# COME AGISCE IL LEVONORGESTREL NEL PREVENIRE LA GRAVIDANZA QUANDO VIENE USATO COME CONTRACCETTIVO D'EMERGENZA (LNG ECPs)? CONSIDERAZIONI SULLO STATEMENT CONGIUNTO DI ICEC E FIGO.

**Bruno Mozzanega , Erich Cosmi**
**Dipartimento di Scienze Ginecologiche e della Riproduzione Umana – Università degli Studi di Padova.**

Riassunto

In questo articolo esaminiamo con attenzione lo Statement congiunto dell'International Consortium for Emergency Contraception (ICEC) e dell' International Federation of Gynecology & Obstetrics (FIGO) relativo al meccanismo d'azione delle Pillole Contraccettive d'Emergenza a base di solo Levonorgestrel (LNG ECPs) proprio a partire dalla lettura degli articoli scientifici citati a supporto dello stesso.
Le conclusioni dello Statement non sembrano corrispondere a quanto descritto negli articoli dalla Letteratura, specie in relazione alla capacità delle LNG ECPs di inibire l'ovulazione e alla loro supposta neutralità sul tessuto endometriale.

**…….**

## Introduzione

Gli Statements pubblicati da Società Scientifiche Mediche Internazionali sono documenti particolarmente importanti: essi servono da linee-guida per le scelte professionali di migliaia di Medici in tutto il mondo, i quali spesso si affidano completamente alle loro conclusioni. La responsabilità etica e scientifica delle Società Scientifiche è quindi particolarmente alta.
Circa un anno fa la International Federation of Gynecology & Obstetrics (FIGO) ha emesso uno Statement Congiunto con la International Consortium for Emergency Contraception (ICEC) sul meccanismo d'azione delle Pillole Contraccettive d'Emergenza a base di solo Levonorgestrel (LNG ECPs). Lo Statement è stato pubblicato in Inglese e Spagnolo e ne viene annunciata anche la traduzione in Francese (dal sito web ufficiale della FIGO).
La domanda cui rispondere era: *"How do levonorgestrel-only emergency contraceptive pills (LNG ECPs) prevent pregnancy?"* una domanda in cui il termine "pregnancy" convenzionalmente copre la vita dell'embrione soltanto nella sua fase successiva all'impianto, lasciando fuori la sua settimana di vita antecedente, quella che dopo il concepimento lo porta ad annidarsi, che è il centro di ogni dibattito relativo al meccanismo d'azione delle ECPs.
Naturalmente la domanda suesposta è ancora completamente aperta.
Nonostante ciò, attraverso lo Statement [(1)], ICEC e FIGO pretendono di chiudere definitivamente il dibattito presentando LNG ECPs come farmaci che *"inhibit or delay ovulation".* Secondo gli Autori, *"this should be the primary and possibly the only mechanism of action for LNG ECPs".*
In supporto allo Statement, gli Esperti di ICEC e FIGO citano sei lavori [(2-8)] e concludono che l'Evidenza dimostra che le LNG ECPs interferiscono con il picco preovulatorio di LH, impedendo lo sviluppo e la maturazione dei follicoli e/o il rilascio dell'uovo stesso.
Dopo di ciò, sulla base della valutazione di ulteriore bibliografia [(2,3,9-14)] , essi concludono che *"Review of the evidence suggests that LNG ECPs cannot prevent implantation of a fertilized egg".* Infine, cercano possibili effetti delle LNG ECPs sulle funzioni degli spermatozoi [(15-18)], ma non riescono a raggiungere alcuna conclusione.

In questo articolo ci proponiamo di valutare le conclusioni dello Statement basando la nostra analisi sulle stesse Referenze bibliografiche dello Statement. La discussione seguirà lo stesso ordine di argomenti: Ovulazione, Impianto e, infine, funzioni degli Spermatozoi.
Naturalmente, i rapporti sessuali non protetti per cui si raccomandano le ECPs sono quelli che avvengono nel periodo fertile preovulatorio, che può durare fino a cinque giorni e termina intorno alla ovulazione. Di conseguenza l'uso di ECPs sembra appropriato soltanto dall'inizio di questo periodo fino a 72 ore dopo l'ovulazione e questo è esattamente l'intervallo temporale considerato dalla Letteratura citata nello Statement.

– **LNG ECPs: impatto sulla Ovulazione**

Obiettivo degli Autori era capire l'impatto delle LNG ECPs sull'ovulazione. Tre articoli si basano sul dosaggio degli ormoni urinari [2,4,5]; gli altri [3,6-8] associano il dosaggio degli ormoni urinari e plasmatici; tutti, tranne Hapanagama [4], hanno usato ultrasuoni per monitorare la crescita follicolare. Ogni studio ha dichiarato che le donne arruolate erano sane e con cicli mestruali normali

Hapanagama [4] riferisce di 12 pazienti: quattro di esse assunsero LNG ECPs (0.75 mg x 2) a una distanza ≥ 3 giorni dal picco di LH e la loro ovulazione venne ritardata; una fu trattata nel giorno LH–2 (2 giorni prima del picco) e non ovulò. Sette pazienti apparentemente ovularono ma mostrarono ridotti livelli luteali di LH e una fase luteale breve: gran parte di loro fu trattata nel giorno LH–1, una nel giorno LH–0, il giorno del picco.

Marions [2] somministrò due volte LNG ECPs (0.75 mg x 2) a sei donne: la prima volta nel giorno LH–2; la seconda dopo l'ovulazione, nel giorno LH+2. Valutò sia i livelli ormonali urinari, sia una biopsia endometriale ottenuta nel giorno LH+(6-8).
Il trattamento pre-ovulatorio inibì il picco di LH; tuttavia, sia la lunghezza del ciclo che i livelli di estrone e pregnanediol glucuronide risultarono simili a quelli del ciclo di controllo. Il trattamento post-ovulatorio non modificò le caratteristiche del ciclo, ma l'endometrio risultò istologicamente normale soltanto in tre pazienti (50%), asincrono (out of phase) in due e insufficiente in una.

Successivamente [5] somministrò lo stesso trattamento a sette donne nel giorno LH–2; e valutò sia il comportamento degli ormoni urinari sia il destino del follicolo dominante: un aumento chiaro del rapporto LH/Creatinina fu riscontrato in quattro dei sette cicli nei giorni LH+1 e LH+2 con un analogo ritardo nella salita dei livelli del progesterone. Tuttavia, I follicoli dominanti osservati con ultrasuoni evidenziarono un arresto della crescita (n = 3) o una crescita continua fino alla mestruazione successiva (n = 4), suggerendo che l'ovulazione non si era verificata.

Durand [3] studiò quarantacinque donne; somministrò LNG ECPs (0.75 mg x 2) in diversi momenti del ciclo: nel giorno 10 (15 pazienti, Gruppo A), nel giorno LH–0 (picco di LH) (11 pazienti, Gruppo B), nel giorno LH+2 (11 pazienti, Gruppo C), o nella fase follicolare avanzata LH–(3±1) (8 pazienti, Gruppo D). Una ecografia transvaginale e il dosaggio di LH sierico vennero effettuate ogni giorno dal momento in cui LH divenne dosabile nell'urina fino alla rottura del follicolo. I livelli sierici di estradiolo e progesterone vennero dosati durante tutta la fase luteale. Una biopsia endometriale fu effettuata nel giorno LH+9.
Dodici pazienti nel Gruppo A non ovularono (8o%), le altre tre ovularono ma presentarono un significativo accorciamento della fase luteale con livelli luteali notevolmente inferiori di progesterone. Tutte le donne nei Gruppi B, C, e D mostrarono segni ultrasonografici di rottura del follicolo, e LNG non modificò il giorno del ciclo in cui si verificò l'ovulazione. Nei Gruppi B e C non si osservarono differenze significative sia nella lunghezza del ciclo sia nei livelli sierici luteali di progesterone ed estradiolo rispetto ai cicli di controllo, mentre nel Gruppo D la lunghezza del ciclo risultò normale ma i livelli sierici luteali di progesterone risultarono significativamente ridotti. Quanto alla istologia endometriale, l'Autrice conclude

che essa risultò normale in tutti i cicli trattati in cui si verificò l'ovulazione. Tuttavia, riferisce anche che vennero esaminati soltanto 24 endometri su 33 prelevati nelle pazienti con cicli ovulatori, mentre nove furono esclusi. Gli esclusi furono tutti i tre dal Gruppo A e quattro dal Gruppo D (50%), che risultarono asincroni (out of phase), un ulteriore endometrio dal Gruppo D e uno dal Gruppo B, che risultarono quantitativamente insufficienti. Di conseguenza le 24 biopsie valutate e riportate come normali provenivano quasi interamente dai Gruppi B e C, quelli in cui LNG era stato assunto al momento dell'ovulazione o successivamente.

Okewole [(7)] somministrò LNG (1.5 mg) in un'unica dose a quattordici donne nel periodo peri-ovulatorio per verificare i suoi effetti sui livelli sierici di gonadotropine, estradiolo e progesterone. Otto donne (Gruppo A) furono trattate nel giorno LH–3, mentre sei (Gruppo B) nel giorno LH–1.
LNG prolungò significativamente la durata del ciclo nelle otto donne del Gruppo A con un ritardo nel picco di LH di 96-120 ore. Nelle sei donne del Gruppo B, al contrario, si osservò un accorciamento nell'intera durata del ciclo (circa cinque giorni), mentre il picco di LH fu ritardato non significativamente (24 ore). L'Autore concluse che la somministrazione di LNG nella fase follicolare avanzata (Gruppo B) non interferì con il picco di gonadotropine estradiolo-mediato di metà ciclo e probabilmente con l'ovulazione, ma alterò la produzione di progesterone dal corpo luteo con una fase luteale significativamente più breve.

Infine l'articolo di Croxatto [(8)]: egli somministrò alternativamente o LNG ECPs (0.75 mg x 2), o LNG ECPs (0.75 mg in unica dose), oppure placebo, a 58 donne presunte sane e con cicli normali. Le pazienti vennero randomizzate in tre gruppi: un gruppo fu trattato quando il follicolo dominante raggiunse un diametro medio di 12–14 mm (n=18); il secondo quando il diametro del follicolo era di 15–17 mm (n=22); il terzo gruppo quando il follicolo raggiunse un diametro ≥18 mm (n=18). Una ecografia transvaginale (TVU) fu effettuata per stabilire il diametro medio del follicolo dominante e successivamente per verificare la rottura del follicolo stesso. Una volta raggiunto il diametro follicolare pre-assegnato, venne effettuata una TVU giornalmente nei cinque giorni consecutivi e poi due volte alla settimana fino alla mestruazione in caso di mancata rottura del follicolo. Campioni di sangue per il dosaggio ormonale vennero prelevati giornalmente all'inizio del trattamento e nei cinque giorni successivi, e poi due volte alla settimana fino alla mestruazione.
Ciò che colpisce è che dopo trattamento con placebo solo il 59% delle donne ovularono normalmente. Esse erano state presunte sane e normo-ovulatorie, ma in esse si verificò un'incidenza piuttosto alta di mancata rottura del follicolo o di disfunzione ovulatoria anche dopo la somministrazione di innocuo placebo: fino al 62% quando ricevettero il placebo a un diametro follicolare di 12–14 mm, 45% a 15–17 mm e 13% di mancata rottura del follicolo quando il diametro follicolare era ≥18 mm.
La proporzione complessiva di cicli con mancanza di rottura follicolare o disfunzione ovulatoria era intorno all'82% dopo LNG, mentre era stata del 41% dopo somministrazione di placebo ($p<0.001$). Raggruppando insieme la mancanza di rottura follicolare e la disfunzione ovulatoria, l'una o l'altra era presente nel 97%, 88% e 57% dei cicli quando il LNG veniva somministrato con un follicolo di 12–14 mm, 15–17 mm or ≥18 mm, rispettivamente.
I dati di Croxatto meritano più di un commento.
*Primo*: le pazienti venivano presentate come donne con cicli normali, ma solo il 59% ebbe una normale ovulazione nel ciclo non trattato con LNG.
*Secondo*: la disfunzione ovulatoria è stata definita come rottura del follicolo non preceduta da un picco di LH, o preceduta da un picco di LH smorzato, o non seguita da una salita di Progesterone sierico oltre 12 nmol/L. Per rendere impossibile la fecondazione, essa dovrebbe essere accompagnata da un mancato distacco del complesso cumulo-ovocita; tuttavia, questo implicherebbe che la cascata collagenolitica che si attiva nel follicolo per la sua rottura venga

ad essere così selettiva e limitata da non avere alcun effetto sul distacco del cumulo ooforo. Inoltre, dati sperimentali citati da Croxatto stesso [22] riportavano che la probabilità di concepire nei cicli spontanei era correlata alle caratteristiche del picco di LH: ma era solo ridotta, non annullata quando il picco si presentava attenuato o breve. Infatti, un picco di LH basso (25–42 IU/L) e breve (1 solo giorno) era associato [22] a un tasso di gravidanza più basso (5.6%), mentre raggiungeva il 23% con un picco di LH di due giorni e di livello superiore alle 42 IU/L.
*Terzo*: Croxatto stesso, citando dati propri [6], riportò che esiste una grande variabilità nel tempo necessario perché un follicolo di dimensione data arrivi a rottura. Per esempio [6], in un gruppo di 24 donne ci vollero da 4 a 10 giorni perché un follicolo di 12-14 mm arrivasse al giorno della rottura. Ciò significa che le 18 donne che erano state arruolate con un follicolo dominante di tali dimensioni verosimilmente non erano ancora nel periodo fertile del ciclo, e che tutt'al più solo poche di loro erano proprio al suo inizio.
Nondimeno, anche supponendo che tutte le considerazioni di Croxatto fossero corrette, non possiamo tralasciare il fatto che maggiore è il diametro del follicolo dominante, maggiore è la probabilità che l'ovulazione si verifichi e possa seguirne il concepimento, e questa possibilità non può mai essere esclusa, nemmeno quando LNG è somministrato negli stadi più precoci di sviluppo follicolare. E questa probabilità apparirebbe ancora maggiore se dallo studio fossero state escluse le pazienti che ancora non erano nel periodo fertile del ciclo.

Considerando l'insieme degli studi, solo quello di Marion [5] (sette pazienti) supporta direttamente la tesi dello Statement. I risultati dei rimanenti studi sono perlomeno contrastanti, anche se dovessimo dare per scontati un alto numero di casi di luteinizzazione follicolare, peraltro assolutamente non dimostrati negli studi esaminati. Inoltre, le 24 pazienti in cui LNG aveva posticipato l'ovulazione [3,4,7] erano all'inizio del loro periodo fertile (decimo giorno di ciclo o LH–≥ 3) quando ricevettero LNG e così pure le 18 pazienti trattate quando il loro follicolo dominante aveva un diametro di 12-14 mm. Rapporti sessuali non protetti nei giorni precedenti erano avvenuti verosimilmente in periodo non fertile quando il rischio di concepire era praticamente nullo. Infine, il numero esiguo di pazienti valutate (solo 142, suddivise in sei diversi studi e ulteriormente in sottogruppi differenti) fa sì che il campione non sia affatto rappresentativo e ci si chiede perché gli Esperti qualificati di ICEC e FIGO abbiano voluto rilasciare lo Statement sulla base di dati insufficienti e contraddittori.

– LNG ECPs: impatto sull'Impianto

Nello Statement, oltre a concludere che l'inibizione o il ritardo dell'ovulazione è il principale meccanismo d'azione del LNG, gli Esperti di ICEC e FIGO suggeriscono anche che *"Review of the evidence suggests that LNG ECPs cannot prevent implantation of a fertilized egg"* e che *"Language on implantation should not be included in LNG ECP product labelling"*.
Vediamo quale sia l' *evidenza* sugli effetti endometriali del LNG. In alcuni degli studi già valutati [2-4,7] l'ovulazione era seguita da una fase luteale breve o inadeguata e in alcune pazienti che avevano ovulato l'endometrio luteale era asincrono (out of phase); queste osservazioni non possono essere conclusive, ma suggeriscono qualche tipo di difficoltà per l'embrione che sta impiantandosi.
La stessa Durand, alcuni anni dopo [11], aggiunse informazioni che appaiono ancora più importanti, e che appaiono nella bibliografia degli Esperti ICEC e FIGO. Utilizzando gli stessi materiali del suo studio precedente [3] in modo retrospettivo, evidenziò una bassa presenza (low staining score) di glycodelina-A endometriale nelle pazienti trattate con LNG nel giorno LH−(3±1), le stesse pazienti descritte precedentemente come Gruppo D: proprio le stesse che ovularono ma ebbero livelli luteali di progesterone significativamente minori. Questo effetto endometriale non viene identificato dalla normale istologia e può riflettere sia un effetto diretto del LNG oppure un suo effetto indiretto dovuto ad un insufficiente produzione di progesterone dal corpo luteo. Dato l'effetto inibitorio della glycodelina-A sulle

cellule natural killer, abbondanti nel sito di impianto, una ridotta espressione endometriale di glycodelina-A può indicare un microambiente con immunosoppressione ridotta in corrispondenza dell'interfaccia materno-fetale proprio nel momento cruciale dell'impianto.
Per converso, due studi dalla Svezia [10,12] hanno dimostrato che LNG non inibisce né l'attecchimento della blastocisti umana a un modello colturale tridimensionale di cellule endometriali in vitro, né l'espressione da parte dello steso modello dei fattori di recettività endometriali regolati dal progesterone. Nello Statement di ICEC e FIGO si pretende che questi dati dimostrino l'assenza di ogni effetto antinidatorio per le LNG ECPs.
Nel primo di questi studi Lalitkumar [12] dimostrò che il LNG non inibiva l'impianto di blastocisti umane a un modello colturale tridimensionale di cellule endometriali in vitro. Nell'esperimento essa coltivò ed utilizzò tessuto endometriale secretivo fisiologico prelevato da 22 volontarie con cicli mestruali regolari e documentata fertilità. I campioni furono prelevati nei giorni del ciclo LH+4 to LH+5, che furono determinati attraverso l'individuazione del picco di LH in campioni di urine raccolti due volte al giorno da tutte le volontarie candidate alla biopsia. Dopo aver coltivato le cellule e organizzato il modello, valutò il tasso di impianto delle blastocisti umane quando al mezzo di coltura veniva aggiunto progesterone da solo oppure progesterone e LNG. Osservò un tasso di impianto sovrapponibile in entrambi i casi e concluse che il LNG non inibiva l'impianto.
Nel secondo studio [10] lo stesso gruppo dimostrò che il medesimo modello tridimensionale di cellule endometriali stromali ed epiteliali coltivate insieme in vitro esprime i fattori di recettività endometriali, regolati dal progesterone, che si osservano in condizioni del tutto fisiologiche e che il trattamento con LNG non ne modificava l'espressione.
Nonostante gli sforzi degli Autori dello Statement, riteniamo che i risultati di entrambi gli studi Svedesi difficilmente possano essere utilizzati per sostenere l'ipotesi che le LNG ECPs non inbiscano l'impianto dell'embrione.
Infatti, l'endometrio luteale per entrambi gli studi era stato ottenuto da donne con ciclo mestruale normale che non avevano assunto LNG ECPs durante il loro periodo fertile. I prelievi bioptici erano stati effettuati durante la fase luteale di cicli normali non trattati, dopo un'accurata individuazione del picco di LH. Questo modello non potrà mai essere rappresentativo del tessuto endometriale di cicli in cui LNG ECPs siano state somministrate nel periodo pre- o peri-ovulatorio. I risultati di questi studi potrebbero dimostrare soltanto che le LNG ECPs somministrate 4-5 giorni dopo il concepimento non possono impedire l'impianto dell'embrione; ma non è certo questo il momento in cui si assume, per sua stessa definizione, la pillola del giorno dopo.

– LNG ECPs : impatto sul muco cervicale e sulle funzioni degli spermatozoi

Solo poche parole sulla possibiltà che le LNG ECPs alterino le funzioni degli spermatozoi. Lo Statement conclude che *"Research on the effect of LNG ECPs on sperm is inconclusive"*. Sarebbe meglio dire che la Ricerca nega ogni effetto del LNG, alle dosi usate nelle ECPs, sia sulle funzioni degli spermatozoi [21] , sia sulla qualità del muco cervicale, sia infine sulla penetrazione degli spermatozoi dentro la cavità uterina; infatti spermatozoi vitali vennero rinvenuti nel tratto genitale 36–60 h dopo il coito e 24–48 h dopo l'assunzione di LNG [18].

In conclusione, lo Statement Congiunto dell'ICEC e della FIGO non sembra un contributo finalizzato a chiarire in quale modo le LNG ECPs evitino le gravidanze. Al contrario, il suo intento sembra quello di chiudere il dibattito attraverso una risposta autoritaria piuttosto che autorevole: un tentativo finalizzato a rendere le ECPs eticamente accettabili anche per chi non accetti di interferire con la vita del concepito. Il dibattito su una tematica così ricca di contenuti etici pregnanti esige la massima prudenza ed il più alto rigore scientifico, anche a costo di lasciare un problema irrisolto, nel doveroso rispetto della verità scientifica e della libertà di scelta sia delle pazienti sia dei medici.

REFERENCES


1. International Consortium for Emergency Contraception (ICEC), International Federation of Gynecology & Obstetrics (FIGO). *Statement on Mechanism of Action (October 2008).* http://www.figo.org/news/joint-statement-international-consortium-emergency-contraception
2. Marions L, Hultenby K, Lindell I, Sun X, Stabi B, Gemzell Danielsson K. Emergency contraception with mifepristone and levonorgestrel: mechanism of action. *Obstet Gynecol* 2002; **100**: 65-71
3. Durand M, del Carmen Cravioto M, Raymond EG, Duran-Sanchez O, De la Luz Cruz-Hinojosa M, Castell-Rodriguez A, Schiavon R, Larrea F. On the mechanisms of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception* 2001; **64**: 227-34
4. Hapangama D, Glasier AF, Baird DT. The effects of peri-ovulatory administration of levonorgestrel on the menstrual cycle. *Contraception* 2001; **63**: 123-9.
5. Marions L, Cekan SZ, Bygdeman M. Gemzell-Danielsson K. Effect of emergency contraception with levonorgestrel or mifepristone on ovarian function. *Contraception* 2004; **69**: 373-7.
6. Croxatto HB, Brache V, Pavez m, Cochon L, Forcelledo ML, Alvarez F, Massai R, Faundes A, Salvatierra AM. Pituitary-ovarian function following the standard levonorgestrel emergency contraceptive dose or a single 0.75 mg dose given nel giornos preceding ovulation. *Contraception* 2004: **70**: 442-50.
7. Okewole IA, Arowojolu AO, Odusoga OL, Oloyede OA, Adeleye OA, Salu J, Dada OA. Effect of single administration of levonorgestrel on the menstrual cycle. *Contraception*. 2007; **75**: 372-7
8. Croxatto HB, Devoto L, Durand M, Ezcurra E, Larrea F, Nagle C, Ortiz ME, Vantman D, Vega M, von Hertzen H. Mechanism of action of hormonal preparations used for emergency contraception: a review of the literature. *Contraception* 2001; **63**: 111-21
9. Novikova N, Weisberg E, Stanczyk FZ, Croxatto HB, Fraser IS. Effectiveness of levonorgestrel emergency contraception given before or after ovulation – a pilot study. *Contraception* 2007: **75**: 112-8.
10. Meng CX, Andersson KL, Bentin-Ley U, Gemzell-Danielsson K, Lalitkumar PG. Effect of levonorgestrel and mifepristone on endometrial receptivity markers in a three-dimensional human endometrial cell culture model. *Fertil Steril* 2008 Jan 16 (Epub ahead of print)
11. Durand M, Seppala M, Cravioto M del C, Koistinen H, Koistinen R, Gonzalez-Macedo J, Larrea F. Late follicular phase administration of levonorgestrel as an emergency contraceptive changes the secretory pattern of glycodelin in serum and endometrium during the luteal phase of the menstrual cycle. *Contraception* 2005; **71**: 451-7.
12. Lalitkumar PG, Lalitkumar S, Meng CX, Stavreus-Evers A. Hambiliki F, Bentin-Ley U, Gemzell-Danielsson K. Mifepristone, but not levonorgestrel, inhibits human blastocyst attachment to an in vitro endometrial three-dimensional cell culture model. *Hum Reprod* 2007; **22**: 3031-7.
13. Müller A, Llados C, Croxatto HB. Postcoital treatment with levonorgestrel does not disrupt postfertilization events in the rat. *Contraception* 2003; **67**: 415-9.
14. Ortiz ME, Ortiz RE, Fuentes A, Parraguez VH, Croxatto HB Post-coital administration of levonorgestrel does not interfere with post-fertilization events in the new world monkey Cebus apella. *Hum Reprod* 2004; **19**: 1352-6.
15. Kesseru E, Camacho-Ortega P, Laudahn G, Schopflin G. In vitro action of progestogens on sperm migration in human cervical mucus. *Fertil Steril* 1975; **26**: 57-61.
16. Kesseru E, Garmendia F, Westphal N, Parada J. The hormonal and peripheral effects of d-norgestrel in postcoital contraception. *Contraception* 1974; **10**: 411-24.

17. Munuce MJ; Nascimento JAA; Rosano G; Faundes A; Bahamondes L. Doses of levonorgestrel comparable to that delivered by the levonorgestrel releasing intrauterine system can modify the in vitro expression of zona binding sites of human spermatozoa *Contraception* 2006; **73**: 97-101.
18. Do Nascimento JA, Seppalla M, Perdigao A, Espejo-Arce X, Munuce MJ, Hautala L, Koistinen R, Andrade L, Bahamondes L. In vivo assessment of the human sperm acrosome reaction and the expression of glycodeling-A in human endometrium after levonorgestrel-emergency contraceptive pill administration. *Hum Reprod* 2007; **22**: 2190-5.
19. De Santis M, Cavaliere AF, Straface G, Carducci F, Caruso A. Failure of the emergency contraceptive levonorgestrel and the risk of adverse effects in pregnancy and on fetal development: an observational cohort study. *Fertil Steril* 2005; **84**: 296-9.
20. Bigrigg A, Evans M, Gbolade B, Newton J, Pollard L, Szarewski A, Thomas C, Walling M. Depo Provera: Position paper on clinical use, effectiveness and side effects. *Brit J Family Planning* 1999; **25**: 69-76.
21. Yeung WSB, Chiu PCN, Wang CH, Yao YQ, Ho P. The effects of levonorgestrel on various sperm functions. *Contraception* 2002; **66**: 453-7.
22. Cohen BJ, Rein te Velde E, Scheffer G, Van Kooij RJ, De Brouwer CPM, Van Zonneveld P. The pattern of the luteinizing hormone surge in spontaneous cycles is related to the probability of conception. *Fertil Steril* 1993; **60**: 413-7. (quoted by 8)