



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MODELADO DE EFECTOS ADVERSOS DE LEVONORGESTREL  
INDICATIVOS DE POSIBLE SUSCEPTIBILIDAD A INFECCIONES POR  
MEDIO DE ESTRATEGIAS DE DATOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MARÍA MONTSERRAT RAMÍREZ LEDESMA**

**TUTOR DE TESIS**

**GUILLERMO DE ANDA JÁUREGUI**



**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Guillermo de Anda Jáuregui

**VOCAL:** Profesor: Jessica Liliana Vargas Neri

**SECRETARIO:** Profesor: Carol Siseth Martínez Caballero

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Elsa Flores Marroquín

**2° SUPLENTE:** Profesor: Areli Cruz Trujillo

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA  
GENÓMICA (INMEGEN)**

**ASESOR DEL TEMA: GUILLERMO DE ANDA JÁUREGUI**

**SUSTENTANTE (S): MARÍA MONTSERRAT RAMÍREZ LEDESMA**

# Agradecimientos

Quisiera comenzar por agradecer al tutor de esta tesis de licenciatura, el Dr. Guillermo de Anda Jáuregui, por su capacidad de transmitir sus conocimientos de forma vasta para el desarrollo de este trabajo, así como su dedicación y paciencia desde que comenzamos a trabajar juntos para este proyecto, por su continuo empuje a desafiarme en un área desconocida para mí, impulsando mis ideas y contribuyendo de tantas propias para enriquecer el desarrollo de esta tesis. Gracias por la confianza y apoyo recibido desde el día uno que comenzó a ser mi tutor en la estancia académica y hasta hoy que culmina este proyecto de tesis de licenciatura.

Asimismo, agradezco al INMEGEN instituto dónde desarrollamos el proyecto desde estancia estudiantil hasta el proyecto final como tesis de licenciatura.

De igual forma agradezco desde lo más profundo de mi corazón a mi querida Facultad de Química de la UNAM, escuela que me brindó la formación en el área científica y de la salud que hoy me permitieron desarrollar este trabajo, formándome como una profesional comprometida con la sociedad y dispuesta a contribuir con mi conocimiento a la sociedad.

Gracias a la Dra. Carol Siseth Martínez Caballero y a la Dra. Jessica Liliana Vargas Neri, por la revisión cuidadosa que realizaron a este texto y sus valiosas sugerencias que enriquecieron esta tesis.

Aprovecho también para agradecer a todos mis profesores de licenciatura por fortalecer de valiosos conocimientos mi formación como química farmacéutica bióloga.

Ahora quiero agradecer a todas aquellas personas que me estiman, sin las cuales no hubiera tenido el empuje y energía que siempre me animaron a crecer como persona y como profesionalista.

Gracias a mis padres Carlos y Marcela, por ser mi apoyo incondicional desde que comencé mi vida académica, por su guía, soporte, amor y fuerza que sin ello no habría sido posible llegar hasta donde estoy. A mi hermano Carlos, mi más grande ejemplo a seguir por su apoyo y sus consejos día a día. A mi abuelita Queta querida por su incondicional apoyo y cariño que siempre me dio empuje para nunca rendirme. A mis abuelxs Carlos y María y a mis tíxs Oscar, Memo y Naty, porque su recuerdo siempre me inspiró y me llenó de fuerzas para hacer sentir al cielo muy orgulloso de lo que he realizado. Y al resto de mi familia por siempre confiar en mí y enorgullecerse conmigo de todos mis logros.

Gracias a todxs mis amixes, que siempre me han brindado su apoyo moral, humano y académico, necesarios en los momentos más difíciles de esta carrera y esta profesión. Dando una mención especial a mis hermanas (Migue, Delia, Mariana, Mayte y Janeth), a Karen, a Alex, y a Joshmara por siempre ser un apoyo incondicional cuando sentía que mis metas estaban lejanas a cumplirse.

A todxs, muchas gracias.

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abreviaturas</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>Resumen</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>1. Introducción</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>1.1 Antecedentes</b> .....   | <b>11</b> |
| 1.1.1 Fármaco anticonceptivo: levonorgestrel.....   | 11        |
| 1.1.2 Levonorgestrel y posible susceptibilidad a infecciones.....   | 16        |
| 1.1.3 Farmacovigilancia .....   | 18        |
| <b>1.2 Planteamiento del problema</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>1.3 Hipótesis</b> .....  | <b>24</b> |
| <b>1.4 Objetivo General</b> .....   | <b>24</b> |
| 1.4.1 Objetivos particulares .....  | <b>24</b> |
| <b>2. Materiales y métodos</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>2.1 Eventos adversos</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>2.2 Sets de datos utilizadas para el análisis</b> .....  | <b>25</b> |
| 2.2.1 Construcción de grafo causal.....   | 25        |
| <b>2.3 Expresión de genes y expresión alterada en genes de defensa del hospedero.</b><br>.....  | <b>28</b> |
| 2.3.1 Análisis de expresión diferencial.....  | 29        |
| 2.3.2 Análisis de enriquecimiento.....  | 32        |
| <b>2.4 Alteración del microbioma vaginal.</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>3. Resultados</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>3.1 Eventos adversos de Levonorgestrel</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>3.2 Relevancia del grupo de EAs de estudio para el fármaco</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>3.3 Expresión alterada de genes durante el tratamiento con Levonorgestrel</b> .....  | <b>44</b> |
| 3.3.1 Análisis de expresión diferencial, enriquecimiento de vías y análisis de enriquecimiento<br>basado en un análisis de sobrerrepresentación (ORA) en muestras de tejido endometrial y<br>cervical de sujetos en tratamiento con Levonorgestrel..... | 44        |
| 3.3.2 Evaluación de la expresión alterada de genes en presencia de infección durante<br>tratamiento hormonal. ....  | 49        |
| <b>3.4 Alteración de la microbiota vaginal GSE138971.</b> .....   | <b>57</b> |
| <b>4. Discusión.</b> .....  | <b>59</b> |
| <b>4.1 Eventos adversos de Levonorgestrel</b> .....   | <b>59</b> |
| <b>4.2 Expresión alterada de genes durante el tratamiento con Levonorgestrel</b> .....  | <b>60</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2.1 Análisis de expresión diferencial y de enriquecimiento de vías de genes expresados de forma alterada GSE188915 ..... | 60        |
| 4.2.2 Análisis de expresión diferencial GSE137765 .....  | 67        |
| <b>4.3 Evaluación de la expresión alterada de genes en presencia de infección durante tratamiento hormonal. ....</b>       | <b>72</b> |
| <b>4.4 Alteración de la microbiota vaginal GSE138971. ....</b>   | <b>75</b> |
| <b>5. Conclusiones .....</b>   | <b>78</b> |
| <b>6. Perspectivas.....</b>  | <b>79</b> |
| <b>7. Referencias.....</b>   | <b>80</b> |

# Abreviaturas

ARN Ácido Ribonucleico

BCR Receptor de células B

CBER Centro para la Evaluación e Investigación Biológica

CD Células dendríticas

CDER Centro para la Evaluación e Investigación de Fármacos

Células NK Células asesinas naturales

CTL Linfocito T citotóxicos

DMPA Acetato de medroxiprogesterona

EA Evento Adverso

EE. UU. Estados Unidos de América

ERK Cinasa extracelular señal/regulada

EROs Especies reactivas de oxígeno

FAERS Sistema de Reporte de Eventos Adversos de la FDA (Adverse Event Reporting System)

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)

GEO Gene Expression Omnibus

H<sub>0</sub> Hipótesis nula

HIF-1 $\alpha$  Factor de inducción a hipoxia 1- $\alpha$

ICSR Informes de seguridad de casos individuales

IgE Inmunoglobulinas tipo E

IL-7 Interleucina 7

ITS Infecciones de transmisión sexual

M1 Macrófagos activados por la vía clásica

M2 Macrófagos activados por la vía alterna

MAPK Proteína cinasa mitogen-activada

mTOR Blanco de rapamicina para mamíferos

NCBI Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)

NH Sin tratamiento hormonal

NO Óxido Nítrico



NODs Dominio central de unión a nucleótido de oligomerización

ORA Análisis de sobrerrepresentación

PI3K/AKT Fosfatidilinositol 3 cinasa

PAMPs patrones moleculares asociados a patógenos

PDBs Bancos de Datos de Proteínas

PRR Razón de Notificación Proporcional

PRRs Receptores de reconocimiento de patrones

RAM Reacción adversa a un medicamento

RH Reacciones de hipersensibilidad

ROS Especies reactivas de oxígeno

TCR Receptor de células T

TLR Receptor tipo Toll

Treg Células T reguladores

VB Vaginosis bacteriana

VIH Virus de inmunodeficiencia humana

VPH Virus del papiloma humano

# Resumen

Investigamos la presencia de susceptibilidad a infecciones inducida por el tratamiento con el fármaco hormonal anticonceptivo levonorgestrel. La problemática fue planteada basándonos en la información de bases de datos de efectos y eventos adversos reportados (FAERS de la FDA y Side Effect Resource “SIDER 4.1” de EMBL), donde se identificó la incidencia de infecciones vaginales durante el tratamiento con dicho fármaco.

Esta serie de fenómenos adversos identificados como infecciosos son de importancia para la población, dado que tienen un impacto importante en la planificación familiar, salud reproductiva y ginecológica de las personas, por lo que su estudio es relevante. Por tanto, la importancia del desarrollo de este trabajo, cuya pregunta a resolver fue: “¿El levonorgestrel es capaz de propiciar susceptibilidad a infecciones?”, la cual se contestó a partir del uso de herramientas computacionales y búsqueda sistematizada de la información, las cuales hicieron posible encontrar que el levonorgestrel es probable que pueda inducir dichos sucesos adversos de naturaleza infecciosa a través de la afectación del funcionamiento de vías biológicas como la fosforilación oxidativa, Glicolisis/Gluconeogénesis, la serie lacto y neolacto de glucoesfingolípidos, procesos modulados por el ion zinc, homeostasis de cationes, entre otras, los cuales están involucradas en la respuesta inmunológica. Además, se observó que el tratamiento de tipo hormonal derivado de progestinas sintéticas es capaz de inducir cambios en la microbiota vaginal.

El fin de este trabajo fue contribuir con una metodología novedosa en el continuo monitoreo de los posibles efectos que pueden traer consigo el uso de fármacos en la vida de las personas, en este caso el levonorgestrel, ya que se reconoce nuestra responsabilidad como integrantes del sistema de salud, garantizar que los tratamientos que se le brinda a la población son seguros y hacerles de su conocimiento a los y las pacientes los riesgos del uso de cierto fármaco, así como las medidas para aminorar la presencia de dichos efectos durante el tratamiento.

# 1. Introducción

Un fármaco es toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tiene alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presente en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento, lo cual ya en su forma farmacéutica (medicamento) permitirá que sean empleados como tratamiento terapéutico, preventivo o rehabilitatorio. (Ley General de Salud, 2022)

Una vez que un medicamento sale al mercado permanece en la Fase IV (vigilancia post-mercado) de pruebas clínicas. A esta actividad de vigilancia se le conoce como farmacovigilancia, la cual “se considera como una más de las actividades de la salud pública, destinada a la detección, identificación, cuantificación, evaluación y prevención de los posibles riesgos derivados del uso de los medicamentos y vacunas en seres humanos”. (Secretaría de Salud, 2017)

Todos los medicamentos poseen acontecimientos indeseados como las reacciones adversas (RAM) las cuales son definidas como aquella “respuesta no deseada a un medicamento, en la cual la relación con el mismo es razonablemente atribuible” (Secretaría de Salud, 2017). Sin embargo, cuando aún no es probada la relación causal entre el uso de cierto medicamento y la presencia de actividades no deseadas, estos sucesos son identificados como sospecha de reacción adversa (SRAM) la cual es definida como “cualquier manifestación clínica o de laboratorio no deseada que ocurre después de la administración de uno o más medicamentos” (Secretaría de Salud, 2017). Otro de los conceptos importantes en resaltar es el evento adverso (EA) el cual es definido como “cualquier suceso médico indeseable que pueda presentarse en un sujeto de investigación durante la etapa de investigación clínica de un medicamento o vacuna pero no necesariamente causal con el mismo” (Secretaría de Salud, 2017).

La vigilancia continua de estos fenómenos indeseables que presentan las y los pacientes durante el uso de los medicamentos, nos alentó a adentrarnos al estudio de un grupo de eventos adversos clasificado como “Infección/Infestación” (descrito en la base de datos de eventos adversos FAERS de la FDA) durante el uso del fármaco anticonceptivo levonorgestrel.

Identificar la relevancia del posible riesgo de presencia de infecciones para aquellos usuarios de levonorgestrel no fue una tarea fácil, porque la relación presencia de sospecha de reacción adversa y el uso del fármaco en particular era completamente desconocida, además que la presencia de dicho evento adverso (descrito en la base de datos FAERS de la FDA) podría estar siendo alimentado por distintos factores. Razón por la cual como metodología experimental se eligieron las estrategias de datos. Herramientas que nos permitieron integrar diferentes fuentes de información y enriquecer de resultados confiables las preguntas experimentales que se dieron a lo largo del análisis para contestar si “Es el levonorgestrel el responsable de propiciar susceptibilidad a infecciones”, permitiendo la evaluación de si en efecto es la presencia del fármaco en el sistema o sus distintas interacciones con órganos, tejidos, células; inducción de una expresión genética diferente a la basal, incluso una alteración en la microbiota, el o los responsables de desencadenar tal fenómeno no deseado (presencia de infecciones) y elucidar el posible camino que lleva a que se dé dicho suceso adverso. Contribuyendo así la actividad de vigilancia de este fármaco con un enfoque novedoso e integrador.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Fármaco anticonceptivo: levonorgestrel**

#### **1.1.1.1 Generalidades**

El levonorgestrel es la forma levorrotatoria (compuestos que desvían el plano de luz polarizada hacia la izquierda) del norgestrel (**Fig. 1**). El cual es un progestágeno sintético con actividad progestacional (inducción de ciertos cambios en el útero y la

vagina durante el ciclo menstrual) y androgénica (inducción de producción de testosterona). (NCI, 2022)

La síntesis del levonorgestrel enantiómero del dexionorgestrel fue realizada por Hughes-Smith en los años 60's. En los últimos años se han referido al levonorgestrel y a las progestinas relacionadas: desogestrel, norgestimato, gestodeno como "gonanos" cuyo término se construyó a partir del nombre sistemático del levonorgestrel "17b-hidroxi-17a-etinil-13b-etil4-gonan-3-ona". De esta forma un gonano es el nombre científico usado para el núcleo esteroideo básico para 17 carbonos, por tanto, todos los esteroides que poseen el núcleo de 17 carbonos se puede nombrar de esta manera. (Edgren & Stanczyk, 2000)

El uso del término "Gonano" implica que el levonorgestrel y las otras progestinas relacionadas están en una clasificación de esteroides que difieren de otros en características fisicoquímicas y farmacológicas, en primer lugar son progestinas estructuralmente relacionadas con la testosterona o 19-nortestosterona cuya actividad gestagénica (inhibición de la ovulación y espesamiento del moco cervical) es mayor y la androgénica (producción de testosterona en ovarios) mínima o nula respecto a otros esteroides de la misma naturaleza como los estranos, por medio de la sustitución del radical metilo del carbono 18 de la testosterona. (Vásquez & Ospino, 2020)

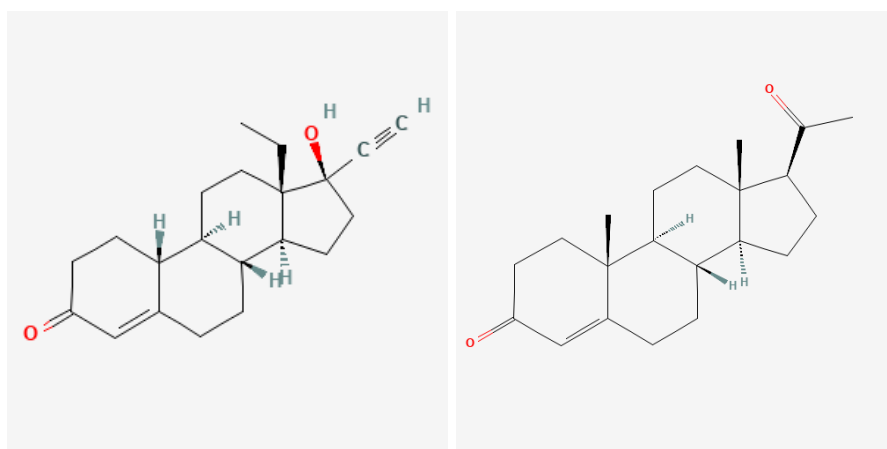
El levonorgestrel es un fármaco esteroide y a la vez un compuesto acetilénico terminal, el cual tiene un papel como fármaco progestina y anticonceptivo oral sintético femenino. Este compuesto junto con el norgestrel fue de los primeros en comercializarse como componentes progestacionales de anticonceptivos orales. En general, su actividad progestacional y las potencias antiestrogénicas de estos productos fueron mayores que las de los compuestos 13-metilados, que tienen la configuración natural. Además, de su mayor actividad biológica las 19-nortestosteronas homologadas con carbono 18 demostraron vida media mayor, por medio de un retraso en su desactivación metabólica respecto a compuestos

naturales que contienen 13-metilo, razones por las cuales fueron comercializados por encima de los compuestos naturales. (Edgren & Stanczyk, 2000)

El levonorgestrel recibió la aprobación por la FDA en 1982 y fue el primer anticonceptivo de emergencia que contenía solo progesterona, mostrando altos niveles de eficacia y ausencia de efectos adversos estrogénicos a diferencia de otros regímenes anticonceptivos de emergencia (DrugBank, 2022).

Este fármaco previene el embarazo al interferir con la ovulación, la fertilización y la implantación. La tableta anticonceptiva de emergencia que contiene solo levonorgestrel tiene una eficacia del 89 % si se usa de acuerdo con la información de prescripción dentro de las 72 horas posteriores a la relación sexual. Los dispositivos intrauterinos e implantables que liberan levonorgestrel tienen más del 99% de prevención del embarazo. Y finalmente, el levonorgestrel utilizado como componente de la terapia hormonal ayuda a prevenir el carcinoma endometrial (Alberta, 2022).

Gracias a su alta actividad desde los años 60's hasta la actualidad es un compuesto que se utiliza y es altamente efectivo en la anticoncepción femenina, así como en terapias hormonales.



**Figura. 1** Estructura en 2D de Levonorgestrel (progestágeno sintético) del lado izquierdo y progesterona (progestágeno natural) del lado derecho. (NCI, 2022)

### **1.1.1.2 Mecanismo de acción**

#### **1.1.1.2.1 Ovulación**

Los anticonceptivos orales que contienen levonorgestrel suprimen las gonadotropinas, inhibiendo la ovulación. Específicamente, el levonorgestrel se une a los receptores de andrógenos y progesterona, retardando la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo. Este proceso da como resultado la supresión del aumento fisiológico normal de la hormona luteinizante (LH) que precede a la ovulación inhibiendo la ruptura de folículos y la liberación de óvulos viables de los ovarios. Se ha demostrado que el levonorgestrel es más eficaz cuando se administra antes de la ovulación (Alberta, 2022).

#### **1.1.1.2.2 Cambios en la mucosa cervical**

Al igual que otros anticonceptivos que contienen levonorgestrel, las formas intrauterinas (DIU) de levonorgestrel probablemente previenen el embarazo al aumentar el grosor del moco cervical, interferir con el movimiento y la supervivencia de los espermatozoides e inducir cambios en el endometrio, donde generalmente se implanta un óvulo fertilizado. Se ha reportado que el levonorgestrel altera la consistencia de la mucosidad en el cuello uterino, lo que interfiere con la migración de los espermatozoides hacia el útero para la fertilización (Alberta, 2022). Este fármaco no es eficaz después de la implantación. Curiosamente, la evidencia reciente ha refutado la idea comúnmente aceptada de que el levonorgestrel cambia la consistencia del moco cervical cuando se toma durante un período corto, como en la anticoncepción de emergencia (Alberta, 2022). Sin embargo, durante un período a largo plazo se ha demostrado que el levonorgestrel espesa el moco cervical. En la actualidad el mecanismo de acción exacto del levonorgestrel no se comprende por completo y sigue siendo un tema de controversia e investigación en curso (Alberta, 2022).

#### **1.1.1.2.3 Efectos en la implantación**

La información de prescripción de los DIU de levonorgestrel indica que ejercen cambios morfológicos locales en el endometrio (por ejemplo, pseudodecidualización estromal, atrofia glandular) que pueden desempeñar un papel en su actividad

anticonceptiva (Alberta, 2022). Sin embargo, los efectos de levonorgestrel sobre la receptividad endometrial no están claros y la relevancia de este mecanismo para la eficacia terapéutica de levonorgestrel es polémica (Alberta, 2022).

#### **1.1.1.2.4 Terapia hormonal**

Al combinarse con estrógenos para el tratamiento de los síntomas de la menopausia y la prevención de la osteoporosis, el levonorgestrel sirve para reducir el riesgo carcinogénico de la terapia con estrógenos a través de la inhibición de la proliferación endometrial, la cual cuando no está regulada podría conducir a cáncer de endometrio después del uso de estrógenos (Alberta, 2022).

#### **1.1.1.3 Uso**

##### **1.1.1.3.1 Anticonceptivo de emergencia**

Está indicado para la prevención del embarazo después del fracaso confirmado o sospechado de los métodos anticonceptivos o después de una relación sexual sin protección. Se distribuye con receta para pacientes menores de 17 años y sin receta para mayores de edad. Este método anticonceptivo de levonorgestrel no está indicado para la anticoncepción regular y debe tomarse lo antes posible dentro de las 72 horas posteriores a la relación sexual. Este ha mostrado una menor eficacia cuando se usa dentro de las 96 horas. (Alberta, 2022)

##### **1.1.1.3.2 Anticonceptivo de largo plazo (Implante subdérmico, dispositivo intrauterino y tratamiento oral)**

El levonorgestrel se combina con otros anticonceptivos en formulaciones anticonceptivas diseñadas para uso regular, por ejemplo, con etinilestradiol, para su uso de no emergencia. Para su tratamiento oral se debe tomar todos los días durante 21 días un comprimido, se descansan 7 días donde vendrá la hemorragia por privación y se vuelve a comenzar el tratamiento en el día 8 y así sucesivamente (AEMPS, 2020). También, se utiliza en varios dispositivos intrauterinos liberadores de hormonas para la anticoncepción a largo plazo que varía de 3 a 5 años. Por ejemplo, en la etiqueta del producto Mirena® menciona específicamente que se recomienda en mujeres que han tenido al menos 1 hijo. También hay disponible un



implante subdérmico para la prevención del embarazo hasta por 5 años. (Alberta, 2022)

#### **1.1.1.3.3 Terapia Hormonal**

El levonorgestrel se prescribe en combinación con estradiol como terapia hormonal durante la menopausia para controlar los síntomas vasomotores y prevenir la osteoporosis. Aunque el levonorgestrel fue descubierto y utilizado como un fármaco anticonceptivo se le ha encontrado actividad para tratar la menorragia, la hiperplasia endometrial y la endometriosis. (Alberta, 2022)

### **1.1.2 Levonorgestrel y posible susceptibilidad a infecciones**

#### **1.1.2.1 Susceptibilidad a infecciones**

##### **Definición**

Planteamos la siguiente definición operativa: la susceptibilidad a infecciones es el grado de fragilidad interna de un sujeto, ya sea por cuestiones genéticas, ambientales, presencia de enfermedades, tratamientos farmacológicos, etc., para enfrentar una amenaza infecciosa y su posible impacto en su salud, debido a la ocurrencia de una infección.

##### **Infección**

Se denomina infección a un estado de enfermedad resultante de la invasión, multiplicación y crecimiento de un patógeno el cual es un agente vivo como bacterias, virus, parásitos y hongos que parasitan a las personas y animales (Salazar, Segovia, González, & Pérez, 2017). Una infección es considerada una amenaza importante para la salud y seguridad de las personas. Cuando una infección se considera menor el cuerpo es capaz de combatirlas en un corto plazo de tiempo, otras que son consideradas graves pueden incluso causar la muerte (Sorrentino & Remmert, 2020). Es importante poner especial cuidado en grupos de riesgo (personas inmunológicamente comprometidas, ej. Personas con cáncer,

personas con VIH, etc.); así como disminuir los factores de riesgo que pudiesen influir en la presencia de infecciones.

### **Cadena de infección**

Se define como la ruta que sigue el agente infeccioso desde la fuente de infección hasta quien es susceptible a ella. La cadena epidemiológica o de infección es un modelo práctico que permite reconocer cada uno de los eslabones que intervienen en el mecanismo de transmisión de una enfermedad, para identificar donde se puede actuar, aplicando medidas de prevención y control y de esta forma evitar su presencia. (Salazar, Segovia, González, & Pérez, 2017)

Para que una infección tenga lugar se necesita cinco factores esenciales: 1. Reservorio o fuente de infección (lugar de donde procede el agente infeccioso), 2. Puerta de salida (sitio del reservorio por donde sale el agente infeccioso), 3. Vía de transmisión de agente (desde el reservorio a un huésped potencial), 4. Puerta de entrada (sitio por donde penetra el agente al huésped) y 5. Huésped susceptible. (Salazar, Segovia, González, & Pérez, 2017)

### **Huésped susceptible**

Es el eslabón final de la cadena de infección o epidemiológica. La cual es la persona o ser vivo que puede adquirir la enfermedad por no tener resistencia, ni inmunidad o bien se encuentre alterada. La susceptibilidad dependerá de ciertas características y condiciones del huésped como son: edad, sexo, grupo étnico, herencia, comportamientos culturales, condiciones ambientales y geográficas, la nutrición, el equilibrio hormonal, la presencia de una enfermedad concurrente, tratamientos farmacológicos (como lo podría ser el levonorgestrel) e inmunidad adquirida. Siendo estos factores importantes en la contribución a la susceptibilidad del huésped frente a la exposición de patógenos específicos y a la respuesta del huésped. (Salazar, Segovia, González, & Pérez, 2017) Así, el levonorgestrel podría ser un factor que esté contribuyendo a la generación de susceptibilidad a infecciones en el paciente, aunque aún el mecanismo por el cual se suscita dicho efecto es desconocido.

### **1.1.3 Farmacovigilancia**

#### **1.1.3.1 Generalidades**

Una vez que un medicamento sale a la venta, éste permanece en la Fase IV (vigilancia post-mercado) de pruebas clínicas. A esta actividad de vigilancia se le conoce como farmacovigilancia, la cual es la ciencia y las actividades relativas a la detección, evaluación, comprensión y prevención de los efectos adversos de los medicamentos o cualquier otro problema relacionado con ellos (OPS, 2022).

Esta actividad tiene sus orígenes en la época temprana de los años 60's, después de la identificación de cientos de recién nacidos con presencia de focomelia, la cual se encontró tenían relación con la ingesta de talidomida, medicamento utilizado para disminuir las náuseas durante el embarazo. En 1961 en *The Lancet* se publica un reporte donde se describe e identifica estas malformaciones y realizan una pregunta pública a otros médicos sobre si se habían observado efectos similares en otros pacientes. A partir de este primer evento, la necesidad del establecimiento de un sistema permanente que permitiera observar el riesgo del uso de medicamentos era creciente, por lo que, en 1968, se crea el programa internacional de monitoreo de medicamentos de la OMS y se estableció con los primeros 10 países: Alemania, Australia, Canadá, Checoslovaquia, EE. UU., Holanda, Irlanda, Nueva Zelanda, Reino Unido y Suecia”, los cuales formaron parte el sistema de notificación espontánea de sospecha de RAM. (Montané & Santesmases, 2020)

Una vez que un fármaco sale al mercado cuenta con información limitada sobre su eficacia y seguridad porque la información proviene de forma mayoritaria de pruebas clínicas donde el número de pacientes es limitado y la duración de prueba es corta. Además, los grupos de prueba son seleccionados bajos ciertos criterios y evaluados en ciertas condiciones, los cuales si bien, se busca sean grupos representativos no se abarcan todas las condiciones que puede presentar cualquier paciente, por ello el monitoreo en el perfil de seguridad de un fármaco recientemente puesto a la venta es muy importante. Esta actividad de monitoreo conocida como farmacovigilancia

permite identificar RAMs, EAs, sospechas de RAMs (SRAMs) o cualquier otro problema de seguridad por periodos de ingesta prolongados e interacciones con otros fármacos (Secretaría de Salud, 2017). Esta seguridad no solo es evaluada en fármacos novedosos, si no, durante toda la vida del medicamento y si en algún momento el riesgo-beneficio es considerado poco favorable, se toman medidas, incluso llegando hasta la suspensión de la venta, en casos más graves. Cuando la decisión de retiro del mercado de un medicamento es tomada, la evidencia comúnmente no viene de casos aislados y lleva consigo 6 años de identificación y solo en algunos casos se retira globalmente. (Montané & Santesmases, 2020)

La forma más sencilla de generar señales farmacológicas es realizando reportes espontáneos de sospecha de RAM, RAM o EA, lo cual nos permite identificar nuevos problemas de seguridad. Esta actividad tiene ventajas como su facilidad y bajo costo lo que permite monitorear los RAMs y EAs sin interferir en las prescripciones. Sin embargo, una de sus principales limitantes es la ausencia o escases en el registro, propiciando retrasos en la detección del posible riesgo o del riesgo como tal.

Para la identificación de nuevos posibles riesgos con relación al uso de un medicamento está a cargo de los reportes de SRAMs, RAMs o EAs los profesionales de la salud (médicos, farmacéuticos y enfermeras). En 2012 Estados Unidos puso en funcionamiento FAERS, base de datos pública computarizada de la FDA, que ayuda a la vigilancia pos-comercialización monitoreando los nuevos eventos adversos y errores en la medicación. FAERS es una herramienta útil para la FDA para identificar y monitorear posibles riesgos. Los reportes subidos a esta plataforma son evaluados por el CDER y CBER para monitorear la seguridad de los medicamentos después de ser aprobados por la FDA. Si la FDA identifica un riesgo potencial se requiere de un estudio epidemiológico basado en la evaluación de la inquietud del posible riesgo. Y si en efecto se identifica la presencia de dicho riesgo, la FDA deberá tomar acciones regulatorias para mejorar la seguridad del producto y proteger la salud pública. Algunas de las medidas que se toman es subir la

información sobre los riesgos, restringiendo el uso del fármaco, informando a la comunidad actualizaciones sobre la información de seguridad, o en casos más extremos, removiendo el medicamento del mercado. (FDA, Adverse Events Reporting System Public Dashboard, 2022)

El acceso a los reportes sobre RAMs o EAs hacen posible identificar señales en farmacovigilancia, las cuales son definidas como la información notificada sobre una posible relación causal entre un suceso adverso y un fármaco, siendo previamente la relación desconocida o incompletamente documentada. (PAHO, 2014) Uno de los métodos usados para identificar estas señales es Razón de Notificación Proporcional (PRR). Método que mide la proporción de notificaciones en una base de datos que contienen una combinación particular de fármaco-evento, y compara esta proporción con la de notificaciones con el mismo evento, pero con el resto de los fármacos, en la misma base de datos. Así si el valor de PRR para una combinación de fármaco-evento particular es significativamente alta y no es una reacción conocida, puede representar una señal. (PAHO, 2014)

### **1.1.3.2 Implementación de herramientas computacionales en la Farmacovigilancia**

Hoy en día existen muchas herramientas en la web que nos permiten realizar búsquedas sistemáticas y análisis sobre un tema de interés, sin las cuales la ciencia no tendría los mismos avances. Y como toda ciencia, la Farmacovigilancia puede hacer uso de esta información para evaluar la seguridad de un medicamento, no sólo con el fácil acceso a los casos reportados por medio de bases de datos como FAERS de la FDA en Estados Unidos, European EudraVigilance® en Europa, FEDRA de SEFV en España y VigiBase™ database para todo el mundo (Montané & Santesmases, 2020). Si no, también a través de ensayos experimentales *in silico* por medio de las herramientas existentes para visualizar si una SRAM, RAM, EA o grupo de estas, están desencadenando una posible situación de riesgo para el paciente.

La importancia de hacer uso de este tipo de herramientas y de la implementación de la informática para estudios de farmacovigilancia es alta, debido a que la presencia de un evento adverso o grupo de eventos adversos puede estar asociada a muchos factores, por lo que su análisis no es trivial y es altamente costoso tanto para la industria como para las instancias encargadas de regular la seguridad en el uso de fármacos. Por ello, contar con herramientas o implementación de análisis lo suficientemente poderosos que puedan respaldar estudios experimentales es de gran ayuda.

La información que nos brindan las herramientas disponibles hoy en día es tal, que nos permite realizar ensayos *in silico* con un bajo costo de experimentación y con un alto grado de relevancia científica. Tal es el caso de la información presente en NCBI, base de datos nacional para la información biotecnológica de Estados Unidos, la cual es un repositorio de información sobre los avances en ciencia y salud dando acceso a información biomédica y genómica de forma pública y gratuita. NCBI a su vez cuenta con diferentes bases de datos que permiten encontrar información de diferentes categorías (Assembly, Biocollections, BioProject, BioSample, GEO DataSets, Books, etc.). En el caso de esta investigación se hizo uso de la herramienta GEO DataSets, la cual es un repositorio donde se encuentran disponibles los datos de investigaciones de diferentes tópicos, donde los autores de estos experimentos ponen a disposición pública sus datos para que sean aprovechados por otros investigadores. Es aquí cuando es posible reciclar los datos orientándolos a preguntas biológicas diferentes o bien confirmar los resultados por medio de otros análisis o usando las mismas herramientas de los propietarios de la información.

En farmacovigilancia se puede hacer uso de estas herramientas gracias a que hacen posible encontrar estudios relacionados al fármaco-suceso adverso de interés, su set de datos correspondiente y herramientas para procesar estos datos. Cuya implementación informática hace posible responder preguntas biológicas asociadas a la presencia del suceso adverso durante un tratamiento médico,

abaratando costos experimentales, ya que, si en un ensayo *in silico* se descubre que no tiene relevancia el suceso planteado como riesgoso por uso de un medicamento, existe un ahorro de recursos y tiempo, a diferencia si se hubieran desarrollado pruebas *in vivo* desde un inicio. Ambos factores (recursos y tiempo) importantes para garantizar la seguridad del uso de un medicamento y no sólo eso, también para los intereses de la industria y gobierno de los diferentes países.

Para realizar estos estudios *in silico* es necesario contar con habilidades informáticas, por lo que la participación de un analista de datos es importante para agilizar los análisis planteados en respuesta a las preguntas biológicas deseadas, ya que a pesar de contar con muchas herramientas disponibles en la red cuyos análisis se realizan de forma sencilla, muchas veces están limitadas y eventualmente quedan cortas para análisis o preguntas más complejas.

Con todo lo anterior, es posible reconocer la importancia de la realización de este tipo de análisis para identificar de forma temprana la existencia de señales durante el uso de un medicamento y en caso de presentarse dicha señal darle a conocer al paciente las medidas que debe tomar para llevar a cabo el uso racional del medicamento.

## 1.2 Planteamiento del problema

El levonorgestrel es una progestina sintética de segunda generación, el cual es utilizado en diversos métodos anticonceptivos: píldoras anticonceptivas, de emergencia, implantes subcutáneos y dispositivos intrauterinos (DrugBank, 2022). Este fármaco presenta un alto número de reportes de presencia de inflamaciones vaginales e infecciones durante el uso de este (EMBL, 2022) (FDA, FAERS, 2022). Por lo que al ser un fármaco ampliamente utilizado es de gran interés saber si el levonorgestrel es el responsable de la presencia de dichos sucesos infecciosos, que podrían ser un factor de riesgo en la salud de los usuarios.



## **1.3 Hipótesis**

El Levonorgestrel es capaz de propiciar susceptibilidad a infecciones vaginales.

## **1.4 Objetivo General**

Probar si el Levonorgestrel puede propiciar susceptibilidad a infecciones utilizando datos encontrados en bases de datos públicas, analizándolos por medio de herramientas computacionales y búsqueda sistematizada de la información.

### **1.4.1 Objetivos particulares**

-Evaluar si existe mayor riesgo de infecciones por uso de levonorgestrel comparado con otros fármacos.

-Aplicar distintas estrategias informáticas para realizar análisis del tipo expresión diferencial y análisis de enriquecimiento de vías para observar si existen cambios en la expresión de genes que desencadenen en infecciones, en los sets de datos encontrados.

-Analizar si la presencia de fármaco basado en progestinas altera la diversidad de la microbiota vaginal propiciando una posible susceptibilidad a infecciones.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Eventos adversos

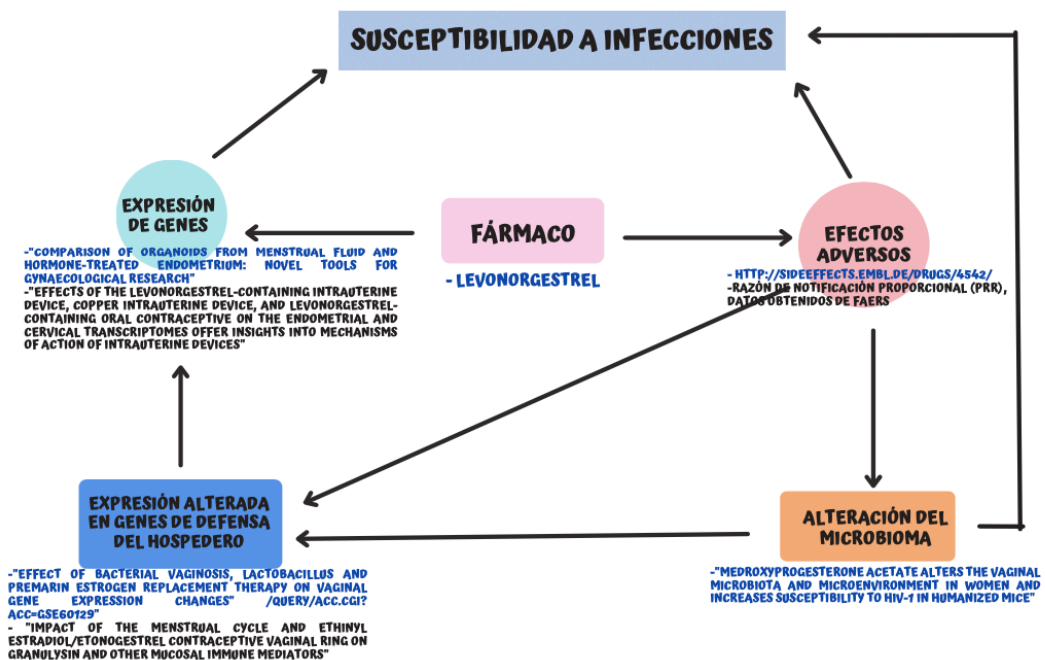
A partir de una búsqueda sistematizada en las bases de datos de SIDER 4.1 y FAERS se encontraron aquellos EAs reportados para Levonorgestrel asociados a susceptibilidad de infección. (EMBL, 2022) (FDA, FAERS, 2022)

Posteriormente se calculó la Razón de Notificación Proporcional (PRR) y se observó si este grupo de EAs tienen relevancia para este fármaco (levonorgestrel). (Américas, 2016)

### 2.2 Sets de datos utilizadas para el análisis

#### 2.2.1 Construcción de grafo causal

Para facilitar el análisis de los posibles factores que podrían contribuir a la presencia de una infección, se construyó un grafo causal (**Fig. 2**). Para ello, se definió el problema a resolver, en esta caso “susceptibilidad a infecciones por presencia del fármaco anticonceptivo Levonorgestrel en pacientes”. Después se identificaron los elementos críticos más importantes (efectos adversos y expresión de genes, expresión alterada de genes de defensa del hospedero y alteración del microbioma) y se identificaron las asociaciones que podrían contribuir a la presencia de susceptibilidad a infecciones para por medio de los análisis confirmar si se trataban de asociaciones tipo causa-efecto . Finalmente, cada uno de los elementos críticos identificados fueron alimentados con sets de datos (**Tabla 1.**) encontrados en GEO de NCBI. (NCBI, 2021)



**Figura.2** Grafo causal. Integrado por 4 puntos: **Expresión de genes** (Filby, Wyatt, Mortlock, Cousins, & al., 2021) y (Smith-McCune, Thomas, Averbach, Seidman, & al, 2020), **Efectos adversos** (FDA, FDA Adverse Events Reporting System Public Dashboard, 2022), **Expresión alterada en genes de defensa del hospedero** (Dahn, Saunders, Hammond, Carter, & al., 2018) y (Hughes, Pandey, Johnston, Marrazzo, & al., 2020) y **Alteración del microbioma** (Wessels, Lajoie, Cooper, Omollo, & al, 2019).

**Tabla 1.** Sets de datos encontrados para el análisis.

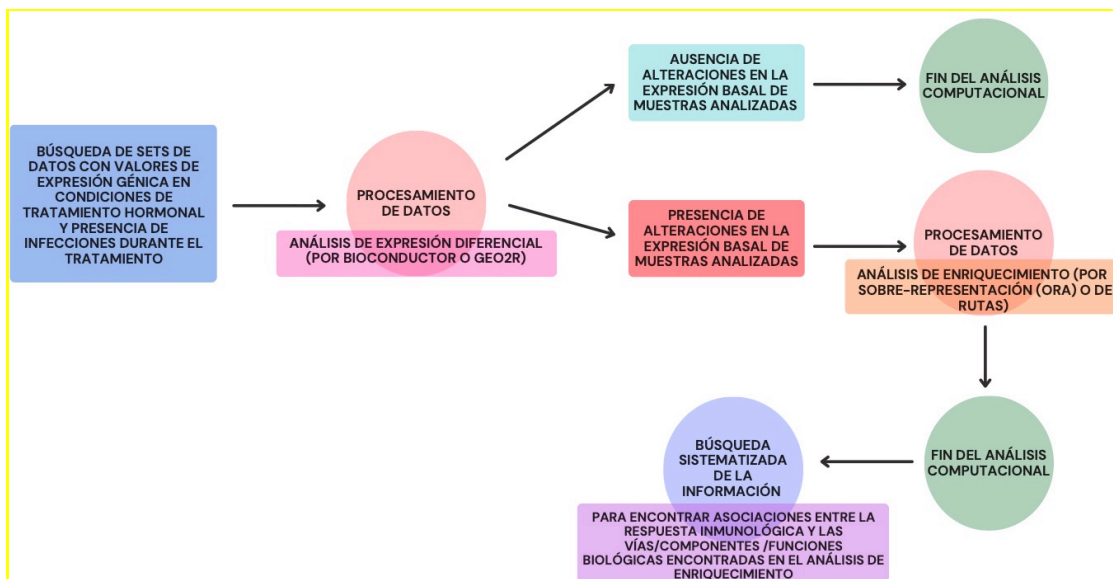
| Base de datos | Artículo  | Clave GEO | Tipo de experimento  |
|---------------|---|-----------|--|
| GEO de NCBI   | Comparison of organoids from Menstrual Fluid and Hormone-treated Endometrium: Novel tools for Gynaecological Research | GSE188915 | Perfiles de expresión mediante secuenciación de alto rendimiento |

|                        |   |           |   |
|------------------------|---|-----------|---|
| <b>GEO de<br/>NCBI</b> | Effects of the Levonorgestrel-<br>containing Intrauterine<br>Device, Copper Intrauterine<br>Device, and Levonorgestrel-<br>Containing Oral<br>Contraceptive on the<br>Endometrial and Cervical<br>Transcriptomes Offer Insights<br>into Mechanisms of Action of<br>Intrauterine Devices | GSE137765 | Generación de perfiles<br>de expresión por<br>matriz (Affymetrix)   |
| <b>GEO de<br/>NCBI</b> | Effect of bacterial vaginosis,<br>Lactobacillus and Premarin<br>estrogen replacement therapy<br>on vaginal gene expression<br>changes   | GSE113771 | Generación de perfiles<br>de expresión por<br>matriz (Affymetrix) y<br>electroforesis en gel<br>de gradiente<br>desnaturalizante y<br>puntuación Nugent<br>para identificar<br>bacterias.   |
| <b>GEO de<br/>NCBI</b> | Impact of the menstrual cycle<br>and ethinyl<br>estradiol/etonogestrel<br>contraceptive vaginal ring on<br>granulysin and other mucosal<br>immune mediators   | GSE142058 | Generación de perfiles<br>de expresión por<br>matriz, expresión<br>génica medida<br>utilizando<br>microarreglos Illumina<br>Human HT12 v4<br>BeadChip. Las<br>mujeres fueron<br>sometidas a pruebas<br>de seropositividad<br>para HSV-2 y |

vaginosis bacteriana  
mediante la  
puntuación de Nugent

|                    |  |           |   |
|--------------------|--|-----------|---|
| <b>GEO de NCBI</b> | Medroxyprogesterone acetate alters the vaginal microbiota and microenvironment in women and increases susceptibility to HIV-1 in humanized mice. | GSE138971 | Los perfiles bacterianos se generaron mediante la secuenciación del gen 16S rRNA utilizando la plataforma Illumina MiSeq. |
|--------------------|--|-----------|---|

### 2.3 Expresión de genes y expresión alterada en genes de defensa del hospedero.



**Figura. 3** Diagrama que describe los pasos a seguir en la sección análisis de expresión diferencial y expresión alterada en genes de defensa del hospedero.

### 2.3.1 Análisis de expresión diferencial

La expresión génica diferencial es el proceso mediante el cual las células son capaces de decodificar la información contenida dentro del material genético (ácidos nucleicos) para la elaboración del producto génico necesario para el buen funcionamiento de un organismo. El proceso más utilizado para revelar este producto génico es el RNA-Seq, a partir del cual se puede realizar el análisis de expresión diferencial que nos permite detectar aquellos genes que son diferencialmente expresados respecto a una condición de control. (Giménez, 2017)

En este caso experimental se hizo uso de la metodología computacional conocida como DESeq2, paquete de bioconductor dedicado a este tipo de análisis usado ampliamente (Gatto, 2022). Para poder realizar estos análisis primero se identificaron los sets de datos de interés (**Fig. 3**), los cuales nos brindaron valores de expresión para las condiciones evaluadas (muestras con y sin tratamiento hormonal y muestras con y sin presencia de infecciones).

El punto de partida del análisis es tener una matriz de conteo que incluya todas las muestras a analizar con los valores de abundancia de los genes de interés para cada una de las muestras.

Primero, DESeq2 toma esta matriz de conteo sin procesar y estima los factores de escala. Toma los valores de nuestro interés que son valores de abundancia de los genes y de igual forma otra información que a simple vista es menos relevante como el tamaño del gen, la secuencia de las bases, la profundidad de la secuenciación o la composición de la librería, lo que permitirá estimar los factores a escalar por medio de un método de normalización conocido como el “método de la razón de la mediana”, haciendo posible que los niveles de expresión sean más comparables entre sí. Para llevar a cabo esta normalización primero el método computacional DESeq2 construye una muestra pseudo-referencia por medio del cálculo de la media geométrica por filas de los valores de abundancia, haciendo uso de la media geométrica en lugar de la clásica, debido a que en la media geométrica los valores logarítmicos nos permiten valores más robustos y menos influenciados por los

valores de los extremos. Luego, son calculados para cada gen en cada muestra las proporciones de los conteos frente la muestra de pseudo-referencia. Después, se toma el valor de la mediana de todas las proporciones para cada muestra dada y finalmente los valores de conteo se obtienen dividiendo cada valor de fila de una muestra dada entre el factor de escalamiento antes obtenido. (Gatto, 2022)

Segundo, se estima las dispersiones genéticas y se reducen estas estimaciones para generar estimaciones más precisas de dispersión para modelar los conteos. La dispersión es una medida que nos permite observar qué tan variables son nuestros datos entre sí. En el caso de niveles de expresión génicos y debido a las condiciones que se tienen en los laboratorios, donde lo más común es hacer mediciones por triplicado, DESeq2 lo que hace para estimar la dispersión de forma fiable a pesar del limitado número de ensayos es hacer la suposición que los genes con niveles de expresión similares tienen dispersiones semejantes y usará la información proveniente de otros genes expresados en niveles similares. Primero se estima la dispersión para cada uno de los genes usando la estimación de máxima verosimilitud, el cual escoge como valor estimado aquél que tiene mayor probabilidad de ocurrir en función del nivel de expresión medio (conteo medio de las réplicas). Lo que nos da el gráfico de dispersión donde cada punto representa cada gen. Después se ajusta una curva a las estimaciones de dispersión genética, que representa la estimación del valor de dispersión esperado para genes de una fuerza de expresión dada, lo que nos permite comparar la variabilidad de todos los genes analizados. Finalmente, se realiza la reducción de las estimaciones de dispersión genética (mediante un enfoque empírico de Bayes) hacia los valores predichos por la curva, donde la contracción es importante para reducir los falsos positivos en el análisis de expresión diferencial. (Gatto, 2022)

Por último, DESeq2 ajusta todo a un modelo lineal generalizado, lo que nos permite calcular el  $\log_2$ Fold-Change, valor que cuantifica las veces de cambio entre muestras control y el tratamiento, así siendo posible realizar pruebas de hipótesis donde podemos determinar si un gen está expresado de forma diferencial respecto

a las muestras control, donde la hipótesis nula ( $H_0$ ) es que no existe expresión diferencial dándonos un valor de  $\log_2FC=0$ , estas pruebas serán estadísticamente probadas por el test de Wald el cual determinará si los datos proporcionan evidencia suficiente para concluir que este valor es realmente cero, lo que le brindará confiabilidad al análisis. (Gatto, 2022)

El test de Wald divide el valor de  $\log_2FC$  entre su error estándar, resultando en un valor estadístico conocido como estadístico-z (unidad tipificada, variable centrada reducida, variable estandarizada o normalizada que se utiliza en estadística para comparar datos procedentes de diferentes muestras o poblaciones y se define como el número de desviaciones típicas que un valor dado toma con respecto a la media de su muestra o población) (Benzecri & Colaboradores, 1976). Este valor z es comparado con un estándar de distribución normal y el valor de p (valor estadístico calculado que es posible dada un hipótesis nula cierta) es computarizado reportando la probabilidad de que una estadística-z al menos tan extrema como el valor observado sea seleccionado al azar. En principio, si este valor de p es pequeño (por debajo de un límite determinado), se rechaza la hipótesis nula y se notifica que en efecto existe una expresión diferente a la basal con confiabilidad estadística (Gatto, 2022). Es así como se puede determinar qué genes están expresados de forma diferencial en una condición experimental específica respecto a un control.

Para poder observar los resultados de los análisis diferenciales de forma sencilla y gráfica se construyeron diagramas de volcán (volcano plot), los cuales nos permiten observar la dispersión que muestra la significancia estadística (valor P) frente a la magnitud de las veces de cambio ( $\log_2FC$ ). Este permite la identificación visual rápida de genes con grandes cambios de pliegue ( $\log_2FC$ ) que también son estadísticamente significativos. En este tipo de diagramas los genes más regulados a la alta están hacia la derecha, mientras que los genes más regulados a la baja están hacia la izquierda y los genes estadísticamente más significativos hacia arriba, los cuales normalmente están identificados con otro color. (Doyle, 2021)



En el caso de aquellos análisis de expresión diferencial realizados en el programa GEO2R de NCBI (**Fig. 3**) el diagrama de volcán utiliza valores de corte de p.adj el cual nos indica cuáles comparaciones entre los niveles de los factores dentro de una familia de comparaciones (pruebas de hipótesis) son significativamente diferentes. Si el valor de p ajustado es menor que el nivel de significancia (alfa), se rechaza la hipótesis nula y en este caso se muestra que existe una expresión diferencial alterada ya sea a la alta o a la baja. A diferencia del valor de p regular, p.adj se utiliza para comparaciones múltiples en donde la tasa de error por familia aumenta en cada comparación adicional, el valor de p ajustado representa así la menor tasa de error por familia a la cual se rechazaría una hipótesis nula en particular, lo que brinda mayor confiabilidad en los resultados cuando se realizan comparaciones múltiples. (Minitab Statistical, 2021)

Para esta parte se analizaron cuatro sets diferentes, los dos primeros evaluando si la expresión de los genes se veía alterada en una condición de tratamiento anticonceptivo y en los dos análisis posteriores se evaluó cómo se veía alterada la expresión en una condición de infección y tratamiento. (**Tabla 2**)

En los casos donde se identificaron alteraciones en la expresión génica (**Fig. 3**) se realizaron análisis de enriquecimiento y búsqueda sistematizadas en la red para identificar si estas alteraciones tenían alguna relación con la respuesta inmunológica.

### **2.3.2 Análisis de enriquecimiento**

Este tipo de análisis tiene como principal objetivo analizar la información obtenida de tecnologías de secuenciación masiva. Estos métodos están diseñados para facilitar el análisis de listas de genes alterados que de forma aislada no brindan ningún contexto biológico, siendo estas herramientas capaces de encontrar significado biológico a un conjunto de genes alterados identificados con tecnologías de secuenciación masiva en una condición experimental dada. (García, Espinal, &

Hernández, 2015) En nuestro caso particular, este análisis ayudó a encontrarle significado biológico al conjunto de genes alterados debido a la presencia del Levonorgestrel en el organismo, permitiendo la identificación de funciones alteradas cuya repercusión podría ser inmunológica.

A continuación, se describe de forma general los datos necesarios requeridos y cómo se realizan este tipo de análisis.

### ***Información de entrada***

Esta fase consiste en la preparación de dos sets de datos: 1. Los resultados obtenidos de la secuenciación masiva (ej. lista de genes alterados obtenidos a partir de un análisis de expresión diferencial). 2. Los datos de las vías, que son extraídos de bancos de datos de proteínas (PDBs), en donde el análisis se llevará a cabo. Estos dos sets de datos serán la entrada de cualquier método virtual que seleccionemos. (García, Espinal, & Hernández, 2015)

### ***Análisis***

Este paso consiste en toda la computación estadística y matemática que se llevará a cabo por el método de enriquecimiento. Cada método puede diferir en los algoritmos utilizados, sin embargo, todos tienen el mismo fin, probar la posibilidad que cualquier ruta dada esté representada por la secuenciación masiva, lo que da como resultado la identificación de rutas que tienen la posibilidad más pequeña de ser representadas por datos generados aleatoriamente. (García, Espinal, & Hernández, 2015)

El software de análisis de enriquecimiento puede encontrarse de tres diferentes formas: como un software independiente, como una aplicación web y como paquetes de programación. En este experimento se utilizó la herramienta web conocida como WebGestalt y el paquete de programación de R “Bioconductor” por medio de GAGE Pathview. (García, Espinal, & Hernández, 2015)

### ***Información de Salida***

Esta fase consiste básicamente en visualización y análisis de los resultados. Normalmente los resultados son presentados en una clasificación de rutas relevantes, de las cuales las principales están comúnmente ordenadas por valores de confianza como valor de  $p$  o el valor corregido múltiple valor- $q$ . (García, Espinal, & Hernández, 2015)

#### **2.3.2.1 Análisis de enriquecimiento basado en sobrerrepresentación (ORA).**

La hipótesis básica de este tipo de análisis de enriquecimiento es que las vías relevantes pueden ser detectadas si la proporción de genes expresados diferencialmente dentro de una vía dada excede la proporción de genes que podrían expresarse aleatoriamente. (García, Espinal, & Hernández, 2015)

Los valores de entrada en los métodos ORA son los resultados obtenidos de un análisis de secuenciación masiva en forma de listas de corte derivadas del análisis de expresión y los datos en formato de conjunto de genes. Los genes seleccionados se mapean en las vías y la evaluación estadística de cada vía se realiza mediante diferentes pruebas. Algunas de estas pruebas estadísticas que nos brindan valores de confianza a nuestros resultados son: distribución hipergeométrica, chi-cuadrado, probabilidad binomial, la prueba de Fisher, etc. (García, Espinal, & Hernández, 2015)

La herramienta utilizada en este experimento para este análisis fue WebGestalt. La cual funciona sobre la base de la integración de la ORA con varios PDBs públicos. Una vez que cargas la herramienta con la lista de genes de interés es posible analizar los datos en diferentes contextos biológicos: metabólico, ontología génica, gen-fenotipo, gen-enfermedad, asociación gen-fármaco, etc. De esta forma es posible reconocer la relación biológica de la alteración de los genes identificados, aunados a un valor de confianza expresado en tasa de descubrimiento falso (FDR), y proveer de información suficiente para el planteamiento de nuevas hipótesis. En

nuestro caso fue de gran ayuda ya que, el contexto biológico analizado fue ontología génica en todas las categorías de enriquecimiento (Ver **Tabla 10**), lo que nos brindó un contexto biológico de las alteraciones de genes encontrados en presencia del fármaco y nos permitió la búsqueda de relaciones en el contexto de presencia de susceptibilidad a infecciones.

### **2.3.2.2 Análisis de rutas en GAGE Pathview de Bioconductor de R studio**

Para el análisis de rutas se utilizó Gage, método establecido que nos permite analizar conjuntos de genes (enriquecimiento) o el análisis de rutas. Este tipo de análisis de conjuntos de genes es una estrategia poderosa para inferir los cambios en función y mecánicos de experimentos de microarreglos o de secuenciación. Gage es capaz de analizar la coordinada expresión diferencial en un conjunto de genes (grupos de genes predefinidos los cuales se ha encontrado funciones relacionadas) en lugar de los cambios individuales que puede sufrir un gen en una condición dada. Los grupos de genes usados más comúnmente son aquellos derivados de vías KEGG, genes en términos de ontología, grupos de genes que comparten funciones, incluidos reguladores transcripcionales comunes (factores de transcripción, pequeños ARN de interferencia o siARN, etc.). (Weijun, 2022)

Para llevar a cabo este análisis es necesario asegurarse que los grupos de genes predefinidos por GAGE, en nuestro caso se usó el set de datos de genes de humano, solamente tomando rutas metabólicas y de señalización, y nuestros datos de expresión (con sus respectivas columnas con valores estadísticos) estén usando el mismo sistema de identificación (Entrez Gene ID, Símbolo del gen, etc.). En caso de tener identificadores diferentes es necesario igualarlo por medio de conversión de identificadores. Es importante saber que cada matriz de resultados contiene múltiples columnas de estadísticas de prueba y valores de p/q para todos los conjuntos de genes probados. (Weijun, 2022)

Para correr la prueba, además es necesario que Gage tenga un vector nombrado para los valores de veces de cambio, donde el nombre de cada valor ya tiene el

mismo identificador de los grupos de genes predefinidos y ahora sí, es posible correr el análisis de rutas de nuestro programa. Para los resultados nosotros utilizamos un filtro de valor “same.dir=TRUE” el cual nos brindó los resultados del análisis en dos listas diferentes de rutas, las reguladas a la alta y a la baja. Donde cada ruta alterada tiene valores estadísticos como (p.geomean, stat.mean, p.val, q.val, el tamaño del set, etc.) importantes para identificar la relevancia del análisis. Después se procedió a tomar las 5 rutas reguladas a la alta para obtener los gráficos de las alteraciones de las vías por medio de “Pathview”. (Turner, 2015)

**Tabla 2.** Análisis realizados a los set de datos agrupados en expresión de genes y expresión alterada de genes del hospedero

| Sección del grafo causal | Análisis | Clave GEO | Análisis Realizado  | Condiciones evaluadas  | Herramienta      | Parámetro                           |
|--------------------------|----------|-----------|---|--|------------------|-------------------------------------|
| Expresión de genes       | I        | GSE188915 | Análisis de expresión diferencial en tejido endometrial   | Diferencias en la expresión génica en sujetos bajo ningún tratamiento vs. tratamiento con Levonorgestrel   | DESeq2           | P.adj<0.1                           |
|                          |          |           | Análisis de vías de genes alterados en presencia de levonorgestrel  | Identificación de posibles vías biológicas afectadas por la presencia del fármaco.   | GAGE y Pathview. | Top 5 de vías mayormente alteradas. |
|                          | II       | GSE137765 | Análisis de expresión diferencial en tejido endometrial y cervical  | Diferencias en la expresión génica en sujetos bajo ningún tratamiento vs. tratamiento oral con Levonorgestrel  | GEO2R de NCBI    | P.adj<0.1                           |
|                          |          |           | Análisis de enriquecimiento basado en un análisis de sobrerrepresentación (ORA) de los genes alterados en presencia del fármaco | Observar si el conjunto de genes expresados a la alta como a la baja por la presencia del fármaco estaban sobrerrepresentados en algún proceso/función/componente biológico. | WebGestalt       | FDR≤0.05                            |

|  |     |           |   |  |                |                                       |
|--|-----|-----------|---|--|----------------|---------------------------------------|
| Expresión alterada en genes de defensa del hospedero | III | GSE113771 | Análisis de expresión diferencial de genes vaginales en presencia de infecciones bajo tratamiento con Premarin                  | Diferencias en la expresión génica en sujetos bajo ningún tratamiento vs. tratamiento hormonal oral y con y sin presencia de infecciones.  | GEO2R de NCBI  | P.adj<0.05                            |
|  |     |           | Análisis de enriquecimiento basado en un análisis de sobrerrepresentación (ORA) de los genes alterados en presencia del fármaco | Observar si el conjunto de genes expresados al alta como a la baja por la presencia del fármaco anticonceptivo hormonal estaban sobrerrepresentados en algún proceso/función/componente biológico. | WebGestalt     | FDR≤0.05                              |
|  | IV  | GSE142058 | Análisis de expresión diferencial de genes vaginales en presencia de infecciones con anillo vaginal (estradiol/etonogestrel)    | Diferencias en la expresión génica en sujetos bajo ningún tratamiento vs. tratamiento hormonal anticonceptivo y con y sin presencia de infecciones.  | GEO2R y DESeq2 | P.adj<0.01<br>P.adj<0.05<br>P.adj<0.1 |

1.0 Para el set de datos I (Ver **tabla 2**) como antes se mencionó se realizó una comparación entre los perfiles de expresión, con un valor de corte de  $P_{adj} < 0.1$ , presentes en muestras de tejido endometrial sin tratamiento ( $n=2$ ) y con tratamiento hormonal (Levonorgestrel) ( $n=3$ ), (Filby & Mortlock, 2021). Una vez identificados los genes expresados diferencialmente se procedió a realizar un análisis de vías para identificar posibles vías biológicas afectadas por la presencia del fármaco. (Turner, 2015)

2.0 Para el set de datos II (Ver **tabla 2**) se realizó una comparación entre los perfiles de expresión presentes, con un valor de corte de  $P_{adj} < 0.05$  en muestras de tejido endometrial ( $n=11$ ) y de tejido cervical sin tratamiento ( $n=12$ ) y con tratamiento hormonal Levonorgestrel ( $n=12$  para tejido endometrial y  $n=14$  para tejido cervical). Este análisis se realizó utilizando GEO2R, herramienta web de NCBI desarrollada para realizar análisis de expresión diferencial de distintos experimentos. Las muestras que fueron probadas fueron solamente las

muestras identificadas con tratamiento oral, esto para evitar las posibles alteraciones que se podrían presentar por la presencia de un dispositivo y no por la presencia del principio activo Levonorgestrel, que es el de interés para este análisis. (Smith-McCune, y otros, 2020) (NCBI, 2021)

A partir de un análisis de sobrerrepresentación (ORA), realizado en WebGestalt, se identificó si el conjunto de genes expresados a la alta como a la baja por la presencia del fármaco estaban sobrerrepresentados en algún proceso/función/componente biológico. Después, por medio de una búsqueda sistemática de la información se encontraron para algunos casos asociaciones con el funcionamiento del sistema inmunológico lo que creemos podría estar propiciando cierta susceptibilidad a infecciones. (NIH/NVI, 2019)

3.0 Para el análisis realizado para el set de datos III (Ver **tabla 2**) se realizó una comparación entre los perfiles de expresión génica de sujetos posmenopáusicas que recibían terapia de reemplazo de estrógeno Premarin (ERT) con y sin vaginosis bacteriana (VB), en comparación con muestras sin tratamiento con y sin VB, para examinar cualquier correlación entre el estado infeccioso (VB) en presencia del tratamiento que sugiriera algún tipo de alteración génica de los sujetos, este análisis por medio de la herramienta **GEO2R**.

Para este análisis de expresión diferencial fue necesaria la construcción de una matriz de contrastes (**Tabla 3.**) a partir de los resultados encontrados en la tabla 2 del artículo de (Dahn, y otros, 2008), donde aquellos que en la prueba Nugent se determinaron como intermedios (leve presencia de VB) se agruparon en el grupo de presencia de vaginosis bacteriana. Las muestras utilizadas fueron usadas según se encontraban disponibles en el set de datos de GEO de NCBI y fueron categorizadas para su posterior análisis. (**Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6 y Tabla 7.**) (Reid, y otros, 2018)

**Tabla 3.** Matriz de contrastes de los perfiles analizados.

| Análisis | A: Vaginosis |                | B: Vaginosis |                |
|----------|--------------|----------------|--------------|----------------|
|          | Bacteriana   | A: tx_hormonal | Bacteriana   | B: tx_hormonal |
| I        | 0            | 0              | 1            | 0              |
| II       | 0            | 0              | 0            | 1              |
| III      | 0            | 1              | 1            | 1              |
| IV       | 0            | 0              | 1            | 1              |

El valor 0 representa ausencia del fenómeno identificado y 1 la presencia de este.

**Tabla 4.** Muestras control sin tratamiento hormonal (**Vaginosis:0** y **Tx:0**)

| Número de Control | Nugent |
|-------------------|--------|
| 8002              | Normal |
| 8016              | Normal |
| 8017              | Normal |

**Tabla 5.** Muestras con VB sin tratamiento hormonal (**Vaginosis:1** y **Tx:0**)

| Número de Control | Nugent     |
|-------------------|------------|
| 8001              | VB         |
| 8004              | VB         |
| 8011              | VB         |
| 8014              | Intermedio |
| 8019              | VB         |

**Tabla 6.** Muestras con tratamiento hormonal sin VB (**Vaginosis:0** y **Tx:0**)

| Número de Control | Nugent |
|-------------------|--------|
| 8006              | Normal |
| 8008              | Normal |
| 8013              | Normal |
| 8015              | Normal |

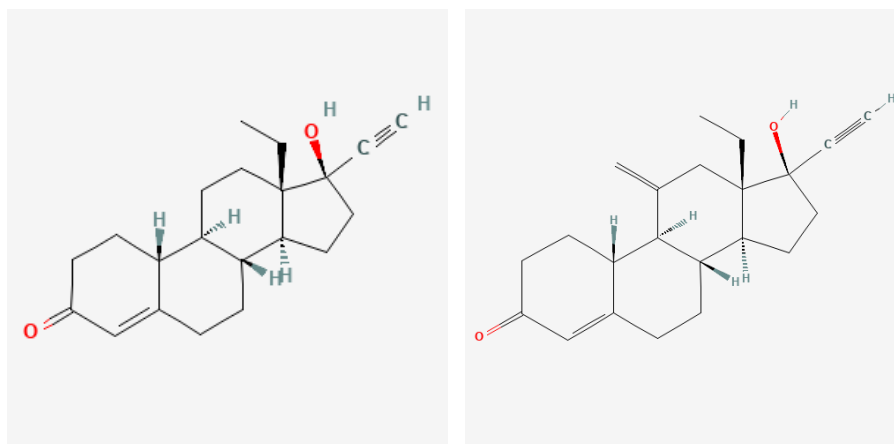


**Tabla 7.** Muestras con tratamiento y con VB (**Vaginosis:1 y Tx:1**)

| <b>Número de Control</b> | <b>Nugent</b> |
|--------------------------|---------------|
| <b>8003</b>              | Intermedio    |
| <b>8012</b>              | Intermedio    |

4.0 Se analizó el IV set de datos para evaluar si la expresión de genes asociados a defensa de agentes patógenos y a la respuesta inmunológica están alterados. Se realizaron análisis de expresión diferencial entre los perfiles de expresión génica de genes presentes en muestras del endocérnix en sujetos durante las diferentes fases del ciclo menstrual (fase lútea (n=23 muestras) y fase folicular (n=35 muestras)) cada una de estas fases comparados con los genes expresados en una condición de tratamiento hormonal (n=17 muestras). Este análisis se realizó para identificar aquellos genes con relación a granulismo y mediadores inmunes para probar si estos factores se podían ver modificados por la presencia del fármaco.

Se eligió este set de datos que, si bien no es el ideal ya que, no se está analizando como tal el fármaco de interés levonorgestrel, se trata de una progestina muy similar al levonorgestrel el etonogestrel el cual es utilizado con el mismo fin que el levonorgestrel como fármaco anticonceptivo y tiene una estructura química similar, solo se diferencian por la presencia de un metileno en el carbono 11. (**Fig. 4**)



**Figura. 4** Estructura en 2D de Levonorgestrel (progestágeno sintético) del lado izquierdo y etonogestrel (progestágeno sintético) del lado derecho. (NCI, 2022)

## 2.4 Alteración del microbioma vaginal.

Con el fin de evaluar los cambios en la microbiota vaginal se evaluó la diversidad en muestras de personas sin tratamiento anticonceptivo y con tratamiento anticonceptivo basado en progestinas, los datos fueron obtenidos a partir de una tabla OTU tomada del artículo "Medroxyprogesterone acetate alters the vaginal microbiota and microenvironment in women and increases susceptibility to HIV-1 in humanized mice", la cual contiene el número de lecturas por muestra de las distintas bacterias que conforman la microbiota vaginal de personas bajo distintas condiciones: 1. Sin tratamiento hormonal (NH) (n=22) y 2. Anticonceptivo basado en progestina (DMPA) (n=22), fármaco de la misma naturaleza que el levonorgestrel (Wessels & Kaushic, 2019). Con los valores de lectura de esta tabla OTU fue posible calcular el índice de Shannon (H) para cada grupo con sus respectivas muestras.

El índice de Shannon (H) es un valor que sirve para cuantificar la biodiversidad específica. Este índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre dos factores: 1. El número de especies presentes y 2. Su abundancia relativa. De forma conceptual es una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo en la comunidad. Es decir, si una comunidad de S especies

es muy homogénea (hay una especie claramente dominante) y las que restan S-1 están a penas presentes, el grado de incertidumbre será menor que si todas las S especies fueran igual de abundantes. Lo que al calcular el índice a valores cercanos a 1 reflejaran mayor abundancia de determinada especie en una muestra, mientras que, si S número especies presentes tienen valores semejantes de H, reflejara mayor heterogeneidad en la comunidad analizada. (Pla, 2006)

La fórmula para calcular el índice de Shannon es la siguiente:

$$H = - \sum_{i=1}^S \pi_i \ln \pi_i$$

Donde:

S = número de especies identificadas en la población analizada

$\pi_i$  = Abundancia relativa de la especie  $i$  ( $\frac{n_i}{N}$ )

$n_i$  = número de individuos de la especie  $i$

$N$  = número de todos los individuos de todas las especies identificadas en la población

Este cálculo se realizó con el software PAST 4.03, programa que permite realizar análisis científicos complejos, como el cálculo del índice de Shannon, entre otros. (Ryan, Harper, & Whalley, 2022)

Una vez obtenidos los índices de Shannon (H) de cada una de las muestras de cada grupo se construyó, un diagrama de caja (Box Plot) para poder visualizar qué tan heterogéneo era cada grupo y finalmente se procedió a calcular si existía diferencia significativa entre las medias de cada grupo por medio de una prueba t Student.

## 3. Resultados

### 3.1 Eventos adversos de Levonorgestrel

Según lo encontrado en la base de datos FAERS de la FDA en Febrero del 2022, el levonorgestrel presentaba 201,555 casos reportados de EA, de los cuales 7,738 pertenecen al grupo de EAs infección/infestación. Entre este grupo de EAs se encuentran las reacciones identificadas como infección, infección de vías urinarias, vaginosis bacteriana, infección por hongos, infección vaginal, infección micótica vulvovaginal, infección bacteriana, infección uterina, infección por clamidia, vulvovaginitis bacteriana, enfermedad inflamatoria pélvica, entre otras. (FDA, FAERS, 2022)

### 3.2 Relevancia del grupo de EAs de estudio para el fármaco

Se cálculo el PRR para conocer la relevancia de la presencia del grupo de EAs de interés (Infección/Infestación) para el fármaco Levonorgestrel. El PRR obtenido para este fármaco fue de 8.9 (**Fig. 5**), los datos para este cálculo fueron obtenidos y calculados a partir de la base de datos FAERS de la FDA. (**Tabla 8.**)

$$\text{Cálculo del PRR} = \frac{\frac{a}{a+b}}{\frac{c}{c+d}} = \frac{\frac{7,738}{201,555}}{\frac{100,711}{23,462,225}} = 8.94391$$

**Figura. 5** Medición de la proporción de notificaciones en la base de datos de FAERS que contiene la combinación fármaco evento Levonorgestrel-infecciones/invasiones (FDA, FAERS, 2022). (Américas, 2016)

**Tabla 8.** Tabla de contención (2x2) de Levonorgestrel y el EA (infecciones/invasiones)

| ICSR                          | ICSR de EA<br>infección/infestación | ICSR de EA no<br>infección/infestación | Total             |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|-------------------|
| <b>Con<br/>Levonorgestrel</b> | a= 7,738                            | b= 193,817                             | 201,555           |
| <b>Resto de fármacos</b>      | c=100,711                           | d= 23,361,514                          | 23,462,225        |
| <b>Total</b>                  | 108,449                             | 23,555,331                             | <b>23,663,780</b> |

Donde a=ICSR de EA de interés con el fármaco de interés, b=ICSR de EAs reportadas(fármaco) – EA de interés, c= ICSR de EA de interés -ICSR del fármaco de estudio y d= ICSR de EAs que no forman parte del fármaco de interés y no se tratan de la EA de interés (Américas, 2016). (FDA, FAERS, 2022)

### **3.3 Expresión alterada de genes durante el tratamiento con Levonorgestrel.**

#### **3.3.1 Análisis de expresión diferencial, enriquecimiento de vías y análisis de enriquecimiento basado en un análisis de sobrerrepresentación (ORA) en muestras de tejido endometrial y cervical de sujetos en tratamiento con Levonorgestrel.**

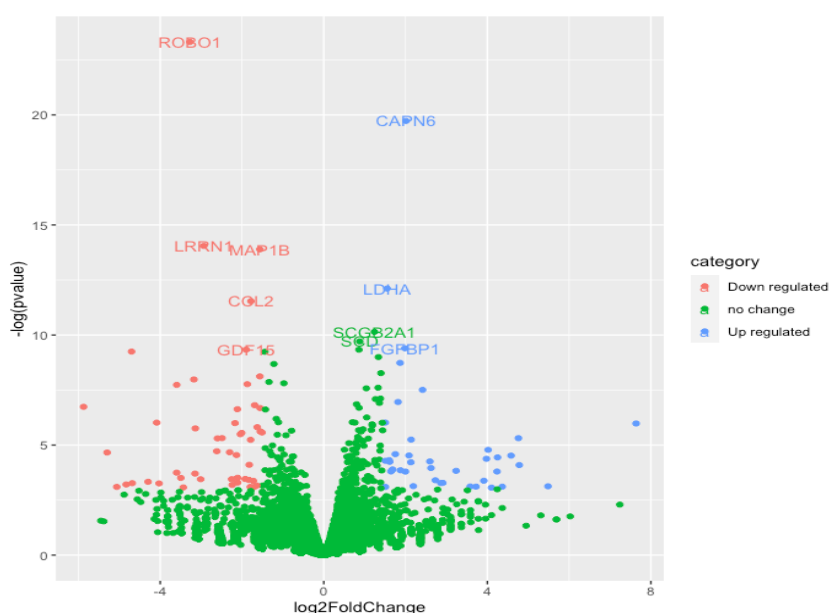
Se realizaron análisis de expresión con el fin de identificar alteraciones a nivel genético por presencia del fármaco levonorgestrel en tejidos vaginales (cérvix y endometrio), se tomó la decisión de analizar las alteraciones a nivel genético porque los datos de genes nos brindan la posibilidad de realizar comparaciones en todo el espacio farmacológico e incluso es posible comparar con otros fármacos.

Una vez se obtuvo la lista de genes alterados fue necesario recurrir a herramientas que nos permitieran realizar análisis de enriquecimiento con el fin de obtener análisis funcionales que nos acercan a la relación mecanística de la presencia de estas alteraciones génicas, lo que nos permite preguntarnos si tienen relación con

la respuesta inmunológica, dando como resultado la posible presencia de susceptibilidad a infecciones.

### 3.3.1.1 Análisis de expresión diferencial GSE188915

Se analizó la presencia de alteraciones en la expresión genética durante el uso de levonorgestrel. Se observa la presencia de una baja cantidad de alteraciones (Ver **Fig. 6**) en el orden de centenas de genes, los cuales algunos están expresados a la baja (color rojo) mientras otras a la alta (color azul).



**Figura. 6** Volcano plot de análisis de expresión diferencial (set de datos GSE188915) muestras de tejido endometrial con y sin tratamiento hormonal (levonorgestrel) con parámetros de log2FoldChange de >1.5 para regulados a la alta y <-1.5 para aquellos regulados a la baja y un valor de P.adj<0.1 para ambas condiciones. (Filby, Wyatt, Mortlock, Cousins, & al., 2021)

#### 3.3.1.1.1 Análisis de enriquecimiento de vías para el conjunto de genes expresados diferencialmente GSE188915

Las cinco vías biológicas mayormente afectadas identificadas por la presencia del levonorgestrel se encuentran descritas en la **Tabla 9**.

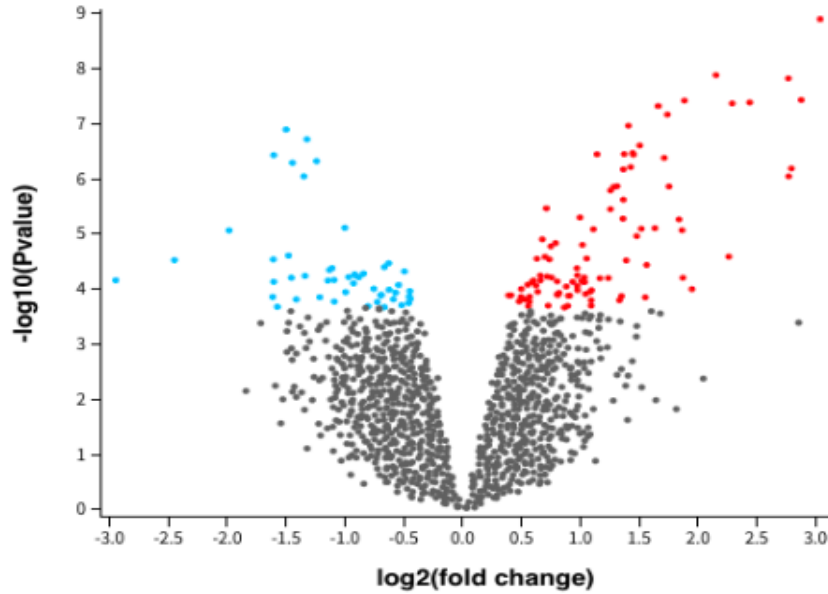
**Tabla 9.** Resultados de vías biológicas mayormente alteradas en presencia del fármaco.

| Identificador   | Vía alterada                              | p.geomean | stat.<br>mean | p.value  | q.value |
|-----------------|---|-----------|---------------|----------|---------|
| <b>hsa03010</b> | Ribosoma                                  | 0.000246  | 3.621         | 0.000246 | 0.03964 |
| <b>hsa00190</b> | Fosforilación oxidativa                   | 0.002124  | 2.904         | 0.002124 | 0.15703 |
| <b>hsa00010</b> | Glicólisis/Gluc oneogénesis               | 0.002926  | 2.815         | 0.002926 | 0.15703 |
| <b>hsa03040</b> | Espliceosoma                              | 0.009521  | 2.371         | 0.009521 | 0.25262 |
| <b>hsa00601</b> | Glucosfingolípidos serie lacto y neolacto | 0.009560  | 2.441         | 0.009560 | 0.25262 |

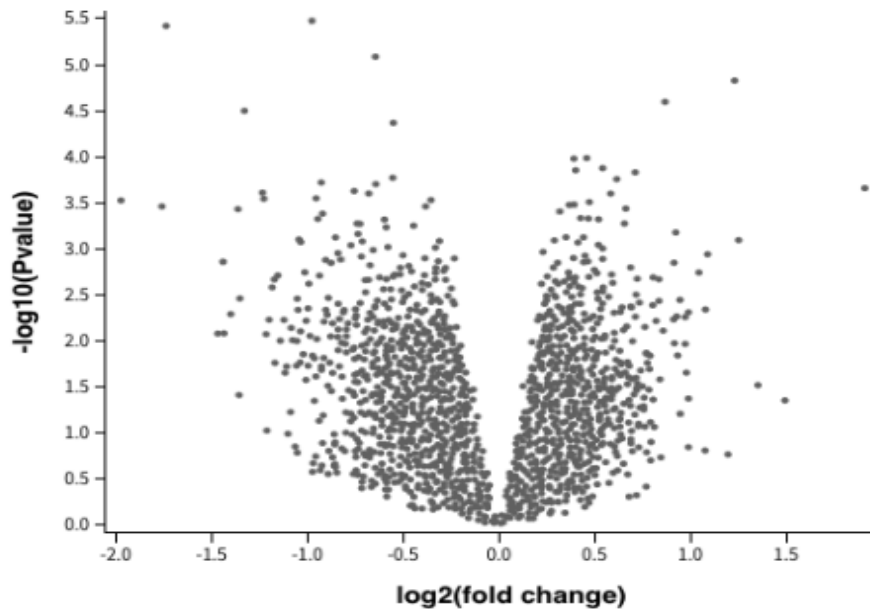
### 3.3.1.2 Análisis de expresión diferencial GSE137765

Se realizó un segundo análisis para confirmar la presencia de alteraciones durante el uso de tratamiento oral con levonorgestrel en tejido endometrial, donde fue posible identificar la presencia de genes alterados en el orden de  $10^2$  (**Fig. 7**).

Por otro lado, en un primer análisis en tejido cervical no se observan alteraciones génicas (**Fig. 8**).



**Figura. 7** Volcano plot de análisis de expresión diferencial (set de datos GSE137765) de muestras de tejido endometrial con y sin tratamiento hormonal (levonorgestrel). Genes expresados a la baja de color azul y conjunto de genes expresados a la alta de color rojo, con un valor de corte de  $P_{adj} < 0.05$  (NCBI, 2021).



**Figura. 8** Volcano plot de análisis de expresión diferencial (set de datos GSE137765) de muestras de tejido cervical con y sin tratamiento hormonal (levonorgestrel), donde no se identificaron alteraciones génicas con un valor de corte de  $P_{adj} < 0.05$  (NCBI, 2021).



### 3.3.1.2.1 Análisis de enriquecimiento de vías basado en un análisis de sobrerrepresentación ORA para el conjunto de genes expresados diferencialmente en muestras de tejido endometrial GSE137765

En esta prueba se identificó si aquellos genes endometriales afectados en presencia del levonorgestrel se encuentran sobrerrepresentados en algún proceso/componente/función biológica. (**Tabla 10**)

**Tabla 10.** Resultados de análisis de sobrerrepresentación (ORA)

| <b>Categoría de enriquecimiento</b> | <b>Alteración</b>   | <b>FDR</b>  |
|-------------------------------------|---|-------------|
| <b>Componente celular</b>           | Región perinuclear del citoplasma                               | $\leq 0.05$ |
|                                     | ATPasa tipo V transportadora de protones, dominio V1            | $> 0.05$    |
|                                     | Complejo vacuolar de ATPasa de tipo V transportador de protones | $> 0.05$    |
|                                     | Desintoxicación de iones de cobre                               | $\leq 0.05$ |
| <b>Proceso biológico</b>            | Respuesta de estrés al ion cobre                                | $\leq 0.05$ |
|                                     | Desintoxicación de compuestos inorgánicos                       | $\leq 0.05$ |
|                                     | Respuesta de estrés al ion metálico                             | $\leq 0.05$ |
|                                     | Respuesta celular al ion zinc                                   | $\leq 0.05$ |
|                                     | Respuesta celular al ion cobre                                  | $\leq 0.05$ |
|                                     | Homeostasis celular de iones de zinc                            | $\leq 0.05$ |

|   |   |             |
|---|---|-------------|
|   | Respuesta celular al ion cadmio                           | $\leq 0.05$ |
|   | Homeostasis de iones de zinc                              | $\leq 0.05$ |
|   | Respuesta al ion cobre                                    | $\leq 0.05$ |
| <b>Componente celular no redundante</b> | Complejo ATPasa de dos sectores transportador de protones | $> 0.05$    |
|   | Unión de iones de zinc                                    | $\leq 0.05$ |
| <b>Función molecular</b>                | Unión de iones de metales de transición                   | $\leq 0.05$ |
|   | Homeostasis de iones de metales de transición             | $\leq 0.05$ |
|   | Respuesta celular a la sustancia inorgánica               | $\leq 0.05$ |
| <b>Proceso biológico no redundante</b>  | Regulación negativa del crecimiento                       | $\leq 0.05$ |
|   | Respuesta al ion metálico                                 | $\leq 0.05$ |
|   | Respuesta a sustancia toxica                              | $\leq 0.05$ |
|   | Homeostasis de cationes inorgánicos divalentes            | $\leq 0.05$ |

### 3.3.2 Evaluación de la expresión alterada de genes en presencia de infección durante tratamiento hormonal.

Se realizaron análisis de expresión diferencial en muestras provenientes de experimentos cuyos datos hicieron posible evaluar la expresión de genes en presencia de infecciones y tratamiento hormonal. Con el fin de encontrar alteraciones en la expresión génica similares o relacionadas a las identificadas anteriormente en una condición de solo tratamiento que pudieran servirnos para explicar el posible camino que se presenta desde el comienzo del tratamiento con levonorgestrel y el surgimiento del fenómeno infeccioso.

En aquellos casos donde se encontraron alteraciones en la expresión de genes se recurrió a herramientas de análisis de enriquecimiento para poder realizar análisis funcionales del conjunto de genes alterados y con búsquedas sistematizadas de la información encontrar si estas tenían alguna relación con respuesta a patógenos.

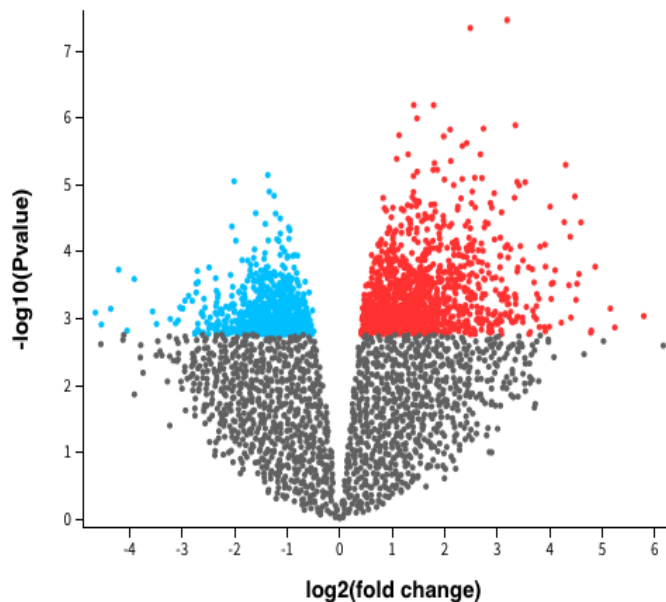
### 3.3.2.1 Análisis de expresión diferencial GSE113771

Como se puede observar (**Tabla 11.**) se realizaron 4 análisis de expresión diferencial (**Fig. 9, Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12**) con los diferentes tipos de muestras que proporcionaba el estudio "**Effect of bacterial vaginosis, Lactobacillus and Premarin estrogen replacement therapy on vaginal gene expression changes**" (Dahn, y otros, 2008), del cual se obtuvieron los datos. Sólo en el análisis I (sin vaginosis bacteriana y sin tratamiento hormonal vs. con vaginosis bacteriana sin tratamiento hormonal) se encontraron alteraciones en la expresión de genes (**Fig. 7**).

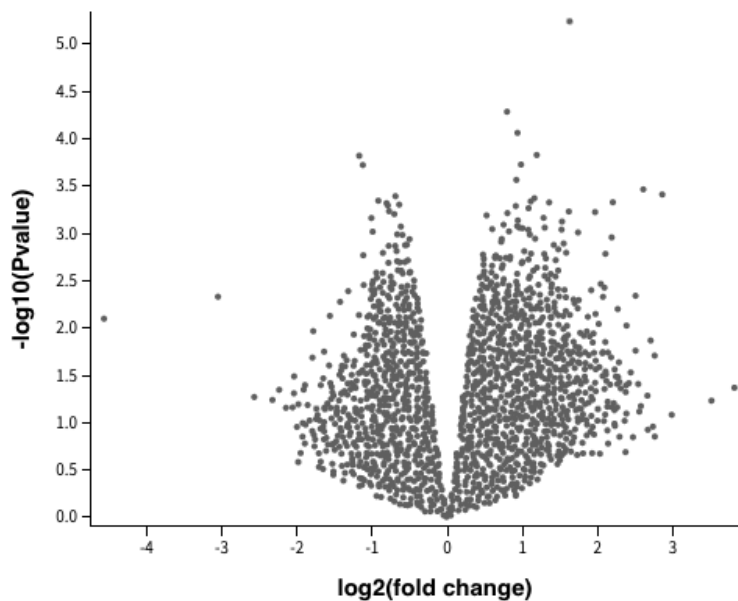
**Tabla 11.** Matriz de contrastes de los perfiles analizados y sus resultados.

| Análisis | A: Vaginosis |                | B: Vaginosis |                | Resultados |
|----------|--------------|----------------|--------------|----------------|------------|
|          | Bacteriana   | A: tx_hormonal | Bacteriana   | B: tx_hormonal |            |
| I        | 0            | 0              | 1            | 0              | 1          |
| II       | 0            | 0              | 0            | 1              | 0          |
| III      | 0            | 1              | 1            | 1              | 0          |
| IV       | 0            | 0              | 1            | 1              | 0          |

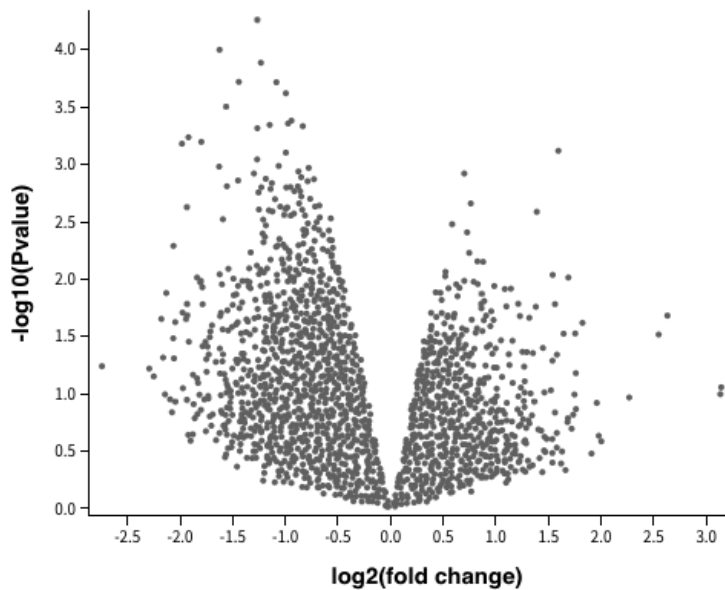
El 0 representa ausencia de la condición descrita y 1 presencia de la condición descrita. En el caso de los resultados el 0 representa ausencia de alteración en la expresión de genes y 1 presencia de alteración en la expresión genética.



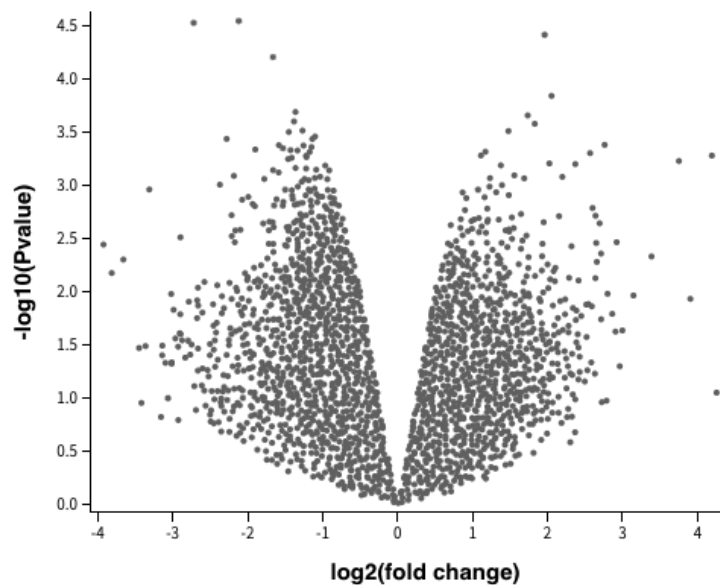
**Figura. 9** Análisis de expresión diferencial (Análisis I) de muestras células del epitelio vaginal en sujetos con y sin VB; sin tratamiento hormonal. Los genes regulados a la baja se identifican con color azul y aquellos a la alta de color rojo, ambos grupos con un valor de corte de  $P_{adj} < 0.05$  (NCBI, 2021).



**Figura. 10** Análisis de expresión diferencial (Análisis II) de muestras células del epitelio vaginal en sujetos sin VB y sin Tratamiento hormonal (premarin) vs. muestras de sujetos sin VB y con Tratamiento hormonal (premarin) con un valor de corte de  $P_{adj} < 0.05$  (NCBI, 2021).



**Figura. 11** Análisis de expresión diferencial (Análisis III) de muestras de células del epitelio vaginal en sujetos con y sin VB; con tratamiento hormonal (premarin) con un valor de corte de  $P_{adj} < 0.05$  (NCBI, 2021).



**Figura. 12** Análisis de expresión diferencial (Análisis IV) de muestras células del epitelio vaginal en sujetos sin VB sin Tratamiento hormonal (premarin) vs. muestras de sujetos con VB y con Tratamiento hormonal (premarin) con un valor de corte de  $P_{adj} < 0.05$  (NCBI, 2021).

**3.3.2.1.1 Análisis de enriquecimiento de vías basado en un análisis de sobrerrepresentación (ORA) vías para el conjunto de genes expresados diferencialmente en muestras de tejido endometrial GSE113771**

Identificación de procesos/componentes/funciones biológicas alteradas en la condición evaluada de presencia de vaginosis bacteriana sin la influencia de ningún tipo de tratamiento hormonal. (**Tabla 12.**)

**Tabla 12.** Resultados de análisis de sobrerrepresentación (ORA)

| <b>Categoría de enriquecimiento</b> | <b>Alteración</b>  | <b>FDR</b> |
|-------------------------------------|--|------------|
| <b>Componente celular</b>           | Membrana de gránulos terciarios                                    | ≤0.05      |
|                                     | Gránulos terciarios  | ≤0.05      |
|                                     | Gránulo específico   | ≤0.05      |
|                                     | Membrana granular secretoria                                       | ≤0.05      |
|                                     | Membrana de vesícula citoplásmica                                  | ≤0.05      |
|                                     | Gránulo secretorio   | ≤0.05      |
|                                     | Membrana vesicular   | ≤0.05      |
|                                     | Vesícula secretoria  | ≤0.05      |
|                                     | Parte citoplásmica vascular  | ≤0.05      |
|                                     | Toda la membrana   | ≤0.05      |
|                                     | Activación mieloide del leucocito                                  | ≤0.05      |
|                                     | Activación celular involucrada en la respuesta inmunológica        | ≤0.05      |
|                                     | Activación del neutrófilo involucrado en la respuesta inmunológica | ≤0.05      |

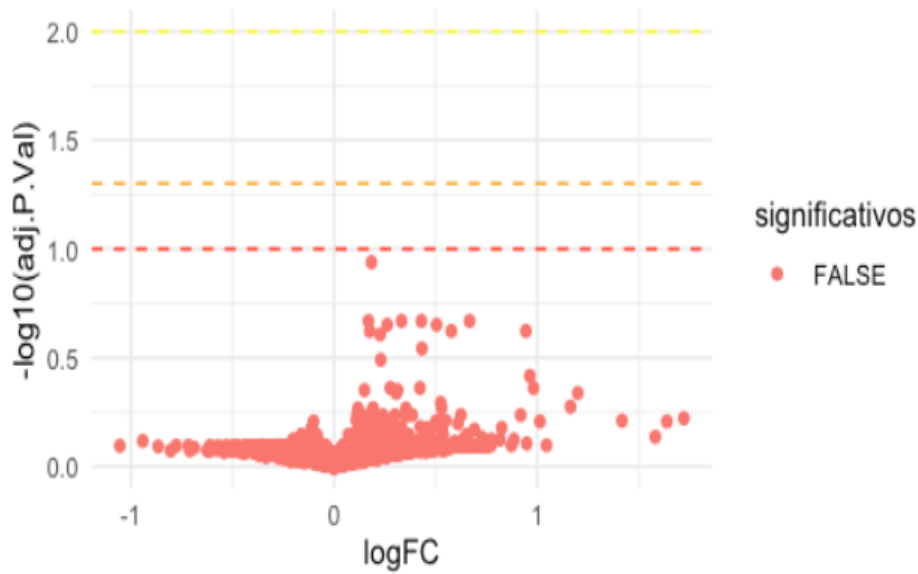
|   |  |       |
|---|--|-------|
|   | Activación celular mieloide involucrada en la respuesta inmunológica | ≤0.05 |
| <b>Proceso biológico</b>                | Proceso efector inmunológico   | ≤0.05 |
|   | Activación celular   | ≤0.05 |
|   | Exocitosis regulada  | ≤0.05 |
|   | Exocitosis   | ≤0.05 |
|   | Secreción celular  | ≤0.05 |
|   | Secreción  | ≤0.05 |
| <b>Componente celular no redundante</b> | Gránulo terciario  | ≤0.05 |
|   | Gránulo específico   | ≤0.05 |
|   | Membrana secretoria de gránulo                                       | ≤0.05 |
|   | Gránulo rico en ficolina-1   | ≤0.05 |
|   | Región de la membrana  | ≤0.05 |
|   | Actividad del receptor de lipopolisacárido                           | ≤0.05 |
|   | Unión a profilina  | ≤0.05 |
|   | Receptor de unión a quimiocina                                       | ≤0.05 |
|   | Receptor de unión a citocina   | ≤0.05 |
|   | Actividad de citocina  | ≤0.05 |
| <b>Función Molecular</b>                | Actividad de receptor de señalización                                | ≤0.05 |
|   | Unión al receptor de señalización                                    | ≤0.05 |
|   | Actividad de transductor molecular                                   | ≤0.05 |

|  |   |       |
|--|---|-------|
|  | Unión a proteína idéntica                               | ≤0.05 |
| <b>Proceso biológico no redundante</b> | Secreción de citocina                                   | ≤0.05 |
|  | Respuesta a molécula de origen bacteriano               | ≤0.05 |
|  | Respuesta inmunológica adaptativa                       | ≤0.05 |
|  | Migración leucocitaria                                  | ≤0.05 |
|  | Activación de granulocito                               | ≤0.05 |
|  | Inmunidad mediada por neutrófilo                        | ≤0.05 |
|  | Respuesta inmunológica regulada por vía de señalización | ≤0.05 |
|  | Regulación positiva de respuesta de defensa             | ≤0.05 |
|  | Regulación positiva de producción de citocina           | ≤0.05 |
|  | Regulación de la activación del leucocito               | ≤0.05 |
| <b>Componente celular</b>              | Unión célula-célula                                     | ≤0.05 |
|  | Unión celular   | ≤0.05 |

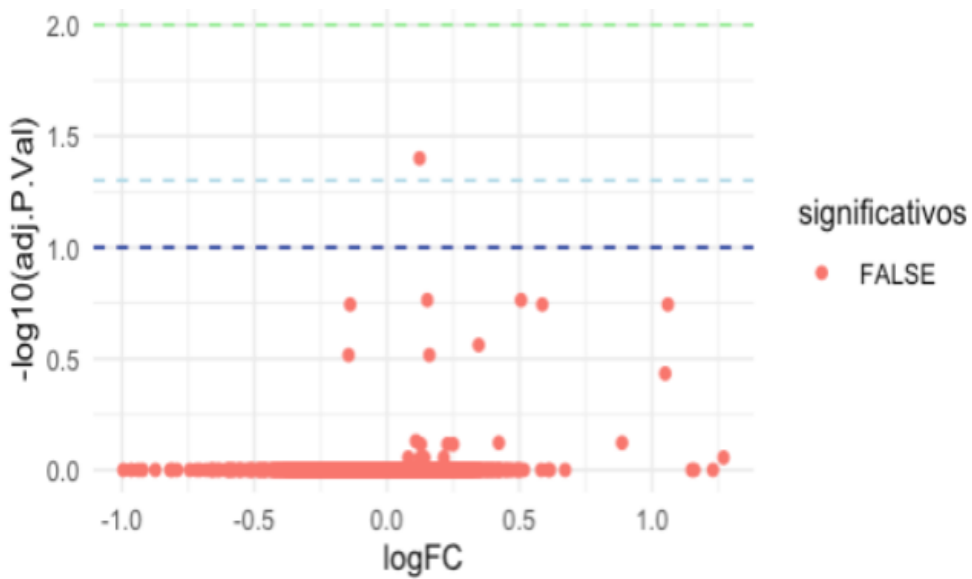
### 3.3.2.2 Análisis de expresión diferencial GSE142058

Los resultados de estos análisis de expresión diferencial entre muestras endocervicales durante la fase lútea (**Fig. 13**) así como en la fase folicular (**Fig. 14**) del ciclo menstrual frente aquellas muestras provenientes de una condición de tratamiento hormonal fue que no existe ningún tipo de alteración genética incluso disminuyendo los niveles de corte estadístico en ambos análisis.





**Figura. 13** Volcano plot de análisis de expresión diferencial genes endocervicales entre sujetos en la fase lútea del ciclo menstrual vs. aquellas con tratamiento hormonal con valores de corte de P.adj <0.01 (línea punteada amarilla), P.adj <0.05(línea punteada naranja), P.adj <0.1(línea punteada roja).



**Figura. 14** Volcano plot de análisis de expresión diferencial de genes endocervicales entre sujetos en la fase folicular del ciclo menstrual vs. aquellas con tratamiento hormonal con valores de corte de P.adj <0.01 (línea punteada verde), P.adj <0.05(línea punteada azul claro), P.adj <0.1(línea punteada azul fuerte).

### 3.4 Alteración de la microbiota vaginal GSE138971.

En esta sección se realizó el cálculo del índice de Shannon para poder determinar qué tanta diversidad microbiana existe en una condición de tratamiento hormonal y sin dicho tratamiento, con el fin de determinar si en efecto existen alteraciones a nivel de microbioma. A partir de la tabla OTU se calculó el índice de Shannon y se obtuvieron los siguientes valores ver **Tabla 13**. Posteriormente al realizar el diagrama de caja fue posible identificar las diferencias en la variabilidad entre ambos grupos de muestras en el cual se observa que existe una mayor dispersión en los valores de (H) en DMPA, lo que podría indicar una mayor diversidad microbiana en una condición de tratamiento hormonal (**Fig. 15**).

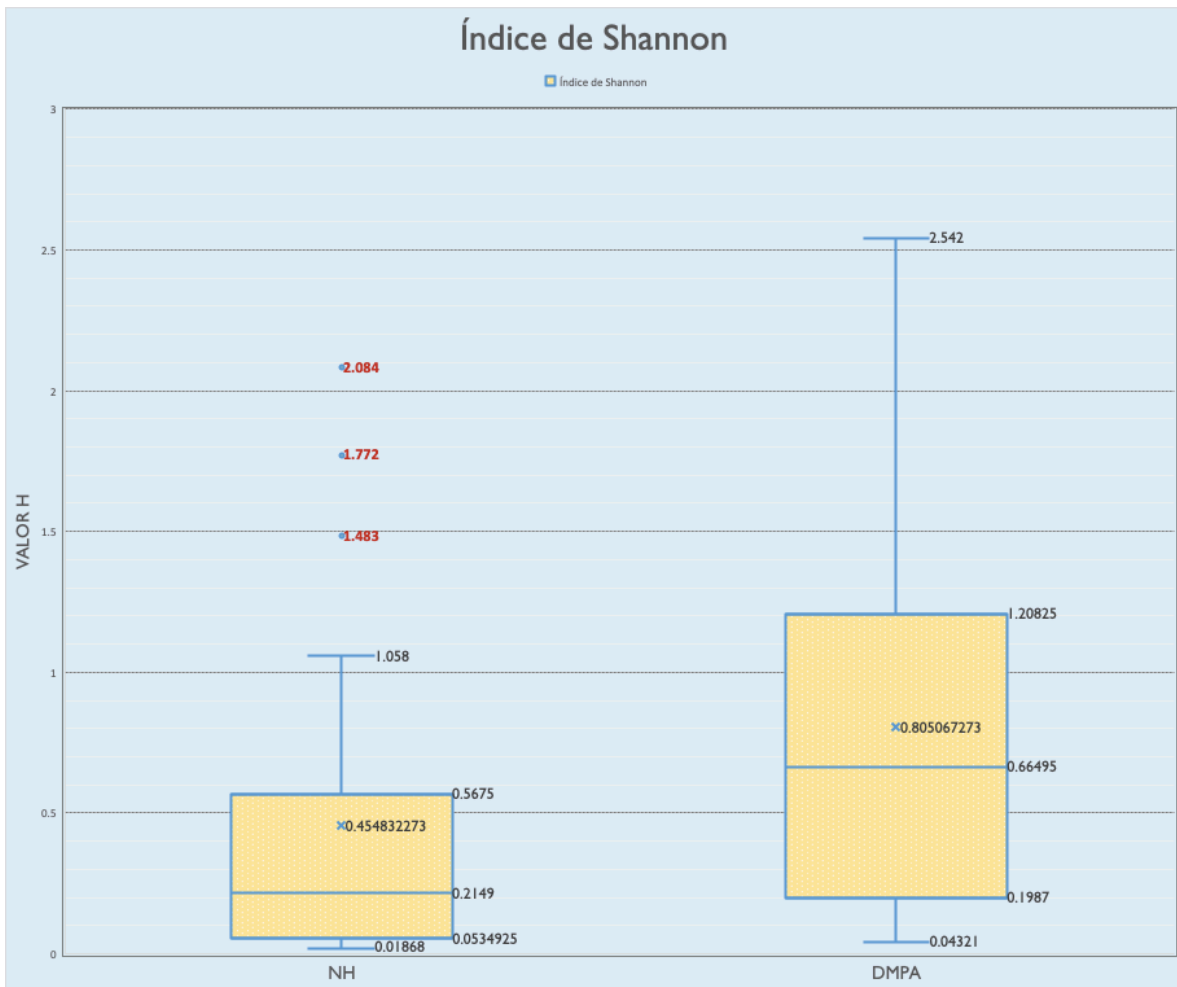
**Tabla 13.** Resultados del cálculo del índice de Shannon a partir del número de lecturas por muestra.

| Tratamiento | Índice de Shannon | Tratamiento | Índice de Shannon |
|-------------|-------------------|-------------|-------------------|
| NH          | 0.07184           | DMPA        | 0.6596            |
| NH          | 0.09918           | DMPA        | 0.3719            |
| NH          | 2.084             | DMPA        | 1.072             |
| NH          | 0.5561            | DMPA        | 0.1294            |
| NH          | 0.5386            | DMPA        | 0.8454            |
| NH          | 0.2189            | DMPA        | 0.04321           |
| NH          | 0.4858            | DMPA        | 0.7793            |
| NH          | 1.772             | DMPA        | 0.6703            |
| NH          | 0.02402           | DMPA        | 0.1486            |
| NH          | 0.06639           | DMPA        | 0.1549            |

|           |         |             |         |
|-----------|---------|-------------|---------|
| <b>NH</b> | 0.2499  | <b>DMPA</b> | 0.2133  |
| <b>NH</b> | 0.2206  | <b>DMPA</b> | 1.027   |
| <b>NH</b> | 0.01868 | <b>DMPA</b> | 1.854   |
| <b>NH</b> | 0.05427 | <b>DMPA</b> | 2.542   |
| <b>NH</b> | 0.02182 | <b>DMPA</b> | 1.655   |
| <b>NH</b> | 1.483   | <b>DMPA</b> | 0.08537 |
| <b>NH</b> | 0.05116 | <b>DMPA</b> | 0.3349  |
| <b>NH</b> | 0.6017  | <b>DMPA</b> | 0.7339  |
| <b>NH</b> | 1.058   | <b>DMPA</b> | 0.5585  |
| <b>NH</b> | 0.0442  | <b>DMPA</b> | 1.905   |
| <b>NH</b> | 0.07525 | <b>DMPA</b> | 0.3109  |
| <b>NH</b> | 0.2109  | <b>DMPA</b> | 1.617   |

---

**NH:** Sin tratamiento Hormonal y **DMPA:** Acetato de medroxiprogesterona.



**Figura 15.** Box Plot del índice de Shannon (H) para cada grupo de muestras se realizó una prueba t-Student las medias no son diferentes con un 95% de confianza.

## 4. Discusión.

### 4.1 Eventos adversos de Levonorgestrel

Se encontró que en efecto el levonorgestrel sí se asocia a infecciones según los reportes de eventos adversos de FAERS, en donde al calcular el riesgo proporcional de este grupo de EAs identificados como “infección/infestación” (primer término utilizado para indicar invasión por microorganismos como virus o bacterias y el

segundo empleado para macroparásitos como piojos) fue posible cuantificar qué tan común es que las personas reporten este grupo de eventos al comparar el número de reportes de ese mismo evento adverso en todo el universo de fármacos, los cuales presentan este mismo grupo de EAs en la misma base de datos. (FDA, FAERS, 2022)

Una vez explicado esto al obtener un valor de PRR >1, de 8.9 (**Fig. 4**) (Américas, 2016), esto se interpreta de la siguiente forma: El Levonorgestrel presenta el grupo de EAs identificado como “infección/infestación” en casi 9 veces más que cualquier otro fármaco que se encuentra registrado en esta base de datos (FAERS), por lo que se concluye que este grupo de EAs se presenta en una alta proporción cuando se utiliza este fármaco, lo que significa un posible riesgo para la población por lo que el estudio que se planteó tiene bases suficientes para proceder.

## **4.2 Expresión alterada de genes durante el tratamiento con Levonorgestrel.**

Al realizar los diversos análisis de expresión diferencial en tejidos vaginales (**Fig. 6** y **7**) así como análisis de sobrerepresentación (ver **Tabla 9** y **10**) para análisis funcionales fue posible identificar que en efecto el levonorgestrel altera genes durante su uso y que estos pueden verse asociados a la respuesta ante infecciones.

### **4.2.1 Análisis de expresión diferencial y de enriquecimiento de vías de genes expresados de forma alterada GSE188915**

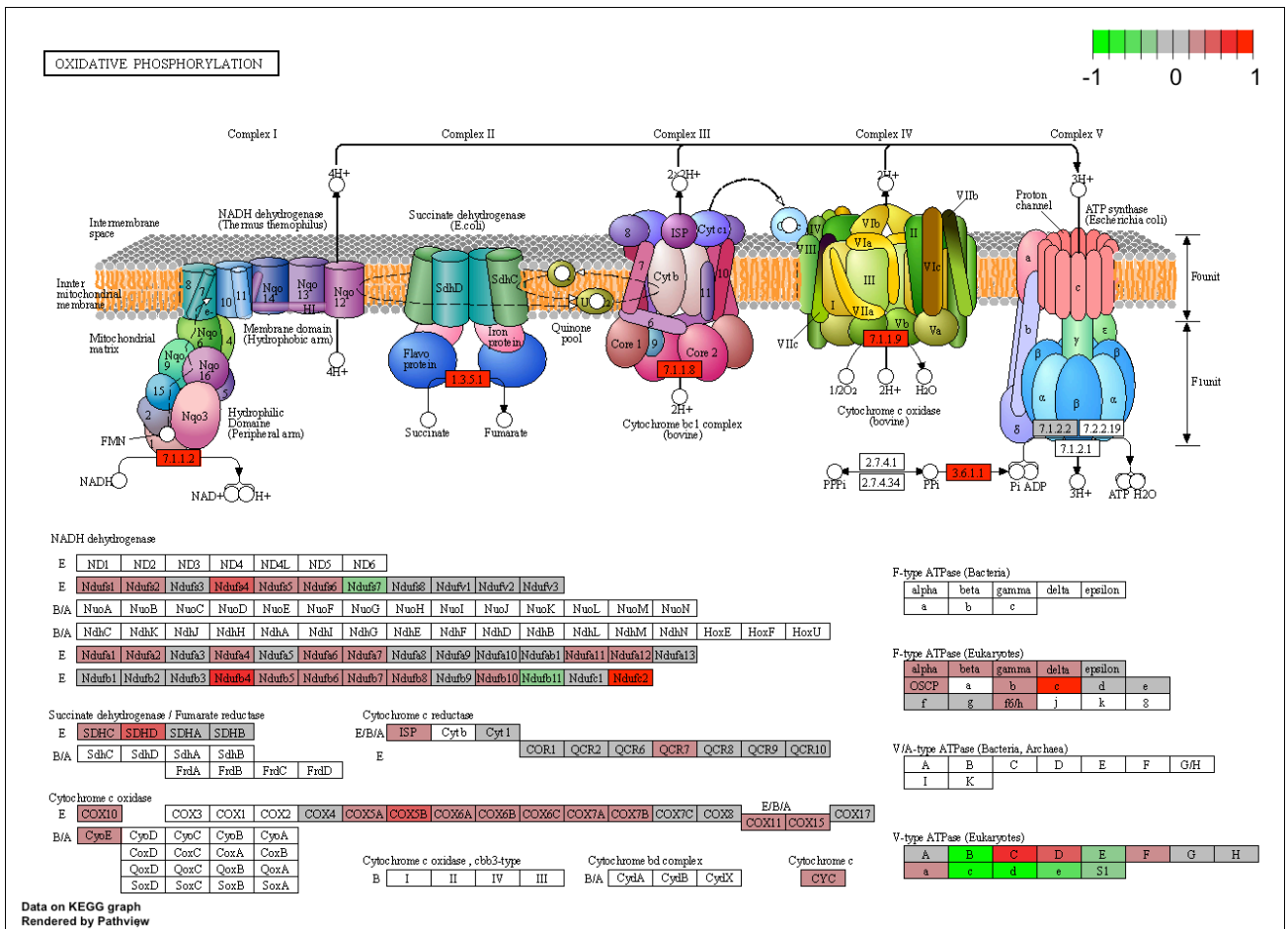
En el primer análisis de expresión diferencial (sección **3.3.1.1**) con un valor de corte de  $P_{adj} < 0.1$  fue posible observar (**Fig. 6**) que en efecto existe una expresión alterada de los genes durante el tratamiento anticonceptivo con levonorgestrel como se había esperado, por tanto se procedió a realizar el análisis de enriquecimiento de vías donde fue posible identificar que tres (Fosforilación oxidativa,

Glicólisis/gluconeogénesis y Síntesis de glucoesfingolípidos serie lacto y neolacto) de las 5 vías (**Tabla 9**) con mayor alteración tienen algún tipo de relación con el sistema inmunológico.

### **Vías alteradas con posible repercusión inmunológica**

Las vías metabólicas como la fosforilación oxidativa están altamente reguladas en las células inmunológicas y cualquier alteración puede afectar su función de defensa. Tal es caso de la diferenciación de células T, debido a que las células T naïve son dependientes de la fosforilación oxidativa al ser su principal vía metabólica. Por otro lado, en el caso de células T activadas, estas presentan niveles más bajos de fosforilación oxidativa que glicólisis después de diferenciarse, al igual que Th1, Th2 y Th17, además, de que estas últimas se ha observado presentan mayor actividad mTORC1 (complejo proteico que sirve como sensor de nutrientes/energía/redox el cual controla la síntesis de proteínas) (Angajala, y otros, 2018). Lo que nos lleva a pensar, que al tener una alteración a la alta en los niveles de expresión de genes en varios complejos encargados de fosforilación oxidativa (**Fig. 16**) podría estarse presentando un desbalance metabólico, afectando así la diferenciación de células T, propiciando una respuesta inmunológica alterada.

Por otro lado, los niveles de fosforilación oxidativa en los macrófagos están altamente regulados ya sea para los tipo M1 (niveles bajos de fosforilación oxidativa) y M2 (niveles más altos de fosforilación oxidativa) (Angajala, y otros, 2018) por lo que un desajuste en estos niveles podría propiciar que su polarización se vea alterada y su función también, por citar un ejemplo los M1 están encargados de producir NO (óxido nítrico) y un fenotipo proinflamatoria, mientras los M2 regulan la actividad antiinflamatoria y promueven la actividad de Th2 y reparación celular, por lo que un desajuste podría propiciar una respuesta poco efectiva ante un posible agente infeccioso que pudiera llegar a invadir el tejido endometrial. (Angajala, y otros, 2018)



**Figura 16.** Alteraciones de genes encargados de la fosforilación oxidativa obtenida del análisis de vías por gage (Turner, 2015).

Diversas funciones de la inmunidad son bioenergéticamente costosas y requieren un control preciso de las vías metabólicas celulares. Estudios revelan que las vías metabólicas del metabolismo oxidativo, la glucólisis y la glutaminólisis alimentan preferentemente las decisiones sobre el destino celular y las funciones efectoras de las células inmunitarias. (Ganeshan & Chawla, 2014) Algunas de las células inmunitarias alimentadas de energía a través de esta vía metabólica (glucólisis/gluconeogénesis) (**Fig. 17**), son: neutrófilos, mastocitos, células dendríticas (CD) activadas, macrófagos M1, activación de células T CD4<sup>+</sup> activada y células B. Cuyas funciones como producción de ROS, desgranulación, producción de citocina, activación/presentación del antígeno, proliferación (**Tabla 14**), podrían estarse viendo afectadas, ya que son funciones alimentadas por la

glicólisis/gluconeogénesis, vía que se encontró está sufriendo alteraciones por la presencia del tratamiento (Fig. 17), lo que sugiere presencia de alteraciones en el entorno inmunitario por presencia de levonorgestrel. (Ganeshan & Chawla, 2014)

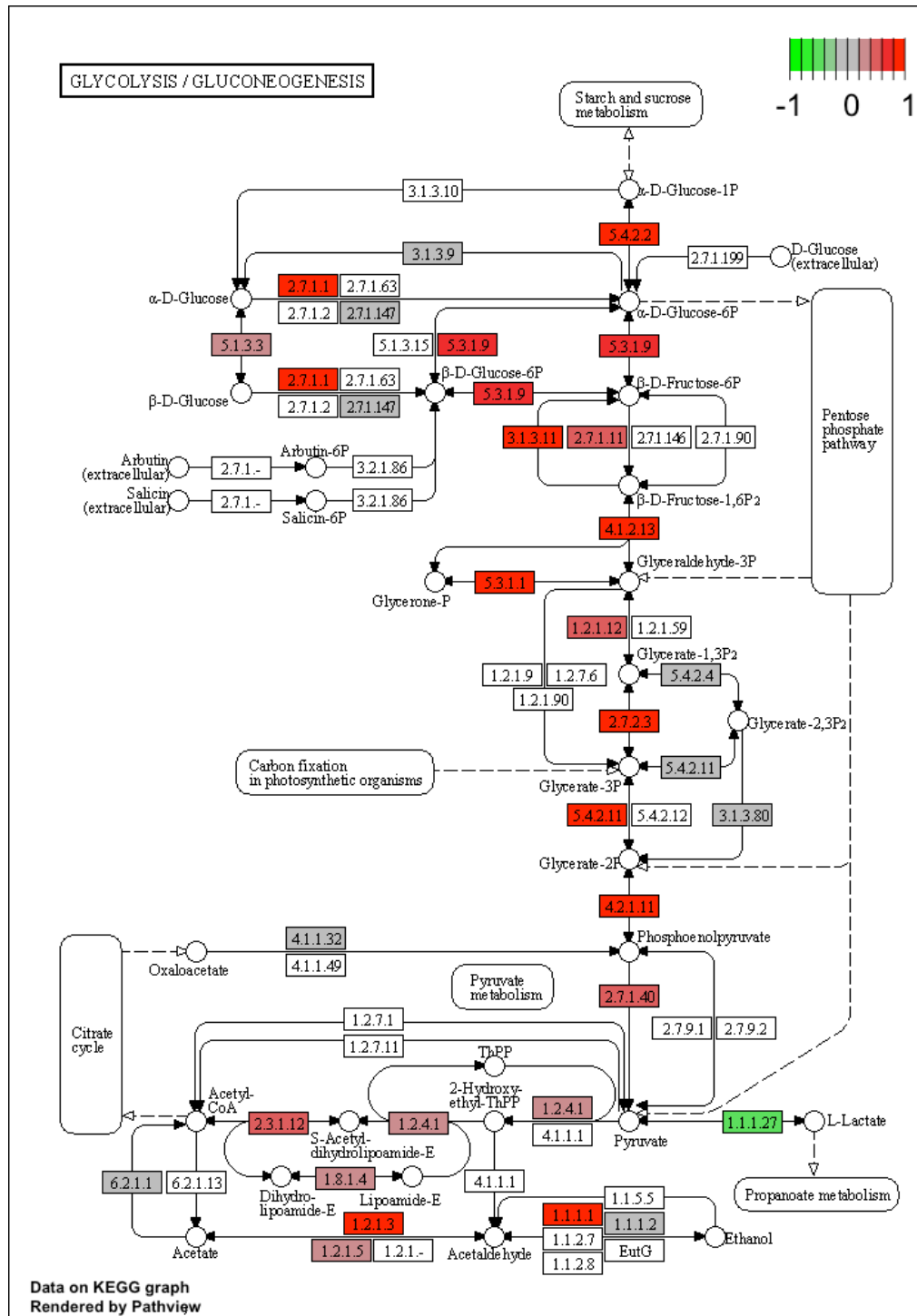


Figura. 17 Alteraciones de genes encargados de la glicólisis obtenida del análisis de vías por gage (Turner, 2015).



**Tabla 14.** Principios arquitectónicos del metabolismo para el control de células inmunes

| <b>Célula</b>                     | <b>Inductores<sup>1</sup></b>                                    | <b>Sensores<sup>2</sup></b> | <b>Mediadores<sup>3</sup></b>                  | <b>Efectores<sup>4</sup></b> | <b>Resultado</b>  |
|-----------------------------------|--|-----------------------------|--|------------------------------|---|
| <b>Neutrófilo</b>                 | PAMPs, quimiocinas   | PRRs (TLRs)                 | HIF-1 $\alpha$                                 | Glicólisis, etc.             | ROS   |
| <b>Mastocito</b>                  | PAMPs, IgE, citocinas, factores de crecimiento, entrecruzamiento | PRRs, F $\epsilon$ RI       | -  | Glicólisis                   | Desgranulación, producción de citocina                        |
| <b>CD activada</b>                | PAMPs  | PRRs (TLRs)                 | P13K/Akt, HIF-1 $\alpha$                       | Glicólisis                   | Activación, presentación del antígeno, producción de citocina |
| <b>M1</b>                         | PAMPs  | PRRs (TLRs, NODs)           | HIF-1 $\alpha$                                 | Glicólisis, etc.             | ROS, producción de citocina                                   |
| <b>T CD4<sup>+</sup> activada</b> | IL-7, antígeno   | TCR                         | P13K/AKT/mTOR, ERK/MAPK, c-Myc, HIF-1 $\alpha$ | Glicólisis, etc.             | Activación, proliferación, producción de citocina             |

|                  |                    |                         |          |            |                              |
|------------------|--------------------|-------------------------|----------|------------|------------------------------|
| <b>Células B</b> | Antígeno,<br>PAMPs | BCRs,<br>PRRs<br>(TLRs) | P13K/AKT | Glicólisis | Activación,<br>proliferación |
|------------------|--------------------|-------------------------|----------|------------|------------------------------|

Desde una perspectiva inmunológica y metabólica, la activación de la inmunidad innata y adaptativa se puede dividir en términos generales en cuatro componentes: 1. Los inductores (señales que activan las células inmunitarias), 2. Los sensores (proteínas que detectan los inductores), 3. Los mediadores (proteínas y metabolitos que transducen las señales río abajo de los sensores), y 4. los efectores (las respuestas metabólicas efectoras que respaldan el estado funcional de células inmunes). De manera combinatoria, las células inmunitarias individuales utilizan estos componentes de manera diferencial para lograr el resultado funcional deseado (Ganeshan & Chawla, 2014).

Por último, los glucoesfingolípidos son macromoléculas que se encuentran presentes como epítomos de antígenos de grupos sanguíneos, de igual forma actúan como receptores primarios para patógenos humanos (Fernández, 2021). Además, estas macromoléculas forman parte de la membrana celular las cuales están involucradas en varios procesos inmunitarios, incluida la diferenciación, el reconocimiento inmunitario y la transducción de señales de activación (Zhang, de Waard, Wuhler, & Spaapen, 2019). Donde específicamente la serie lacto y neolacto (**Fig. 18**) se encuentra expresada en la membrana de células inmunitarias como células progenitoras mieloides, neutrófilos, monocitos, monocitos derivados de células dendríticas, macrófagos, células B y T (Zhang, de Waard, Wuhler, & Spaapen, 2019). Por lo que alteraciones en la expresión de esta macromolécula, debido al tratamiento con levonorgestrel, es indicativo de alteraciones en la respuesta basal inmunitaria lo que podría evidenciar susceptibilidad a infecciones.



Es importante reconocer que el análisis de este set de datos no es muy representativo debido a la poca cantidad de muestras que fueron analizadas (n=2 en las muestras identificadas como control y n=3 para las muestras con levonorgestrel), la poca confiabilidad se debe a que no hay una tercera muestra, en el caso de los controles, que le brinde respaldo a un resultado u otro según sea el caso cuando las señales registradas son diferentes en los grupos, por ello fue necesario plantear un segundo análisis, que confirmara si en efecto existen alteraciones en los niveles de expresión.

#### **4.2.2 Análisis de expresión diferencial GSE137765**

Se procedió a realizar este segundo análisis con el objetivo de corroborar que en efecto existe una alteración en la expresión genética durante el tratamiento hormonal con Levonorgestrel, debido a que en el primer análisis (**Análisis 1.1**) se cuenta con muy pocas muestras por lo que el nivel de confiabilidad de los resultados podría ser cuestionable y no tan representativo.

Este set de datos presenta  $n \geq 10$  muestras por tratamiento y tejido analizado, lo que nos brinda mayor nivel de confianza a nuestros resultados e incluso fue posible analizar los niveles de expresión de otro tejido, el cervical.

Para el caso del tejido cervical no es observable ninguna alteración durante el tratamiento por lo que se descartan afectaciones (**Fig. 8**). Mientras que, para el análisis del tejido endometrial, mismo tejido analizado en el primer set de datos (**Análisis 1.1**), se encuentra que en efecto se presentan alteraciones en la expresión génica (**Fig. 7**), lo que corrobora que en efecto existen alteraciones, por lo que se procede a realizar un análisis de sobrerrepresentación de los genes alterados con la herramienta web WebGestalt.

En este análisis fue posible identificar procesos, funciones y componentes biológicos que se pueden estar viendo afectados por la presencia del fármaco en el

sistema con un valor de corte alto en confiabilidad,  $FDR \leq 0.05$ . Al observar la **Tabla 10**, es posible identificar todas aquellas alteraciones presentes.

Dos de las categorías identificadas de interés al hacer el análisis de enriquecimiento fueron “Componente Celular” y “Componente celular no redundante” las cuales indican un efecto anteriormente observado alterado en el **análisis 1.1**, si bien estos no tienen un valor de corte tan estricto, muestran similitud en alteraciones en complejos de ATPasa que son observables en el primer análisis de vías (**Fig. 16**), por lo que al existir similitud con este se considera relevante su presencia porque podría estar siendo indicativo de que en efecto la fosforilación oxidativa está sufriendo un desbalance que podría estar modificando la actividad inmunológica.

Por su parte, con un valor de corte estricto  $FDR \leq 0.05$  en las categorías “Proceso biológico”, “Función molecular” y “Proceso biológico no redundante” se identifican diversas alteraciones asociadas a iones, en especial a iones zinc, cuya alteración se encontró que tienen una repercusión importante en la actividad celular de las células inmunitarias.

Existen diversos procesos modulados por zinc en la prevención de enfermedades infecciosas. (**Fig. 19**). El zinc regula la función de barrera de la piel y las células epiteliales, así como la función de las células que residen en esta barrera, como los mastocitos y las células dendríticas. Además, de que regula diferentes subconjuntos de células inmunitarias en el torrente sanguíneo. En las células del sistema inmunitario innato como: los **neutrófilos**, el tipo más abundante de células inmunitarias y las primeras células en ser reclutadas en infecciones, aumentan en función y frecuencia durante la deficiencia de zinc. Mientras que los **monocitos** y las **células NK** son más activos durante la deficiencia de zinc.

En el caso de las células del sistema inmunitario adaptativo como las **células B** que proporcionan anticuerpos protectores, células **CTL** que pueden matar células diana infectadas; y **Células Th**, que se pueden subdividir en células **Th17**, que participan

en la eliminación de patógenos extracelulares; las células **Th1**, que combaten las infecciones intracelulares; las células **Th2**, que son importantes para la eliminación de parásitos; y **Tregs**, que son necesarias para la tolerancia y la homeostasis tisular, todas son reguladas por el zinc según se indica para cada tipo de célula (**Fig. 19**) (Weesels, Fischer, & Rink, 2021). Por lo que alteraciones en las concentraciones de zinc podrían modificar el funcionamiento de este grupo de células inmunitarias (**Fig. 19**).

Además, el zinc también se ve involucrado en el funcionamiento de los dos órganos inmunológicos primarios. En el **timo**, se requiere zinc para la producción de timulina funcional y está involucrado en la respuesta de las **células T** a IL-1 e IL-2 (**Fig. 19**). Finalmente, en la **médula ósea**, la maduración celular cambia durante deficiencia de zinc, favoreciendo el linaje mieloide y se puede observar un aumento de la apoptosis en los progenitores linfoides, mientras que en las células mieloides se aumenta la diferenciación (Weesels, Fischer, & Rink, 2021). Por tanto, alteraciones en las concentraciones de zinc también podrían modificar el funcionamiento de estos órganos inmunológicos.

A parte de las células y órganos inmunológicos, el ion zinc está involucrado tanto en la estructura como en la carga de las proteínas, incluso en concentraciones muy bajas, lo que repercute en la función de estas. Existe una estructura conocida como dedos de zinc que puede unirse a objetivos de ADN y ARN que se encuentran en, por ejemplo, factores de transcripción.

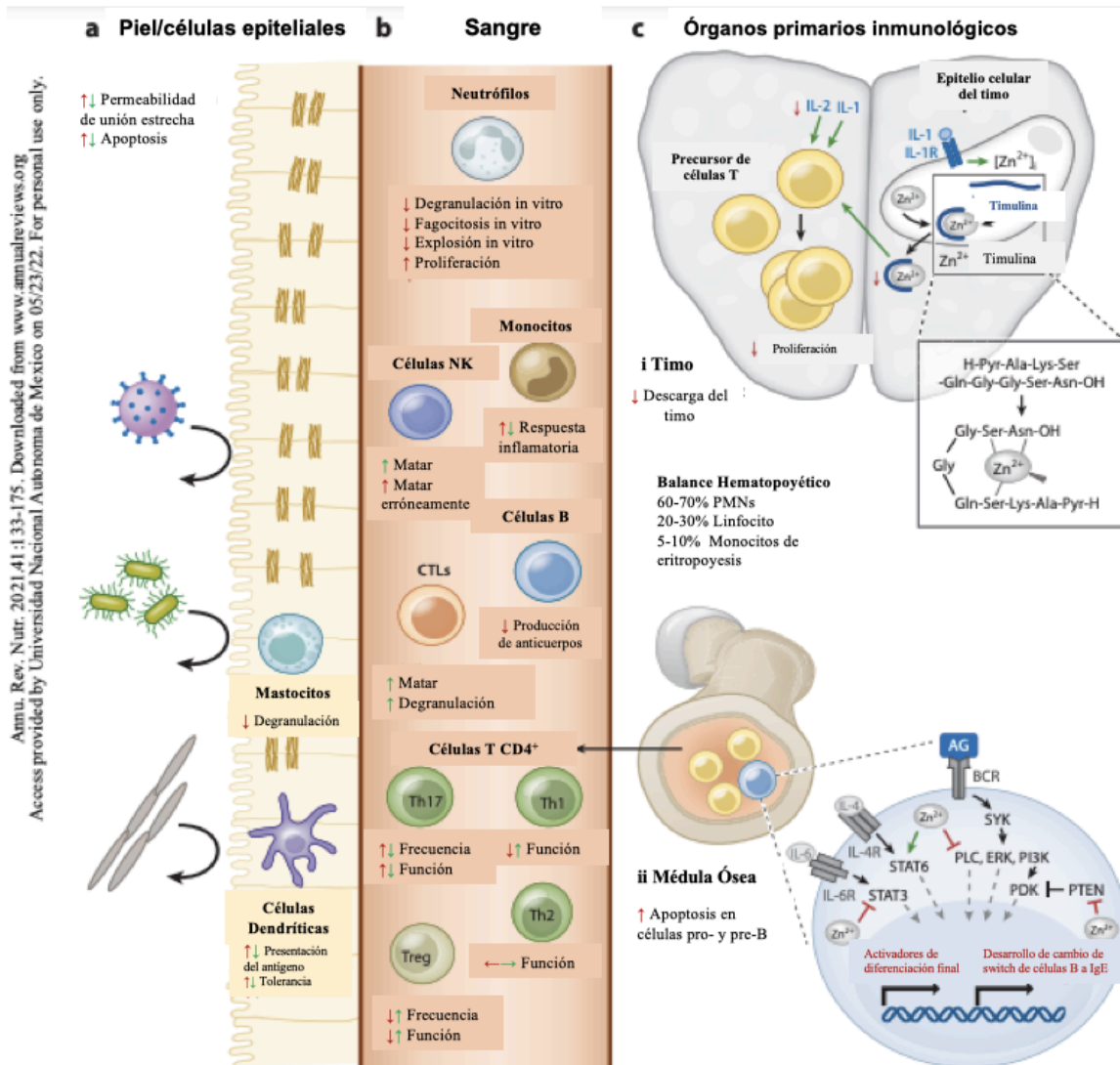
Recientemente, se han descrito otros dominios de zinc con base de la estequiometría de la unión de zinc a proteína: el llamado dominio LIM (dos iones de zinc por proteína), el gancho de zinc (un ion de zinc por dos proteínas) y el broche de zinc (un ion de zinc por tres proteínas). Donde colectivamente, el zinc es una parte indispensable de las estructuras proteicas y es esencial para interacciones proteína-proteína o proteína-aminoácido. Así, el zinc está involucrado en la regulación de procesos celulares fundamentales y como ya se describió antes en

funciones de muchas células y órganos inmunológicos. (Weesels, Fischer, & Rink, 2021)

Otra de las funciones importantes de este ion es que es un antioxidante que ayuda a contrarrestar las EROs formadas durante la respiración celular o durante procesos de fagocitosis de patógenos que evitan el daño celular (Weesels, Fischer, & Rink, 2021). Por ello, como se observa en la **Tabla 10**, al existir una alteración en la respuesta celular, esta función antioxidante pudiera estar afectada creando un ambiente propicio para que proliferen el daño y/o bien que organismos oportunistas aprovechen esta condición para invadir tejidos.

Otro de los procesos biológicos alterados (**Tabla 10.**) es la homeostasis celular del ion zinc la cual idealmente debe estar altamente regulada, para mantener el equilibrio en el organismo. El zinc se transfiere a los tejidos durante la respuesta de fase aguda (RPA) y otras reacciones inflamatorias, lo que da como resultado una hipozincemia sérica transitoria, que se normaliza durante la resolución de inflamación. Si la transferencia descrita proporciona zinc a los tejidos puede prevenir la apoptosis o bien apoyar su recuperación de una lesión, o ambas. La hipozincemia sérica transitoria puede ser una señal de peligro sistémico la cual es esencial para la activación de las células inmunitarias, sin embargo, esta posibilidad aún no se ha probado. (Weesels, Fischer, & Rink, 2021)

Si, bien existen algunos procesos cuyas alteraciones en las concentraciones del ion zinc aún no se han probado, es probable que problemas durante la regulación de este ion en el sistema pueden llevar a desbalances con repercusiones en la respuesta a agentes potencialmente infecciosos durante la ingesta de levonorgestrel.



**Figura 19.** Las flechas verdes ilustran los mecanismos que son modulados por la suplementación con zinc, y las flechas rojas indican funciones y frecuencias alteradas en la deficiencia de zinc. (Weesels, Fischer, & Rink, 2021)

Finalmente, también se identifica alteración en la homeostasis de cationes divalentes que de igual forma cuentan con una posible repercusión en la respuesta inmunológica porque también tiene relación con afecciones en los procesos regulados con iones zinc debido a que, por ejemplo, la ligadura de ZnR activa la señalización del inositol 3 trifosfato y la liberación de calcio, cuya activación posteriormente da como resultado la fosforilación de moléculas de señalización en



el ERK y vías de AKT. Curiosamente, las señales de calcio también pueden estar reguladas a la alta en una señal de zinc. (Weesels, Fischer, & Rink, 2021)

Por otro lado, los iones divalentes como el calcio y el magnesio actúan como segundos mensajeros. Donde los canales de calcio están involucrados en las vías de señalización, regulando una variedad de procesos intracelulares, que incluyen la motilidad, la transcripción y la apoptosis, por tanto, tienen un fuerte impacto en las células, incluyendo las inmunitarias. (Weesels, Fischer, & Rink, 2021)

Como se puede observar en la **Tabla 10** en presencia de levonorgestrel, se encontró que la homeostasis de cationes divalentes como el calcio y el zinc se ve alterada. Donde perturbaciones en el equilibrio de estos cationes pueden tener repercusiones en la respuesta celular inmunológica. Esto se cree, porque se tiene conocimiento que canales iónicos están involucrados en la transducción de señales en varias células inmunitarias, especialmente en las células T y B, donde los canales de calcio resguardados-operadores desempeñan un papel central en la entrada de calcio en los linfocitos activados después de la estimulación antígeno-receptor. Cuya entrada de calcio y su posterior actividad en estas células puede verse perturbada por la presencia del zinc, ya que este actúa como inhibidor competitivo del calcio en estos canales, propiciando alteraciones en la actividad normal de linfocitos activados. Situaciones que explican cómo el zinc afecta indirectamente la señalización intracelular, el sistema inmunitario y a su vez la interacción del calcio (catión divalente) con estas células. (Weesels, Fischer, & Rink, 2021)

### **4.3 Evaluación de la expresión alterada de genes en presencia de infección durante tratamiento hormonal.**

Es importante mencionar que el primer set de datos de esta sección “**GSE113771**” (Reid, y otros, 2018), no es considerado ideal debido a que si bien, nos permite analizar la expresión de genes en situaciones de tratamiento hormonal y presencia

de infecciones (VB), el medicamento analizado en este experimento no es el levonorgestrel, si no, el Premarin, pero fue seleccionado para este análisis porque es un tratamiento que comparte características con el levonorgestrel como que es empleado para disminuir la sintomatología que presentan mujeres que cursan por la menopausia, se trata de un medicamento del tipo hormonal y el experimento analiza un evento adverso infeccioso que también presenta el levonorgestrel, la vaginosis bacteriana.

Este set contaba con suficientes datos para realizar diversas combinaciones (ver **Tabla 3**), las cuales nos permitieron analizar la expresión de genes en diferentes situaciones, el análisis I fue en el único de los análisis donde fue posible identificar expresión diferente a la basal (ver **Tabla 11**): muestras sin presencia de infección y sin tratamiento comparado con muestras con presencia de VB que tampoco recibían tratamiento. Este resultado tuvo la función de confirmar que, en efecto en presencia de infecciones, la expresión de genes en las células se ve alterada. Después, al realizar el análisis de sobrerrepresentación de los genes alterados fue posible observar (Ver **Tabla 12.**) que en efecto los genes identificados como alterados en el análisis de expresión diferencial están asociados a la activación de una serie de mecanismos inmunológicos para contrarrestar lo que se percibe como una infección.

Por otro lado, en los otros análisis **II**, **III** y **IV** no pudo elucidarse alguna alteración en los genes del hospedero (ver **Tabla 11**). En los análisis **II** y **III** se esperaba, por ejemplo en el caso **II** primero identificar si existían alteraciones en genes o funciones similares a las identificados en los análisis de expresión diferencial con levonorgestrel (sección **3.3.1** y **3.3.1.2**) para poder relacionar los posteriores resultados que se esperaban encontrar en el caso **III**, donde se analizó la expresión de muestras de sujetos que recibían tratamiento y no presentaban VB frente a muestras de sujetos que durante el tratamiento presentaron VB, sin embargo en ninguno de los dos análisis se identificaron alteraciones. Lo que no reflejó que en efecto el tratamiento coadyuva susceptibilidad a infecciones y en caso de que las

alteraciones durante el tratamiento fueran similares al levonorgestrel tampoco que el levonorgestrel propicia susceptibilidad. Por ello concluimos que no fue imposible identificar genes alterados en el tratamiento y si estos mismos genes seguían sufriendo alteraciones ya cuando se presentaba la infección.

Aunque no se identificaron alteraciones tampoco generan evidencia suficiente para descartar las alteraciones en la respuesta inmunológica en presencia de levonorgestrel, ya que el tratamiento analizado en este experimento es el Premarin, por lo que estos resultados no son de gran impacto para la evaluación buscada, seguimiento de alteraciones génicas desde el tratamiento con levonorgestrel hasta la presencia del suceso infeccioso.

El análisis cuyos resultados no fueron los esperados son los del caso **IV**, muestras provenientes de sujetos que están recibiendo tratamiento hormonal y que presentan vaginosis bacteriana contra muestras de sujetos sin vaginosis bacteriana y sin tratamiento hormonal. Debido a que se esperaba que al presentarse la infección (VB) durante el tratamiento esta conllevaría a alteraciones en la expresión génica para activación del sistema inmunológico, pero no fue así, por lo que no fue posible visualizar qué está sucediendo con los genes durante una condición de infección y tratamiento, que era lo que nos interesaba observar.

Al no obtener las respuestas esperadas en el análisis antes descrito (Sección **3.3.2.1**), se llevó a cabo un segundo análisis (Sección **3.3.2.2**) en búsqueda de genes que se pudieran ver alterados en una condición de tratamiento e infección. Sin embargo, al hacer el análisis de expresión diferencial ninguno de los genes encargados del granulismo y mucosa que montan respuesta inmunológica ante un posible patógeno se expresaron de forma diferencial en muestras provenientes de la fase lútea (**Fig. 13**) y folicular (**Fig. 14**) del ciclo menstrual, incluso disminuyendo el nivel de confianza del análisis hasta  $P_{adj} < 0.1$ .

Es importante mencionar que los resultados de este set de datos analizado donde no se encontraron alteraciones en la expresión génica (**Fig. 13 y 14**), no concuerdan con lo reportado por los científicos que desarrollaron este experimento siguiendo el

mismo pipeline, “Impact of the menstrual cycle and ethinyl estradiol/etonogestrel contraceptive vaginal ring on granulysin and other mucosal immune mediators” (Hughes S. , y otros, 2021), donde se señala la presencia de 20 genes expresados diferencialmente en la fase lútea del ciclo menstrual y 7 genes reportados expresados de forma diferencial en la fase folicular, ambos grupos de genes en presencia del fármaco anticonceptivo (etonogestrel), parecido en estructura y función al de interés (levonorgestrel). (Hughes S. , y otros, 2021)

Por tanto, al no encontrarse el set de datos que alimentara de respuestas a este cuestionamiento, se propone realizar un análisis de expresión génica de los tejidos de personas recibiendo levonorgestrel y que están presentando algún tipo de infección durante el tratamiento hormonal, para visualizar y monitorear la expresión de los genes y elucidar el posible camino que se da desde la ingesta del levonorgestrel sin infección hasta la presencia del evento infeccioso durante el tratamiento anticonceptivo.

#### **4.4 Alteración de la microbiota vaginal GSE138971.**

Se encontró que el tratamiento hormonal anticonceptivo, basado en progestinas, puede estar modificando la diversidad microbiana como se puede observar en la **Tabla 13** donde el índice de Shannon de cada una de las muestras es diferente entre sí, a pesar de tener el mismo tipo de tratamiento. Esto puede ser atribuible a que varios factores afectan la composición de la microbiota vaginal no solo la presencia o ausencia de un tratamiento. Algunos de los factores que influyen en la variabilidad en la microbiota son: el origen étnico, las infecciones de transmisión sexual (ITS) que presentó la persona antes o durante el estudio, presencia de vaginosis bacteriana, actividad sexual (ej. el trabajo sexual), etc. (Wessels & Kaushic, 2019).

Si bien existe esta variabilidad entre individuos que fueron sometidos al mismo tipo de tratamiento es posible analizar qué tan diferente es un grupo respecto a otro, por

ello el cálculo del índice de Shannon y posteriormente la construcción del Box Plot (**Fig. 15**), el cual nos permite comparar que tan diverso es un grupo respecto a otro. Al realizar esta representación gráfica fue posible observar (**Fig. 15**) que la amplitud de la caja para el tratamiento con DMPA respecto al NH es mayor, por tanto, se podría plantear que en efecto en presencia del fármaco anticonceptivo basado en progestina implica un incremento en la diversidad de especies de la microbiota vaginal de los sujetos de análisis.

Este incremento en la variabilidad de especies microbianas presentes en las mucosas se ha observado en varios estudios que implican un aumento en el riesgo de contracción y desarrollo de infecciones por lo que esta alteración podría alimentar de forma positiva nuestra hipótesis “El levonorgestrel propicia susceptibilidad a infecciones” a través de la alteración de la diversidad de la microbiota vaginal.

Sin embargo, para comprobar estadísticamente que en efecto existe mayor variabilidad en la microbiota vaginal de sujetos bajo tratamiento con progestinas se realizó una prueba T-Student. Esta prueba nos permitió identificar si la diferencia entre las medias del grupo de muestras recibiendo tratamiento con progestinas respecto al grupo sin tratamiento existía con un valor de significancia del 95%.

Al realizar esta prueba de diferencia de medias a un 95% de confianza se observó ausencia de diferencia significativa entre muestras, esto podría hacernos pensar que en realidad no existe un incremento en la variabilidad de la microbiota vaginal por tratamiento con progestinas, sin embargo la ausencia de diferencia entre las medias puede atribuirse a que los valores del índice de Shannon (H) en cada grupo de muestras es muy heterogéneo entre sí, incluso para el caso de las muestras sin tratamiento hormonal donde existen valores atípicos (ver **Fig. 15**), por lo que es posible que sea la razón por la cual la prueba T-Student no detecte diferencias, porque los valores se encuentran muy repartidos.

Con estos resultados, donde es cuestionable si realmente existe un incremento en la diversidad de especies, por la alta variabilidad en los valores del índice de Shannon dentro del mismo grupo y la aparente nula diferencia entre medias en la prueba t-Student, se sugiere plantear un diseño experimental que pueda esclarecer el fenómeno estudiado, esta vez con el fármaco de interés, levonorgestrel, para darle mayor certeza a los resultados y de esta forma determinar si en efecto existe incremento en la variabilidad de especies de la microbiota vaginal durante el tratamiento con levonorgestrel sugiriendo así la presencia de susceptibilidad infecciones por alteraciones en la composición de la mucosa vaginal.

## 5. Conclusiones

Los objetivos planteados en un inicio fueron alcanzados, se logró:

1. Probar que la incidencia de EAs del grupo infecciones/infestaciones asociadas a levonorgestrel es significativamente mayor a la observada con otros fármacos que presentan este grupo de EAs durante su tratamiento, por lo que es relevante su presencia.
2. La aparición de estas infecciones durante el tratamiento con levonorgestrel puede deberse a la identificación de modificaciones en la expresión de genes durante el tratamiento, lo cual se puede asociar a cambios fisiológicos con posible implicación inmunológica.
3. La presencia de progestinas sintéticas puede alterar la composición de la microbiota vaginal.

Sin embargo, no fue posible identificar la actividad de progestinas sintéticas similares al levonorgestrel cuando se presenta una infección durante el tratamiento. Por lo que, al no contar con el set de datos ideal, se sugiere un análisis confirmatorio posterior.

Finalmente, se puede decir que los análisis dan indicios que la hipótesis es cierta “Levonorgestrel puede propiciar susceptibilidad a infecciones”, siendo muy probable que esta condición infecciosa se esté presentando por una suma de factores (cambio en la expresión de genes y alteración de la composición de la microbiota vaginal).

## 6. Perspectivas

Con lo analizado en este proyecto experimental se considera se tiene suficiente información para justificar el planteamiento de un diseño experimental *in vivo*. En el cual podamos identificar si existen alteraciones en la expresión de genes en una condición de infección y tratamiento hormonal anticonceptivo con Levonorgestrel y comparar si estas modificaciones son similares a las encontradas en el análisis *in silico* en una condición de sólo tratamiento con Levonorgestrel. Esto con el fin de probar si en efecto esta condición alterada de los genes durante sólo el tratamiento se mantiene o cambia en una condición de infección. De igual forma se sugiere un segundo análisis de la composición del microbiota vaginal para probar si en efecto la diversidad de especies cambia durante el tratamiento con Levonorgestrel. Así, reconocer que este grupo de EAs (infección/infestación) sí tienen relación causal con el uso del fármaco Levonorgestrel convirtiéndose en una RAM identificada, la cual pueda ser reconocida por la instancia de salud encargada de la farmacovigilancia (CNFV “Centro Nacional de Farmacovigilancia”) y ser regulada para la correcta protección del paciente que haga uso de este medicamento.



## 7. Referencias

- Ley General de Salud. (2022). *Móvil-Ley General de Salud*. Obtenido de Ley General de Salud:  
[https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf\\_mov/Ley\\_General\\_de\\_Salud.pdf](https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf_mov/Ley_General_de_Salud.pdf)
- Alberta, U. d. (2022). *DrugBank online*. Obtenido de DrugBank:  
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00367>
- AEMPS. (2020). *CIMA*. Obtenido de CIMA:  
[https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/77458/Prospecto\\_77458.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/77458/Prospecto_77458.html)
- Américas, S. e. (2016). *Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica*. Obtenido de PAHO:  
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/senales-farmacovigilancia-10-16.pdf>
- Angajala, A., Lim, S., Phillips, J., Kim, J.-H., Yates, C., You, Z., & Tan, M. (2018). Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights into Immuno-Metabolism. *Frontiers in Immunology*, 1605.
- Benzecri, J.-P., & Colaboradores. (1976). *Análisis de datos*. París: Dunod.
- Dahn, A., Saunders, S., Hammond, J., Carter, D., Kirjavainen, P., Anukam, K., & Reid, G. (2008). Effect of bacterial vaginosis, Lactobacillus and Premarin estrogen replacement therapy on vaginal gene expression changes. *Microbes Infect*, 620-7.
- Diario Oficial de la Federación. (19 de Julio de 2017). NORMA Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2016, Instalación y operación de la farmacovigilancia. CDMX, México.
- Doyle, M. (2021). *Visualization of RNA-Seq results with Volcano Plot*. Obtenido de Galaxy Taining Project: <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/transcriptomics/tutorials/rna-seq-viz-with-volcanoplot/tutorial.html>
- DrugBank. (23 de 07 de 2022). *PubChem*. Obtenido de NIH:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13109>

- Elsevier, C. (2018). Lesiones por fármacos: reacciones adversas a medicamentos. *ELSEVIER*.
- ELSEVIER, C. (2018). Lesiones por fármacos: reacciones adversas a medicamentos. *ELSEVIER*.
- Edgren, R., & Stanczyk, F. (2000). Nomenclature of Gonane Progestins. *ELSEVIER*.
- EMBL. (2022). *Levonorgestrel*. Obtenido de SIDER 4.1: <http://sideeffects.embl.de/drugs/4542/>
- EMBL, S. (2022). Obtenido de SIDER 4.1: Side Effect Resource.: <http://sideeffects.embl.de>
- FDA. (2022). *Adverse Events Reporting System Public Dashboard*. Obtenido de FAERS: <https://fis.fda.gov/sense/app/95239e26-e0be-42d9-a960-9a5f7f1c25ee/sheet/7a47a261-d58b-4203-a8aa-6d3021737452/state/analysis>
- FDA. (2022). *FAERS*. Obtenido de <https://www.fda.gov/drugs/questions-and-answers-fdas-adverse-event-reporting-system-faers/fda-adverse-event-reporting-system-faers-public-dashboard>
- Fernández, C. (2021). *Análisis individual de los cambios metabólicos transcripcionales en pacientes con cáncer de colon y su asociación con el perfil inflamatorio tumoral*. Xalapa: UNIVERSIDAD VERACRUZANA.
- Filby, C., & Mortlock, S. (06 de Diciembre de 2021). *GEO*. Obtenido de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE188915>
- Ganeshan, K., & Chawla, A. (2014). Metabolic Regulation of Immune Responses. *Annu Rec Immunol*, 609-634.
- García, M., Espinal, J., & Hernández, E. (2015). Pathway Analysis: State of the Art. *Frontiers in Physiology*.
- Gatto, L. (2022). Chapter 5 Differential expression analysis. En L. Gatto, *Omics Data Analysis*. Obtenido de Omics Data Analysis: [cbio.github.io/WSBIM2122/sec-rnaseq.html](https://cbio.github.io/WSBIM2122/sec-rnaseq.html)
- Giménez, D. (Septiembre de 2017). *Biblos-e Archivo*. Obtenido de Repositorio UAM: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/681070>

- Hammer, O., Harper, D., & Ryan, P. (3 de Junio de 2020). PAST 4.03. *Paleontological Statistics Software Package*.
- Hughes, S., Pandey, U., Johnston, C., Marrazzo, J., & al., e. (30 de Diciembre de 2020). *GEO*. Obtenido de NCBI:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE142058>
- Hughes, S., Pandey, U., Johnston, C., Marrazzo, J., Hladik, F., & Micks, E. (2021). Impact of the menstrual cycle and ethinyl estradiol/etonogestrel contraceptive vaginal ring on granulysin and other mucosal immune mediators. *American Journal of Reproductive Immunology*.
- Minitab Statistical, S. (2021). *Soporte de Minitab 20*. Obtenido de ¿Qué es el valor p ajustado en las comparaciones múltiples?: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/anova/supporting-topics/multiple-comparisons/what-is-the-adjusted-p-value/>
- Montané, E., & Santesmases, J. (2020). Adverse drug reactions. *Medicina Clínica*, 178-184.
- NCBI. (2021). *GEO*. Obtenido de GEO2R: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>
- NCI. (23 de 07 de 2022). *PubChem*. Obtenido de NIH:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13109>
- NIH. (22 de Agosto de 2022). *Genome gov*. Obtenido de National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Expresion-genica>
- NIH/NVI. (2019). *WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit* . Obtenido de WebGestalt: <http://www.webgestalt.org>
- OPS. (07 de Febrero de 2022). *Farmacovigilancia*. Obtenido de <https://www.paho.org/es/temas/farmacovigilancia>
- Pla, L. (2006). BIODIVERSIDAD: INFERENCIA BASADA EN EL ÍNDICE DE SHANNON Y LA RIQUEZA . *Interciencia*.
- PAHO. (2014). Señales en farmacovigilancia para las Americas.
- Porto, J. (2019). Reacciones adversas a medicamentos. Generalidades. Criterios de derivación. *SEICAP*, 285-95. Obtenido de Asociación Española de Pediatría:

- [https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/20\\_ra\\_medicamentos\\_generalidades.pdf](https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/20_ra_medicamentos_generalidades.pdf)
- Reid, G., Anukam, K., Kirjavainen, P., Carter, D., Hammond, J., Saunders, S., & Dahn, A. (28 de Abril de 2018). *GEO*. Obtenido de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE113771>
- Ryan, Harper, & Whalley. (Junio de 2022). *PAST - Palaeontological Statistics*. Oslo, Noruega.
- Sánchez-Niubò, A., C. F., & F. B. (2016). Utilidad de los diagramas causales para conceptualizar mecanismos en epidemiología laboral. *Arch Prev Riesgos Labor*, 1578-2549.
- Salazar, J., Segovia, L., González, C., & Pérez, I. (18 de 04 de 2017). Tema 9: La cadena epidemiológica y su importancia en el estudio de las enfermedades infecciosas. Bogotá, Colombia.
- Secretaría de Salud. (19 de Julio de 2017). *NORMA Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2016, Instalación y operación de la farmacovigilancia*. Obtenido de [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5490830&fecha=19/07/2017#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5490830&fecha=19/07/2017#gsc.tab=0)
- Smith-McCune, K., Thomas, R., Averbach, S., Seidman, D. T., Giudice, L., & Houshdaran, S. (29 de Abril de 2020). *GEO*. Obtenido de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE137765>
- Sorrentino, S., & Remmert, L. (2020). *Manual Mosby de cuidados básicos de Enfermería*. Elsevier.
- Turner, S. (4 de Diciembre de 2015). *R bloggers*. Obtenido de R bloggers: <https://www.r-bloggers.com/2015/12/tutorial-rna-seq-differential-expression-pathway-analysis-with-sailfish-deseq2-gage-and-pathview/>
- Vásquez, D., & Ospino, A. (2020). Anticonceptivos orales combinados. *Ginecología Y Obstetricia de México*, S13-S31.
- Weesels, I., Fischer, H., & Rink, L. (2021). Dietary and Physiological Effects of Zinc on the Immune System. *Annual Review of Nutrition*, 133–175.
- Weijun, L. (2022). *Generally Applicable Gene-set/Pathway Analysis*. Obtenido de Bioconductor:

<https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/gage/inst/doc/gage.pdf>

Wessels, J., & Kaushic, C. (17 de Octubre de 2019). *GEO*. Obtenido de NCBI:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE138971>

Zhang, T., de Waard, A., Wuhrer, M., & Spaapen, R. (2019). The Role of Glycosphingolipids in Immune Cell Functions. *Frontiers*.