ESTUDIO MICROSCÓPICO DEL HIDROGEL CERVICAL PARA FACILITAR EL CONOCIMIENTO DE LA FERTILIDAD

C. Medialdea[3,1], M. Tortajada[1], F. Bosch[2]
[1]Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Valencia, España. [2]Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología, Universidad Cardenal Herrera. CEU. Valencia. España. [3]Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares, Valencia, España

[3]La correspondencia puede ser enviada a: Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF). Agrupación Clínica., Cronista Carreres nº 8, Valencia, España. E-mail: cursos@ivaf.org

RESUMEN: Hemos estudiado mediante microscopia óptica moco cervical humano de distintos momentos del ciclo ovárico: aspectos de la canalización y de la cristalización en muestras extraídas por el ginecólogo y muestras autoextraídas por las pacientes. METODO: Son 745 muestras procedentes de 117 pacientes. 651 muestras son de autoextracción y 94 extraídas por ginecólogo. 711 son de ciclos espontáneos, 25 de periodo de lactancia materna y 7 de ciclos inducidos con gonadotrofinas (FSH-LH). Hemos extendido el moco cervical sobre el porta según el método " spread it out" (Odeblad 1994) y hemos estudiado la canalización y elementos relativos a la misma en la parte de la muestra que ha secado bajo cubreobjetos, y la cristalización en la parte que ha secado sin cubrir. RESULTADOS: Proponemos una clasificación de la canalización simplificada en cinco grados y describimos por primera vez algunos elementos de importancia para determinar el grado de fertilidad. CONCLUSIONES: Nuestra clasificación de la canalización en cinco grados y los elementos descritos aquí sirven para conocer el grado de fertilidad de muestras de moco cervical extraídas en consulta, así como de las autoextraídas en casa.

Palabras clave: Canalización en moco cervical humano / Cristalización en moco cervical humano / Microscopia óptica / Método sintotérmico

Introduccion:

Entre los métodos para reconocer la fertilidad, destaca el método sintotérmico de doble comprobación (MSTDC) (Medialdea, 2001) cuya eficacia es de un índice de pearl de 2.3 cuando se usa para evitar el embrazo (Frank-Herrmann et al., 1997). El MSTDC sirve también para buscar el embarazo dentro del protocolo diagnóstico terapéutico de la infertilidad (Sánchez-Méndez, 1997). Aunque la mayoría de las mujeres pueden conocer su estado de fertilidad simplemente aplicando las reglas del MSTDC, hay algunas situaciones especiales en las que ello no es suficiente y se precisa del diagnóstico clínico, es entonces cuando resulta de utilidad el método de análisis con microscopio óptico que hemos pretendido facilitar y precisar con este estudio.

Mediante microscopia electrónica aplicada al moco cervical humano ha sido descrito por distintos autores aspecto de malla, de red compacta e impenetrable con niveles bajos de estrógenos, bajo influencia progesterónica, y red laxa y penetrable alrededor de la ovulación (Elstein et al., 1971; Chretien et al., 1973; Bonilla, 1983), o moco de tipo membranoso en fase posmenstrual y con amplios espacios que dejan pasar los espermatozoides durante la ovulación (Faccioli, 1984).

Mediante microscopia óptica en moco cervical secado al aire se ha descrito el fenómeno de la cristalización formando ramas, arborización o "ferning", y su observación se ha usado en un test para medir la actividad estrogénica (Rydberg, 1948; Roland, 1952 o Keseru, 1972).

La microscopia óptica en moco cervical secado bajo cubreobjetos ha permitido observar el fenómeno de la canalización, se ha contado el número de canales y se ha demostrado la estrógeno dependencia del fenómeno y su relación con el contenido de sales y de proteínas (Davajan et al., 1971; Flynn, 1973; Hilgers and Previl, 1979; Capella and Giacci, 1980; Faccioli, 1984; Garcea et al., 1984). Estas observaciones se hicieron desde la hipótesis de que todas las células secretoras del cervix trabajaban en sincronía produciendo un único tipo de moco que sin embargo mostraría distinto aspecto alrededor de la ovulación que lejos de la misma.

Algunos estudios sugieren que hay varios tipos de moco cervical que se producen en criptas específicas, en distintas áreas del cervix y en distinta cantidad en los distintos momentos del ciclo ovárico. Así, mediante microscopia óptica (MO) y resonancia magnética nuclear (RMN) aplicada a moco cervical mezclado, extraído del canal cervical, así como al extraído de criptas individuales se ha encontrado que contiene cuatro tipos distintos de secreciones: moco G (Gestagenic), L (Loaf), S (String), y P (Peack) (Odeblad, 1966, 1994a, 1997). El cálculo de los porcentajes de los estos distintos tipos de cristalización en una muestra de moco cervical, finamente extendido y secado al aire, permite conocer su grado de fertilidad con ayuda de un diagrama (Odeblad , 1997). Estudios más recientes en esta misma línea pero con microscopia electrónica de barrido han mostrado que la arquitectura molecular es distinta para cada uno de estos cuatro tipos (Menárguez et al., 2003). Temprano (1990) propuso una clasificación morfológica de la canalización en diez grados que nos ha servido como punto de partida de nuestro estudio de la canalización.

Partiendo de la hipótesis de la existencia de distintos tipos de moco cervical, hemos querido profundizar en la microscopia óptica del hidrogel cervical, concretamente en el estudio de la canalización, pero sin olvidar el estudio de los distintos tipos de cristalización, buscamos simplificar el estudio de las muestras bajo cubre y aportar algún avance que facilite o precise su diagnóstico clínico de fertilidad en ayuda de matrimonios usuarios del MSTDC que lo necesitan por encontrarse en alguna situación de especial dificultad en su intento de posponer o de buscar el embarazo.

Material y método

Muestras

Material para el estudio con el microscopio óptico (Tabla I):

Tabla I

Material del estudio microscópico

	Pacientes	**Muestras**
Ciclos espontáneos:		
Autoextracción	22	626
Consulta ginecológica	87	87
Lactancia materna:		
Autoextracción	1	25
Ciclos inducidos:		
Consulta ginecológica	7	7
Total	**117**	**745**

Las muestras de autoextracción han sido obtenidas por pacientes de la consulta del IVAF (edad media 33 años): 626 son de ciclos espontáneos y 25 de periodo de lactancia materna. De las muestras obtenidas por ginecólogo, 87 son de ciclos espontáneos (edad media 34 años), 58 de las cuales proceden de la consulta de infertilidad del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCV) y 29 de la consulta de ginecología de Agrupación Clínica de Valencia (AC), otras 7 muestras del HCV son de ciclos inducidos con gonadotropinas FSH y LH (edad media 35 años).

Colección de las muestras

Autoextracción por las pacientes:

Se ha obtenido el moco cervical del interior del canal cervical presionando con los dedos índice y corazón. Se ha anotado diariamente en el gráfico sintotérmico la temperatura corporal basal, la observacion del moco cervical, y en alguna ocasión el test de LH o las variaciones del cervix detectadas mediante autopalpación cervical.

Extracción por el ginecólogo:

Previa visualización del cervix uterino se ha recogido el moco del interior del canal cervical empleando una cánula de plástico (Jelco de Jonson&Jonson, nº 16-G) acoplada a una jeringa de 10 o 20cc.

Procesado de las muestras

Una cantidad muy pequeña de moco cervical se ha extendido con cuidado y muy finamente con ayuda de una aguja y en todas las direcciones según la técnica “spread it out”(Odeblad, 1994a). Se ha tapado parte de la muestra con un cubreobjetos, y el resto de la muestra ha quedado sin cubrir. Se ha guardado el porta con el número de paciente y la fecha en el archivador. Este proceso lo ha realizado la propia paciente en el caso de las muestras autoextraídas, y nosotros en el caso de las muestras obtenidas por el ginecólogo.

Método:

Hemos utilizado un microscopio Labophot-2 de Nikon con cámara fotográfica incorporada, y hemos usado un objetivo de 10X para el estudio de la canalización, y uno de 40X para el estudio de la cristalización y el calculo de porcentajes. En la parte de muestra secada al aire hemos observado los distintos tipos de cristalización cuando se trataba de muestras autoextraídas mientas que en las muestras extraídas en la consulta hemos calculado además los porcentajes de los distintos tipos de cristalización. Aunque al aire la muestra seca en 10´, se puede demorar el estudio porque las muestras se

mantienen en buenas condiciones durante años. En el moco tapado con el cubreobjetos hemos observado la canalización tras 72 horas de secado. Se puede secar más rápido introduciendo la muestra en estufa a 40ºC (Faccioli,1984).

Estudio de la cristalización:
En las muestras extraídas por el ginecólogo hemos realizado el cálculo de porcentajes de los distintos tipos de cristalización siguiendo el método descrito en Odeblad (1997) y comprobado por Menárguez (2003), y confirmamos que es un método útil para conocer el grado de fertilidad de estas muestras. Añadimos que en las muestras autoextraídas por la paciente es necesario insistir más en el extendido en todas direcciones porque este tipo de obtención lleva consigo arrastre de moco gestagénico de la portio, y aún así sólo se podrán observar los distintos tipos de cristalización como modo de confirmar y precisar lo observado bajo cubre. El cálculo y diagrama de porcentajes de Odeblad no sirve para conocer el grado de fertilidad de las muestras autoextraídas.

Estudio de la canalización:
Tras hacer un barrido en zig-zag de la zona bajo cubreobjetos (Fig. 1) hemos asignado el grado de canalización utilizando nuestra clasificación simplificada en cinco grados (Fig. 2). En las muestras extraídas por el ginecólogo hemos asignado el grado de canalización más frecuentemente observado, mientras que en las muestras autoextraídas hemos asignado el grado más alto observado, estudios previos nuestros no publicados confirman la validez de este criterio.

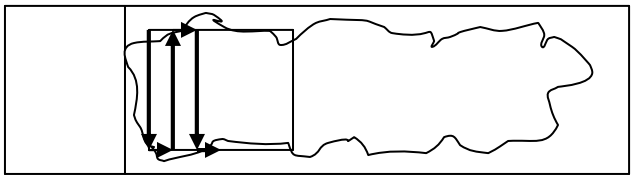


Fig. 1: recorrido en zig-zag que hacemos para analizar la muestra bajo cubre y asignar el grado de canalización.

Resultados

Proponemos una clasificación de la canalización simplificada, útil para clasificar tanto las muestras extraídas por ginecólogo, como las autoextraídas (Fig. 2 y 3):

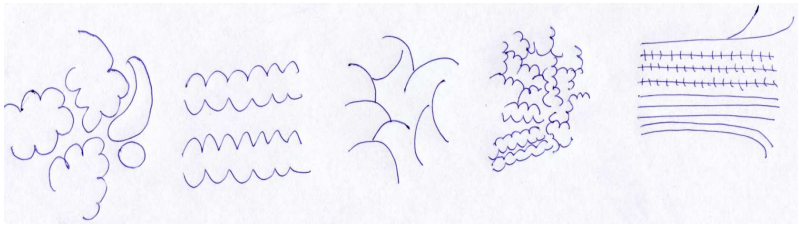


Fig. 2: Clasificación de la canalización en cinco grados. **I:** Nubes redondeadas y/o piedras de río; **II:** Nubes alargadas; **III:** Compactación grande; **IV:** Compactación pequeña; **V:** Canales con o sin espículas.

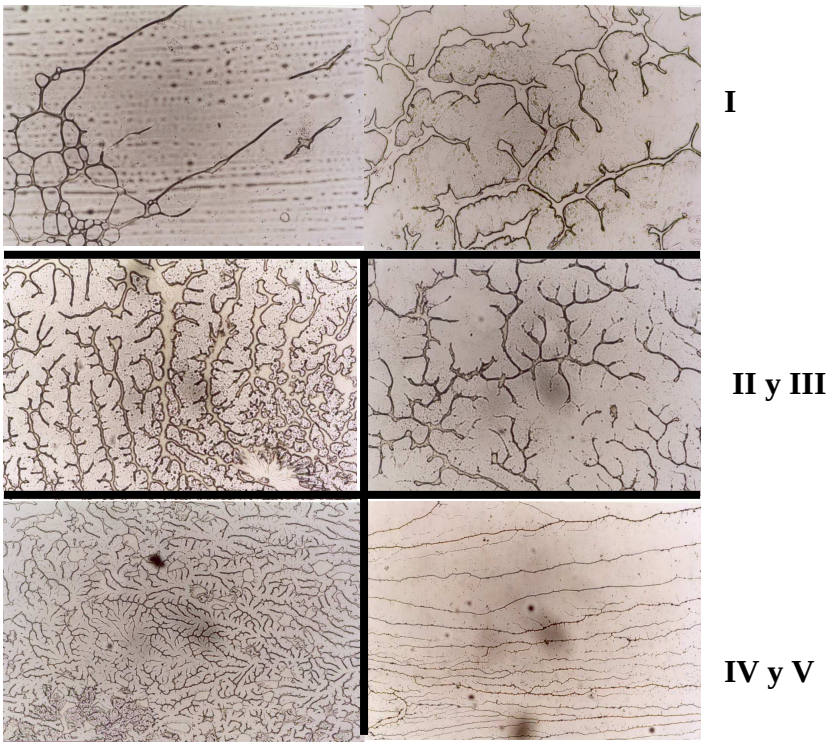


Fig. 3: Grado **I** (izda. y drcha.), Grado **II** (izda.), Grado **III** (drcha.), Grado **IV** (izda.), Grado **V** (drcha.).

Nuestra clasificación resulta sencilla de aplicar, los grados están perfectamente delimitados y resume bien el proceso evolutivo de conformación de la canalización que, tras observar muchas muestras, hemos comprobado que ocurre durante la fase folicular del ciclo ovárico.

Describimos por primera vez tres elementos útiles para determinar con mayor precisión el grado de fertilidad de las muestras que se han dejado secar tapadas con cubreobjetos:

1. La mucolisis, en las muestras bajo cubre se muestra como transparentación o borrado. Cuando la lisis es intensa se observan muchos segmentos transparentes, e incluso zonas. La lisis es lógicamente mayor en las muestras anteriores pero próximas a la ovulación, y se observa mejor moviendo el micro (Fig. 4):

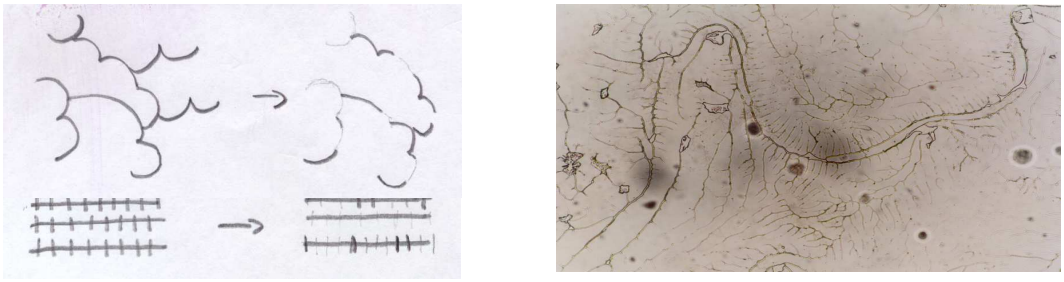


Fig. 4: Izquierda: El dibujo muestra la transparentación o borrado de líneas o espículas, modo en que se observa al microscopio el efecto de la lisis en el moco cervical en las muestras que han secado tapadas con un cubre. Derecha: Foto de la muestra 7-IVAF (día -4): Zona bajo cubre mostrando un grado de canalización V, y transparentación o borrado por efecto de la lisis. 10X.

2. Las maclas de cristales cúbicos, bien conformadas se corresponden siempre con fase folicular tardía. Se pueden observar pequeñas o restos de maclas en fase folicular media o en fase lútea inicial (Fig. 5):

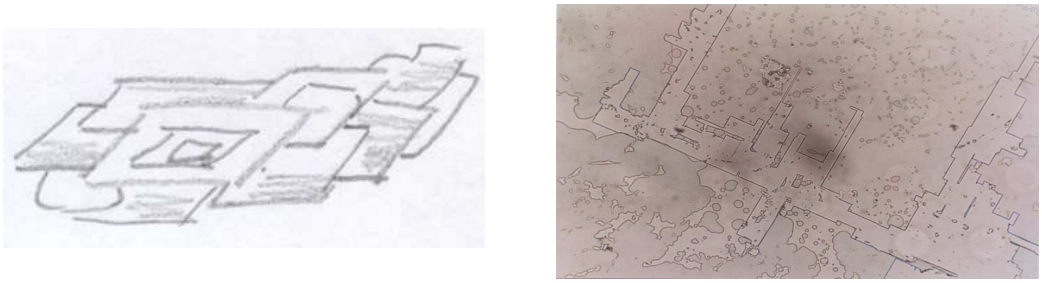


Fig. 5: Izquierda: Dibujo de una macla de cristales cúbicos. Derecha: Foto de la muestra 4-FIV (día -1): Zona bajo cubre mostrando una macla de cristales cúbicos y mucha transparentación por efecto de la lisis. 10X.

3. Ramas, con la forma característica que sólo muestra el moco cervical habitualmente en las muestras que han secado al aire se encuentran excepcionalmente bajo cubre, ayudando a la clasificar la muestra (Fig. 6):



Fig. nº 6: Zona bajo cubre. Colgadas de unos canales vemos ramitas de moco Pt que permanecen como tales sin haber sufrido el proceso de canalización. 5-AC (día 0). 40X.

En el siguiente gráfico vemos que las muestras autoextraídas a las que hemos asignado el grado V, son la mayoría de entre el día –4 y el día +1 del ciclo (Fig. 7):

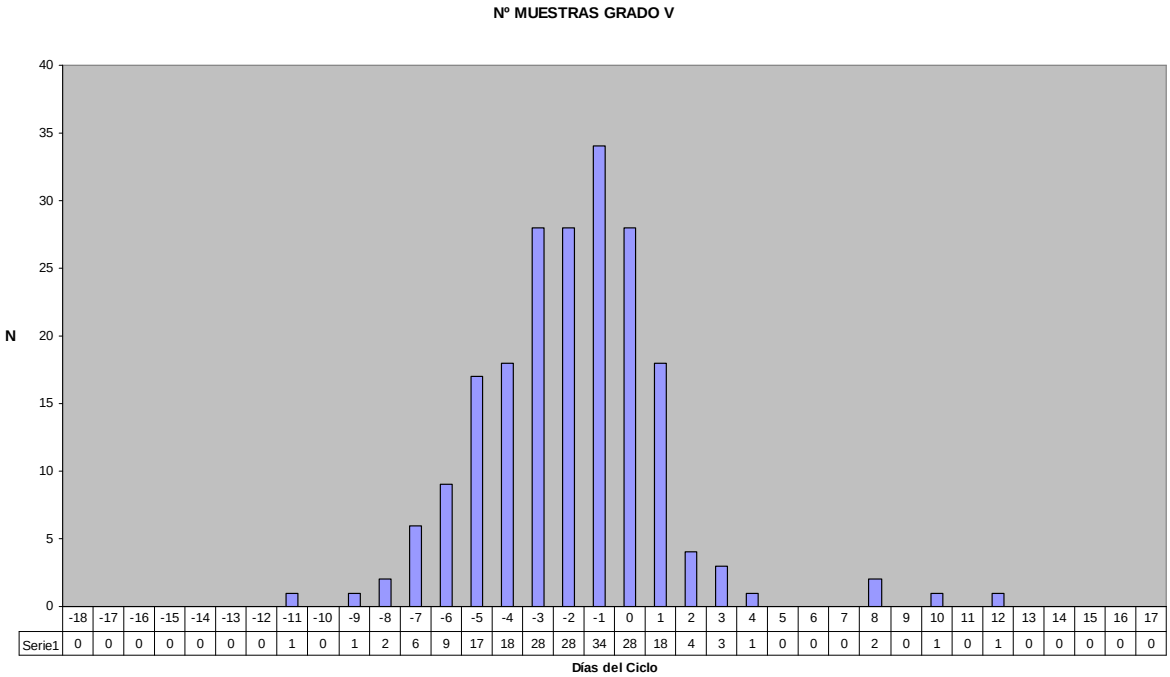


Fig. 7: Resultados del estudio de la canalización en muestras autoextraídas por la paciente en su domicilio

Vemos ahora resultados de muestras extraídas por el ginecólogo, las maclas de cristales cúbicos bien conformadas definen fase folicular tardía y siempre que se observan, aunque sea algún fragmento, estamos muy cerca de la ovulación (Tabla II):

Tabla II

Grados de canalización / fases del ciclo (muestras extraídas por ginecólogo)

FASE	N	I	II	III	IV	V	IV con maclas	V con maclas
F.I.	14	9	2	2	1	0	0	0
F.M.	15	1	0	2	6	2	3	1
F.T.	10	0	0	0	0	0	2	8
L.I.	23	6	0	0	10	0	2	5
L.M.	14	10	1	2	1	0	0	0
L.T.	11	6	2	0	3	0	0	0
TOTAL	87	32	5	6	21	2	7	14

Discusión

Nuestros resultados permiten conocer, por primera vez en muestras autoextraídas por la paciente, las posibilidades del estudio de la cristalización así como del estudio de la canalización. Las muestras autoextraídas por la paciente permiten contar con series de muestras consecutivas del mismo ciclo, y observar mejor la evolución de la canalización o de la cristalización a lo largo del ciclo ovárico.

Como ya ha sido descrito, la extensión según el método “spread it out” de Odeblad es fundamental para observar los distintos tipos de cristalización y realizar el calculo de porcentajes en las muestras extraídas por el ginecólogo (Menárguez, 1998). Aportamos aquí que una buena extensión “spread it out”, así como realizar una extensión lo más fina posible es aún de mayor importancia en las muestras autoextraídas, tanto para poder observar los tipos de cristalización típicos del moco L, y sobre todo de los más finos moco S y moco P (en muestras sin cubrir), como para poder observar la lisis, maclas o ramas y asignar bien el grado de canalización (en muestras bajo cubre). La contaminación por moco gestagénico, típica de las muestras autoextraídas, afecta menos a la observación de los distintos grados de canalización, y por ello el estudio de la canalización es el método de elección para estudiar las muestras autoextraídas, y creemos que es también más rápido y objetivo para el estudio microscópico de las muestras extraídas por el ginecólogo. No obstante recomendamos tener siempre una zona de la muestra tapada con el cubre y otra parte descubierta para poder observar tanto la canalización como la cristalización.

Tanto lo que observamos en las muestras bajo cubre, como lo que observamos en las muestras sin cubrir es un reflejo, un signo, una imagen de las glucoproteínas. La canalización y la cristalización son dos formas de ver la misma cosa. Ello nos lleva a abordar el estudio bioquímico (Medialdea, 2005), para tratar de encontrar diferencias a nivel de proteínas en el moco cervical de las distintas fases del ciclo ovárico y obtener un test, de uso en casa, que pueda detectar cambios bioquímicos que permitan a los matrimonios, en cualquier situación, reconocer su estado de fertilidad o de infertilidad en un día del ciclo y tomar decisiones correctas, tanto cuando pretenden posponer o evitar el embarazo como cuando pretenden lograrlo.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a las mujeres que han obtenido muestras mediante autoextracción, y a los doctores Javier Valero y Miguel Dolz, por su ayuda en la

obtención de las muestras de consulta. Mi más sincero agradecimiento y reconocimiento a los doctores Miguel Tortajada y Francisco Bosch que han hecho posible la realización de este trabajo.

Referencias

Bonilla-Musoles F (1983). Scanner electrón microscopy of the cervical mucus. Exp Obstet Gyn X-4, 151-57.

Capella A and Giacci E (1980). Las investigaciones más recientes sobre la formación de canales del flujo cervical. Comunicación presentada en el Congreso para la Familia de las Américas. Guatemala , pp125-142.

Chretien FC, Cernigón C, David G and Psychoyos A (1973). The ultraestructure of human cervical mucus under scanning electron microscopy. Fertil Steril 24, 746-757.

Davajan V, Nakamura RM and Mishell DR (1971). A Simplified technique for evaluation of the biophysical properties of cervical mucus. Am J Obstet Gynecol 109, 1042-1048.

Elstein M, Mitchel M and Syrett JT (1971). Ultraestructure of cervical mucus. J Obstet Gynaec Brit Comm 78, 180-183.

Faccioli G (1984). Hormone dependence of human cervical mucus and variability of mucus canalization and cristalization during menstrual cycle. Acta Europaea fertilitatis 15, 43-49.

Flynn AM and Bertrand PV (1973). The value of a cervical score in the assessment of ovarian function. J Obstet Gynaec Brit Cwlth 80, 152-159.

Frank-Herrmann P, Freundl G, Gnoth C, Godehart E, Kunert J, Baur S and Sottong U (1997). Natural family planning with and without barrier method use in the fertile phase: efficacy in relation to sexual behaviour: a German prospective long-term study. Adv Contracept 13, 179-189.

Garcea N, Giacci E, Campo S, Messina M, Panetta V and Moneta E (1984). Canalization of human cervical mucus. Obstet Gynecol 64, 164-169.

Hilgers TW and Previl AM. (1979). The ovulation method. Vulvar observation as an index of fertility-infertility. Obstet Gynecol 53, 12-22.

Keseru E (1972). A simple meted for measuring cristallization of the cervical mucus and its application to human sperm migration. Int J Fertil 17, 201-209.

Medialdea C (2001). Métodos Naturales para conocer y para regular la fertilidad. Una revisión. Rev Ginecol Obstet 2, 21-31.

Medialdea C (2005). Parametros biofísicos, bioquímicos y microscópicos para facilitar el conocimiento de la fertilidad. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.

Menárguez M (1998). Caracterización morfológica de diversos tipos de moco cervical humano mediante microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido. Tesis Doctoral, Universidad de La Coruña.

Menárguez M, Pastor LM and Odeblad E (2003). Morphological characterization of different human cervical mucus types using light and scanning electrón microscopy. Hum Reprod 18, 1782-1789.

Odeblad E (1966). Micro-NMR in high permanent magnetic fields. Acta Ostet Gynecol Scand 45, 126-139.

Odeblad E and Menárguez M (1994). Cell and molecular biology of the cervix. In IV Symposium Internacional sobre Regulación Natural de la Fertilidad. Colegio Oficial de Médicos, Barcelona, pp121-129.

Odeblad E (1994a). The discovery of different types of cervical mucus and the Billings Ovulation Method. Bull Nat Fam Plan Counc Vic 21, 1-34.

Odeblad E (1997). Cervical mucus and their functions. J Ir Coll Physicians Surg 26, 27-32.

Roland M (1952). A simple test for the determination of ovulation, estrogen activity and early pregnancy using the cervical mucus secretion. Am J Obstet Gynec 63, 81.

Rydberg E (1948). Observation of the cristallization of the cervical mucus. Acta Obstet Gyn Scan 28, 172-187.

Sánchez-Méndez JI (1997).Aplicaciones de los métodos naturales de regulación de la fertilidad en el diagnóstico y tratamiento de la esterilidad y la infertilidad. Act Obstét Ginecol 9, 237-243.

Temprano H (1990). Estudio de los parámetros biofísicos del moco cervical humano e investigación de la cristalización con microscopia óptica y electrónica. Influencia de los inductores de la ovulación. Tesis Doctoral, Universidad de La Coruña.