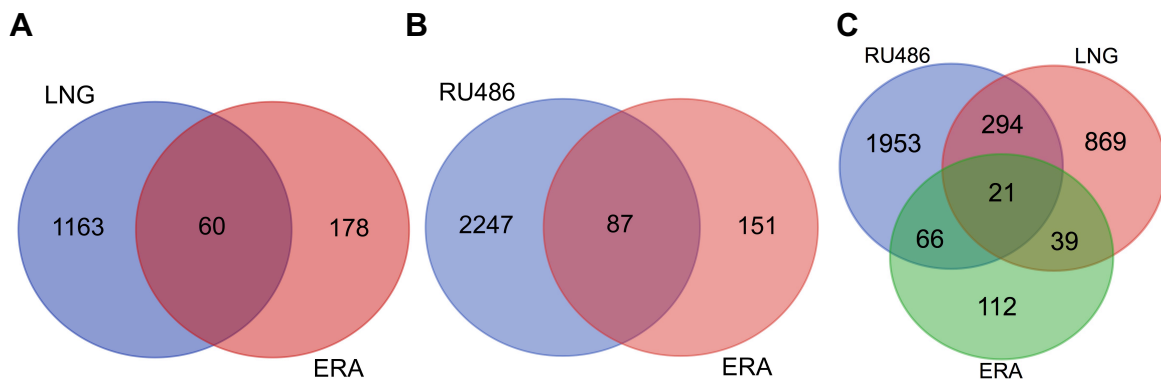


Figure 8. Diagramas de Venn de las listas de expresión diferencial de los micrarreglos de los grupos T-LNG, T-MFP (RU486) y ERA. En las intersecciones se muestran el número común de genes.

Tabla 11. Comparación de la direccionalidad de la expresión de genes diferencialmente expresados en biopsias endometriales del grupo T-LNG vs C-LH+7 y T-MFP vs C-LH+7 con ERA.

Denominación del Gen	Gen	ERA (VC)	LNG (VC)	MFP (VC)
<i>C4BPA</i>	Complement component 4 binding protein, alpha	13.14	2.64	-5.43
<i>GADD45A</i>	Growth arrest and DNA damage inducible, alpha	8.25	1.69	-1.66
<i>NNMT</i>	Nicotinamide N-methyltransferase	7.74	1.62	-1.85
<i>SNX10</i>	Sorting nexin 10	6.56	1.93	-1.53
<i>CP</i>	Ceruloplasmin (ferroxidase)	6.34	1.64	-3.60
<i>TAGLN</i>	Transgelin	5.71	1.61	-1.64

<i>THBS2</i>	Thrombospondin 2	5.17	1.60	-2.55
	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary), transcript variant 1	5.16	1.72	-2.38
<i>SERPING1</i>				
<i>HABP2</i>	Hyaluronan-binding protein 2	4.09	5.20	-1.72
<i>COTL1</i>	Coactosin-like 1 (Dictyostelium)	3.58	1.52	-1.42
<i>PROS1</i>	Homo sapiens protein S (alpha)	3.28	1.45	-1.40
<i>HLA-DOB</i>	Major histocompatibility complex, class II, DO	-11.06	-2.35	-2.55
	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2, transcript variant 1	-7.05	-2.00	-2.17
<i>NR4A2</i>				
<i>DUOX1</i>	Dual oxidase 1, transcript variant 1	-6.61	-3.05	-3.51
<i>EDN3</i>	Endothelin 3, transcript variant 3	-5.30	-1.45	1.78
<i>CAPN6</i>	Calpain 6 (CAPN6)	-4.76	-5.17	-2.53
<i>MMP26</i>	Matrix metalloproteinase 26	-4.66	-5.90	-8.40
<i>LRRC17</i>	Leucine-rich repeat containing 17, transcript variant 2	-4.64	-1.67	1.66
	A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8	-3.59	-2.48	-3.78
<i>ADAMTS8</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3), transcript variant 1	-3.58	-1.75	-2.50
<i>BIRC3</i>				
<i>LRRC1</i>	Leucine-rich repeat containing 1	-3.23	-3.16	1.66

VC= Veces de cambio; ERA = Microarreglo de receptividad endometrial (Díaz-Gimeno, et. al., 2011). Los valores negativos significan subexpresión.

Validación de los cambios de expresión génica observados en los microarreglos.

Con el objeto de validar las diferencias en expresión observadas en las micromatrices, se procedió a evaluar el nivel del cambio transcripcional por RT-qPCR de las muestras de RNA obtenidas de los endometrios de los grupos C y T. Para esta finalidad, se diseñaron oligonucleótidos específicos sentido y antisentido para cada uno de los genes analizados. Estos genes fueron seleccionados con base a su nivel de relevancia en el proceso de receptividad endometrial. Como se muestra en la Tabla 12, los genes evaluados por RT-qPCR mostraron cambios similares a los observados en los análisis de expresión por micromatrices.

Tabla 12. Validación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de los cambios de expresión diferencial por microarreglos en biopsias de endometrio en los grupos T-LNG y T-MFP. Los resultados están expresados en veces de cambio con respecto al grupo C-LH+7.

Gen	T-LNG	T-MFP
<i>PAEP</i>	5.47	- 911.17
<i>LIF</i>	1.32	- 4.17
<i>STAT3</i>	1.46	- 1.60
<i>PRL</i>	1.12	- 1.31
<i>PGR</i>	- 1.10	5.12

Los valores negativos significan subexpresión.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Levonorgestrel es una progestina sintética de segunda generación derivada de la 19-nor testosterona con actividad agonista a través de su unión con los receptores nucleares de la progesterona A y B (20). Este compuesto se utiliza ampliamente en formulaciones anticonceptivas tanto orales, implantes y dispositivos intrauterinos. Su uso en anticoncepción de emergencia se ha generalizado por su elevada eficacia y escasos efectos secundarios (21). El mecanismo de acción anticonceptiva del LNG es a nivel de la unidad hormonal y reproductiva del ovario, así como neuroendocrino afectando la liberación de la LH hipofisaria lo que resulta en la inhibición o retraso de la ovulación (21-24). A este respecto, está bien establecido que LNG inhibe el fenómeno de la ovulación cuando se administra en los días previos a la liberación aguda de LH; sin embargo, este mecanismo no se modifica si se administra en la fase periovulatoria (10). Como se mencionó previamente, la eficacia anovulatoria de LNG a la dosis administrada en AE disminuye en la fase ovulatoria del ciclo menstrual en los días con mayor probabilidad de embarazo en caso de un coito no protegido. Esta observación sugiere la participación de otros mecanismos de acción anticonceptiva además de los efectos de LNG sobre la ovulación, por lo que el objetivo en este trabajo de tesis fue la evaluación de los efectos de LNG sobre el patrón de expresión genómica del endometrio durante la fase de mayor receptividad del ciclo menstrual. Los resultados fueron comparados con los obtenidos con mifepristona un modulador selectivo del receptor de la progesterona con efectos antiimplantación bien conocidos.

En caso de que ocurra la inhibición o retraso de la ovulación, los efectos de LNG sobre el endometrio son irrelevantes dada la ausencia de progesterona durante la fase lútea y la ausencia del embrión. Por esta razón, en este estudio, la administración de LNG se realizó el día de la ruptura folicular asegurando de esta manera la producción de progesterona por el cuerpo lúteo y así poder evaluar los efectos de esta progestina sobre el endometrio.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis indicaron que la administración de 1.5 mg de LNG el día de la ruptura folicular ocasionó cambios en el perfil de expresión génica en el endometrio durante la fase de implantación del embrión. El análisis comparativo de los genes con expresión diferencial mostró un patrón de direccionalidad similar al observado en estudios previos durante el periodo de transición endometrial de la fase lútea temprana a la fase mesolútea (25, 26). Por otra parte, la administración de MFP resultó en cambios de expresión del genoma endometrial cuya direccionalidad fue opuesta a la observada con LNG y a la obtenida durante la fase de mayor receptividad del endometrio. Estos resultados sugieren que los efectos observados de LNG sobre el endometrio, diferentes a los obtenidos con MFP y similares a los observados en la fase mesolútea del ciclo menstrual, probablemente no modifiquen la capacidad receptiva del endometrio inducido por la progesterona secretada por el cuerpo lúteo del ovario. De manera interesante, los efectos sobre el perfil de expresión génica en el endometrio de mujeres tratadas con MFP fueron similares a los obtenidos previamente por nuestro grupo utilizando al acetato de ulipristal (UPA) (12, 27), un modulador selectivo del receptor de progesterona con actividad

antagonista, lo que explicaría por sus efectos a nivel endometrial la mayor eficacia de UPA como AE que la obtenida con LNG. Para el caso de algunos genes que mostraron expresión diferencial en las micromatrices, la direccionalidad de la expresión génica fue validada a través de RT-qPCR tanto en los grupos T-LNG y T-MFP.

Los resultados derivados del análisis de ontología génica a partir de la lista de los 1223 y 2334 genes diferencialmente expresados en el endometrio de los grupos T-LNG y T-MFP, mostraron 333 y 1763 PB sobrerrepresentados, respectivamente. El BP “desarrollo embrionario *in utero*” mostró, en ambos grupos tratados, junto con “embarazo femenino”, la mayor significancia estadística. Por otra parte, procesos biológicos tales como la regulación de IL-6, curación de heridas y el remodelamiento de tejidos y vasos sanguíneos asociados significativamente con receptividad endometrial se identificaron como sobrerrepresentados en el grupo T-LNG. Además, la respuesta inflamatoria también se identificó significativamente asociada con receptividad endometrial en el grupo T-MFP.

Estos resultados permiten establecer que bajo condiciones fisiológicas los efectos de la progesterona natural, producida por el cuerpo lúteo posterior al fenómeno de la ovulación, son responsables en gran medida de la expresión de genes que ocurre durante el “despertar transcripcional” del endometrio durante la ventana de implantación (28), así como por otra parte, apoyan los efectos agonistas y antagonistas a nivel del receptor endometrial de la progesterona de LNG y MFP, respectivamente (29). Es importante mencionar que no todos los genes que se

expresan durante la etapa de implantación están relacionados con el desarrollo del fenotipo receptivo del endometrio (30). A este respecto, otros factores hormonales o mensajeros químicos diferentes a la progesterona podrían ser responsables de la regulación de una cohorte de genes que coinciden durante la fase de mayor receptividad endometrial.

Dado el hallazgo en biopsias de mujeres tratadas con LNG, donde el “embarazo femenino” fue uno de los términos de ontología génica más sobrerrepresentados tanto en el grupo T-LNG y T-MFP, se procedió a consultar la base de datos Ingenuity® Knowledge Base de IPA (<https://ingenuity.net.au/support/knowledge-base/>) sobre varias biofunciones asociadas con receptividad endometrial. El objetivo de este análisis fue predecir la actividad molecular, con base a la lista de genes diferencialmente expresados, de las biofunciones “decidualización del útero”, así como implantación del embrión y del blastocisto”, respectivamente.

En términos generales, los resultados de los cambios observados con la administración de LNG sobre estas biofunciones fueron predichas por IPA como activadas sobre todo con base a la sobreexpresión de *LIF* en donde las vías canónicas de la familia de las cinasas JAK en la vía de señalización de citocinas tipo IL-6, incluyendo las vías de respuesta de fase aguda, fueron también identificadas. A este respecto, la activación a través de receptores específicos para LIF (LIFR) y el reclutamiento de GP130 (IL6ST) se encuentran relacionadas con tres importantes vías dependientes de citosinas; MAPK, JAK-STAT y citosinas (31). En ratones transgénicos que no expresan *LIF* o en aquellos sin la región

carboxilo terminal de gp-130 son infértiles debido a fallas en el proceso de implantación, lo que indica la importancia de esta vía de señalización en la implantación del embrión (32). Estos resultados sugieren que LNG actúa como agonista en los mecanismos de recepción endometrial a través de estimular la expresión de genes relevantes como *LIF* y sus componentes de señalización intracelular. En este estudio, la administración de MFP resultó en la inhibición de la expresión de genes involucrados en los procesos de decidualización e implantación del embrión sobre todo de *STAT3* en donde convergen vías canónicas de señalización como ERK /MAPK, JAK/Stat, IL-15 y la vía de señalización de fase aguda todas ellas asociadas con receptividad endometrial (33). Estos resultados nos permiten apoyar los obtenidos con LNG y probablemente descartar efectos que modifiquen las propiedades receptoras del endometrio.

Los resultados de este trabajo de tesis están de acuerdo con dos estudios clínicos previamente publicados en donde la administración posovulatoria de LNG no modificó la tasa esperada de embarazos, lo que confirma observaciones previas sobre los mecanismos de acción anticonceptiva de esta progestina y contribuyen con evidencia funcional a los resultados obtenidos en este estudio (6, 34).

Finalmente y como conclusión, este estudio además de otros previamente publicados permite establecer los perfiles de expresión génica del endometrio humano en biopsias seriadas obtenidas durante diferentes fases del ciclo menstrual y en particular en la fase mesolútea. En general los resultados señalan

la expresión de conjuntos de genes que a manera de un proceso denominado “despertar transcripcional” (implantación) definen los rasgos moleculares, muchos de ellos dependientes de la progesterona, responsables del fenotipo receptor del endometrio humano (26, 35). Por otra parte, los resultados de este estudio permiten la caracterización de moléculas de interés en la clínica que, además de conocer y establecer las condiciones moleculares del endometrio humano normal en términos de su actividad receptiva, identificar los cambios en los perfiles de expresión génica en casos de infertilidad o ser de ayuda para predecir el éxito o falla en los procesos de implantación en mujeres sujetas a procedimientos de reproducción asistida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Departamento de Biología de la Reproducción por la oportunidad de realizar este trabajo de tesis para obtener el grado de especialista en Biología de la Reproducción Humana, así como a los profesores titulares, adjuntos y asociados por su tiempo y enseñanzas recibidas.

Este trabajo fue apoyado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el subsidio número 233447.

REFERENCIAS

1. Brown EJ, Deshmukh P, Antell K. Contraception Update: Oral Contraception. *FP essentials* 2017;462:11-9.
2. Antell K, Deshmukh P, Brown EJ. Contraception Update: Intrauterine Devices. *FP essentials* 2017;462:20-4.
3. Antell K, Deshmukh P, Brown EJ. Contraception Update: Sterilization. *FP essentials* 2017;462:30-4.
4. Apter D. Contraception options: Aspects unique to adolescent and young adult. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 2018;48:115-27.
5. Cleland K, Raymond EG, Westley E, Trussell J. Emergency contraception review: evidence-based recommendations for clinicians. *Clinical obstetrics and gynecology* 2014;57:741-50.
6. Noe G, Croxatto HB, Salvatierra AM, Reyes V, Villarroel C, Munoz C *et al.* Contraceptive efficacy of emergency contraception with levonorgestrel given before or after ovulation. *Contraception* 2011;84:486-92.
7. Benagiano G, Bastianelli C, Farris M, Brosens I. Selective progesterone receptor modulators: an update. *Expert Opin Pharmacother* 2014;15:1403-15.
8. Giannini A, Russo E, Mannella P, Simoncini T. Selective steroid receptor modulators in reproductive medicine. *Minerva ginecologica* 2015;67:431-55.
9. Lira-Albarran S, Larrea-Schiavon MF, Gonzalez L, Durand M, Rangel C, Larrea F. The effects of levonorgestrel on FSH-stimulated primary rat granulosa cell cultures through gene expression profiling are associated to hormone and folliculogenesis processes. *Mol Cell Endocrinol* 2017;439:337-45.

10. Durand M, del Carmen Cravioto M, Raymond EG, Duran-Sanchez O, De la Luz Cruz-Hinojosa M, Castell-Rodriguez A *et al.* On the mechanisms of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception* 2001;64:227-34.
11. Croxatto HB, Ortiz ME, Muller AL. Mechanisms of action of emergency contraception. *Steroids* 2003;68:1095-8.
12. Lira-Albarran S, Durand M, Larrea-Schiavon MF, Gonzalez L, Barrera D, Vega C *et al.* Ulipristal acetate administration at mid-cycle changes gene expression profiling of endometrial biopsies taken during the receptive period of the human menstrual cycle. *Mol Cell Endocrinol* 2017;447:1-11.
13. Sun Y, Fang M, Davies H, Hu Z. Mifepristone: a potential clinical agent based on its anti-progesterone and anti-glucocorticoid properties. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 2014;30:169-73.
14. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *American journal of obstetrics and gynecology* 1975;122:262-3.
15. Durand M, Koistinen R, Chirinos M, Rodriguez JL, Zambrano E, Seppala M *et al.* Hormonal evaluation and midcycle detection of intrauterine glycodelin in women treated with levonorgestrel as in emergency contraception. *Contraception* 2010;82:526-33.
16. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 1987;162:156-9.

17. Alonso R, Salavert F, Garcia-Garcia F, Carbonell-Caballero J, Bleda M, Garcia-Alonso L *et al.* Babelomics 5.0: functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic acids research* 2015;43:W117-21.
18. Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)* 2006;84:901-10.
19. Diaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A *et al.* A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertility and sterility* 2011;95:50-60, e1-15.
20. Garcia-Becerra R, Cooney AJ, Borja-Cacho E, Lemus AE, Perez-Palacios G, Larrea F. Comparative evaluation of androgen and progesterone receptor transcription selectivity indices of 19-nortestosterone-derived progestins. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2004;91:21-7.
21. Durand M, Larrea F, Schiavon R. [Mechanisms of action of emergency contraception]. *Salud Publica Mex* 2009;51:255-61.
22. Croxatto HB, Devoto L, Durand M, Ezcurra E, Larrea F, Nagle C *et al.* Mechanism of action of hormonal preparations used for emergency contraception: a review of the literature. *Contraception* 2001;63:111-21.
23. Croxatto HB, Brache V, Pavez M, Cochon L, Forcelledo ML, Alvarez F *et al.* Pituitary-ovarian function following the standard levonorgestrel emergency contraceptive dose or a single 0.75-mg dose given on the days preceding ovulation. *Contraception* 2004;70:442-50.
24. Durand M, Seppala M, Cravioto Mdel C, Koistinen H, Koistinen R, Gonzalez-Macedo J *et al.* Late follicular phase administration of levonorgestrel as

an emergency contraceptive changes the secretory pattern of glycodeilin in serum and endometrium during the luteal phase of the menstrual cycle. *Contraception* 2005;71:451-7.

25. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C *et al.* Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006;147:1097-121.

26. Garrido-Gomez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simon C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertility and sterility* 2013;99:1078-85.

27. Lira-Albarran S, Durand M, Barrera D, Vega C, Becerra RG, Diaz L *et al.* A single preovulatory administration of ulipristal acetate affects the decidualization process of the human endometrium during the receptive period of the menstrual cycle. *Mol Cell Endocrinol* 2018;476:70-8.

28. Hu S, Yao G, Wang Y, Xu H, Ji X, He Y *et al.* Transcriptomic changes during the pre-receptive to receptive transition in human endometrium detected by RNA-Seq. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2014;99:E2744-53.

29. Diaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Simon C. Transcriptomics of the human endometrium. *The International journal of developmental biology* 2014;58:127-37.

30. Cuevas CA, Tapia-Pizarro A, Salvatierra AM, Munroe DJ, Velasquez L, Croxatto HB. Effect of single post-ovulatory administration of mifepristone (RU486)

on transcript profile during the receptive period in human endometrium. *Reproduction* 2016;151:331-49.

31. Salleh N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *TheScientificWorldJournal* 2014;2014:201514.

32. Sun X, Bartos A, Whitsett JA, Dey SK. Uterine deletion of Gp130 or Stat3 shows implantation failure with increased estrogenic responses. *Molecular endocrinology* 2013;27:1492-501.

33. Lee JH, Kim TH, Oh SJ, Yoo JY, Akira S, Ku BJ *et al.* Signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) plays a critical role in implantation via progesterone receptor in uterus. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013;27:2553-63.

34. Novikova N, Weisberg E, Stanczyk FZ, Croxatto HB, Fraser IS. Effectiveness of levonorgestrel emergency contraception given before or after ovulation--a pilot study. *Contraception* 2007;75:112-8.

35. Haouzi D, Dechaud H, Assou S, De Vos J, Hamamah S. Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data. *Reproductive biomedicine online* 2012;24:23-34.