

ESTADO DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA SOBRE EL HIDROGEL CERVICAL. POSIBLES APLICACIONES Y LÍNEAS A SEGUIR.

Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF). Valencia, España. E-mail: info@ivaf.org

Resumen

Revisamos de forma esquemática la investigación básica realizada hasta hoy sobre el hidrogel cervical con la idea de que surja por parte de algunos el deseo de investigar en este campo. Con respecto a la secreción endocervical se han descrito y encontrado modos de aplicación a lo que se puede observar a simple vista, asimismo se han hecho diversas investigaciones para conocer lo que permanece más oculto. Se han buscado cambios en los distintos tipos de moco cervical los cuales se producen en distintos momentos del ciclo ovárico, cambios a nivel biofísico, por ejemplo mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o a través del estudio microscópico óptico o electrónico, y cambios a nivel bioquímico, mediante distintas técnicas de electroforesis. Se ha estudiado también su genética. Destacamos el trabajo del Dr. Erik Odeblad quién abrió el camino que han seguido otros investigadores como Temprano, Menárguez o Medialdea entre otros. Planteamos alguna posible vía de investigación y aplicaciones para el futuro.

Introducción

El moco cervical es un hidrogel tridimensional que contiene una fase sólida constituida por macromoléculas, glucoproteínas y proteoglicanos: la mucina insoluble, y una fase líquida que contiene proteínas y otros elementos solubles. El hidrogel cervical se produce en el cuello uterino, concretamente en el endocervix el cual tiene una anatomía complicada con estructuras que simplificando mucho solemos denominar criptas, aunque a veces una cripta se constituye en una unidad secretora de un único tipo de moco cervical pero otras veces en la misma cripta hay distintas unidades secretoras produciéndose distintos tipos de moco cervical¹. Odeblad descubrió la existencia de distintos tipos de moco cervical (1957-1994) que son producidos en distintas áreas del cervix, pero este descubrimiento no ha trascendido lo suficiente y no es aún reconocido por la mayoría de la comunidad científica. Por eso, podemos distinguir entre 1) las investigaciones en moco cervical humano que se han realizado partiendo de la hipótesis de la existencia de un único tipo de moco cervical que aumentaría en cantidad, contenido acuoso y consistencia a mitad del ciclo y 2) las investigaciones que parten de la hipótesis de la existencia de distintos tipos de moco cervical que se producirían en distintas áreas del cervix como respuesta a la distinta estimulación hormonal en los diferentes momentos del ciclo ovárico, estos últimos estudios siguen el camino iniciado por Odeblad con el descubrimiento y caracterización de los distintos tipos y subtipos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y microscopía óptica, y son los trabajos de Temprano (1990,1996),

¹ Odeblad E. Cervical mucus and their functions. J. Irisch Coll Phys Surg 1997, 26: 27-32.

Menárguez (1998, 1992, 1993) y Medialdea (2004) entre otros, de los que hablaremos a continuación con más detalle.

Investigaciones desde la hipótesis de la existencia de un único tipo de moco cervical

Entre las investigaciones, a nivel biofísico, desde la hipótesis de la existencia de un único tipo de moco cervical humano que sin embargo sufre variaciones a lo largo del ciclo ovárico están en primer lugar aquellas basadas en la observación del mismo a simple vista las cuales encontraron diferencias en el aspecto del moco alrededor de la ovulación y han sido aplicadas fundamentalmente en la búsqueda del embarazo.

Así, la observación directa ha sido base de muchos test para predecir la ovulación basados en las variaciones de volumen-cantidad, elasticidad-viscosidad, filancia-transparencia en los distintos momentos del ciclo ovárico. La variación de volumen ha sido base del test de Sims-Hunner. Usala y Schumacher (1983) trabajaron con los cambios de cantidad como indicación de ovulación inminente y Fleetwood et al (1986) puntuaron la cantidad de 0 a 3. La viscosidad-elasticidad se valora fácilmente al recogerlo con ayuda de tubo, capilar o porta, Erbing (1936) trabajó con la filancia, mientras que Elstein (1978a) y Chretien (1987) la medían en cm.

Otros autores trabajaron la observación del moco cervical con ayuda del microscopio óptico, entre ellos Papanicolau (1946) y Rydberg (1948) quienes fueron los primeros en describir la arborización o «cristalización» característica que se puede observar tras dejar secar al aire muestras de moco cervical extendido sobre un portaobjetos y sin cubrir. Roland (1952) utilizó esta observación como test para conseguir la gestación mientras que Zondec y Rozin (1954) establecieron una gradación diagnóstica (de + a +++), más adelante Flynn y Bertrand (1973) la puntúan de 0 a 3.

Algunos autores investigaron con el microscopio óptico la «canalización» del moco cervical. Así, Davajan (1971) dejó secar el moco tapado con un cubreobjetos en una estufa a 37 °C durante 48h y observó este fenómeno, Faccioli (1984) dejó una parte de la muestra tapada con el cubreobjetos y la otra sin cubrir y dejó secar las muestras a temperatura ambiente durante 72h. Garcea (1984) dejó secar las muestras cubiertas con el cubreobjetos en estufa a 50 °C durante 2 horas. Estos autores pudieron observar en la zona de muestra que ha secado tapada bajo el cubreobjetos el fenómeno que denominaron canalización porque en momento periovulatorio se observan canales. Temprano 1990 ofrece una clasificación de la canalización en 10 grados, mientras que Medialdea 2004 simplifica la clasificación dejándola en 5 grados y describe algunos elementos que facilitan la clasificación de las muestras bajo cubre. Medialdea 2008, indica que para el diagnóstico de muestras obtenidas por la paciente mediante autoextracción conviene secar la muestra en estufa con termostato a 37 °C durante 8 horas, lo cual permite ofrecer el diagnóstico a la paciente en el mismo día.

Algunas investigaciones en el campo de la bioquímica que se realizaron desde la hipótesis de un único tipo de moco cervical, nos han ayudado a conocer la composición bioquímica básica del mismo. Así, investigadores como Gibbons et al. (1959 y 1963), o como Elstein, Moghissi y Borth (1973) estudiaron la composición bioquímica mediante varios tipos de electroforesis y aportaron que el componente bioquímico

esencial es una red flexible formada por macromoléculas de glicoproteínas de tipo mucinas. Chretien y Belaisch (1996) lo describieron como una armadura semisólida a base de mucoide, rica en ácido siálico, que constituye una red tridimensional esponjosa y una fase líquida compuesta esencialmente de agua (92-98%).

Rohr et al (1992) afirman que aunque la evaluación del moco cervical es difícil por sus propiedades reológicas, la aplicación de RMN de alta resolución es un método valioso y no destructivo que se puede aplicar a especímenes de pequeño volumen y no necesita ninguna preparación de la muestra. Mientras que Scahrbacher et al (2002) dice también que la espectroscopia de resonancia magnética de protón de alta resolución es un método importante para el análisis cualitativo y cuantitativo del altamente viscoso moco cervical humano, y que más de 23 compuestos podrían ser identificados en el espectro del moco sin necesidad de ningún preparativo químico complicado. Estos autores aconsejan almacenar las muestras liofilizadas reemplazando el H₂O por D₂O en lugar de congelarlas, lo que permitiría cuantificar el contenido de agua y los compuestos de bajo Peso Molecular (PM).

Gipson 2001, realizó una incursión en la biología molecular del cervix, al iniciar el estudio genético. Confirmó que los niveles de RNAm de una mucina formadora de gel, la MUC5B que es expresada por el epitelio cervical, muestra un pico a mitad de ciclo. Detectó la formación de otra mucina formadora de gel, la MUC4 pero no midió sus niveles, ello le llevó a afirmar que había una regulación hormonal de 2 genes de mucina en el endocervix.

Arguëso 2002, usando lectinas identificó en moco cervical humano 2 estructuras de oligosacáridos comunes en las mucinas: Antígeno T y N-acetilactosamina durante la fase proliferativa del ciclo, refirió que los niveles son máximos a mitad del ciclo, ello apoya lo encontrado por Gipson porque la MUC5B contiene Antígeno T y N-acetilactosamina.

Investigaciones desde la hipótesis de la existencia de varios tipos distintos de moco cervical que se producen en distintas áreas del cervix

Odeblad (1966, 1968, 1972, 1994, 1996, 1997), desde la sospecha de la existencia de distintos tipos de moco cervical que se producirían en distintas criptas del cervix, estando unas activas en algunos momentos del ciclo mientras que las otras estarían inactivas seguramente respondiendo a la distinta estimulación hormonal, consiguió obtener e investigar el moco cervical de criptas individuales del endocervix y ha conseguido demostrar mediante diversos estudios biofísicos, fundamentalmente mediante RMN y microscopia óptica, la existencia de varios tipos básicos de moco cervical que ha descrito con mucho detalle, así como de varios subtipos de éstos.

El proceso de la investigación de Odeblad se inició con la sospecha en 1930, a raíz de un estudio de la infección vaginal por micoplasma, de la existencia de al menos dos tipos de criptas en el endocervix que producirían distinto tipo de moco y que estarían las unas activas durante la fase preovulatoria del ciclo ovárico y las otras durante la fase posovulatoria del mismo. Ya en 1968 pudo demostrar mediante RMN la existencia de dos tipos de moco diferentes con distinta viscosidad, moco G (Gestagénico) y moco

E (Estrogénico), y tras un refinamiento de la técnica demostró que el moco E era en realidad una mezcla de dos clases, que llamó L (Loaf) y S (String), más adelante, también con RMN demostró la existencia de diversos subtipos de éstos y en 1991 descubrió el moco tipo P (Peack). Además caracterizó estos 4 tipos y muchos subtipos de los mismos por su aspecto particular una vez cristalizado.

Para poder observar los distintos tipos y subtipos que están presentes en una misma muestra de moco cervical utilizó la técnica de extensión en todas las direcciones que denominó «spread it out», y autores como Temprano (1994), Menárguez (1998) y Medialdea (2004) confirmaron años más tarde como fundamental en sus observaciones de los distintos tipos y subtipos de moco cervical en una misma muestra, estas tres investigadoras han podido observar además todos los tipos y subtipos de cristalización característica descritos por Odeblad confirmando su existencia y correlación con las fases del ciclo, así como les ha resultado de utilidad el diagrama de Odeblad, el cual que sirve para conocer el momento aproximado del ciclo al que pertenece una muestra obtenida en la consulta.



Fig. 1: En la esquina superior derecha de la imagen se puede ver moco P, por debajo del mismo y formando hileras ramificadas vemos moco S, a continuación de mayor tamaño y ocupando la mayor parte de la imagen vemos moco L. De: C. Medialdea. Tesis doctoral.

Temprano investigó algunas diferencias en la cristalización de los distintos tipos de moco cervical con microscopía electrónica de transmisión y además el contenido en algunos iones del moco cervical de distintos momentos del ciclo ovárico. Menárguez investigó la ultraestructura de los distintos tipos de moco cervical descritos por Odeblad, incluido moco cervical obtenido de criptas individuales del cervix, el cual fue obtenido por Odeblad quien se lo hizo llegar para su investigación, describió la ultraestructura mediante microscopía electrónica de barrido (1999 y 2003)

Odeblad (2001) expuso en líneas generales el estado de la investigación básica hasta ese momento. Recordó que el moco cervical es una realidad heterogénea que comprende varios tipos (G, L, S y P) así como subtipos de moco, cada uno con una función fisiológica concreta aún por descubrir, que todos los tipos y subtipos se complementan para realizar el objetivo común. El moco cervical contiene alrededor de un 1% de sales, 1% de proteínas solubles, 1% de glicoproteína rica en carbohidratos que confiere la viscoelasticidad, y 97% de agua. Las glicoproteínas contienen carbohidratos que se disponen formando las distintas redes que constituyen los distintos geles que forman parte de la compleja secreción cervical.

La glicoproteína tridimensional tiene una parte central glicosilada mientras que la parte final es un péptido desnudo. Odeblad explicó que podría ser que en los distintos tipos de moco cervical se trate siempre de la misma glicoproteína donde las diferentes configuraciones darían lugar a distintas redes pero que también podría tratarse de distintas moléculas de mucina que originarían distintas estructuras de red. Expresó que probablemente algunos enlaces son fuerzas de Van der Waals que son muy débiles y muy frecuentes. Expresó que probablemente a mayor concentración habría más enlaces y que por eso el moco luteínico tendría más enlaces que el moco periovulatorio. Recordó que la sialil transferasa, el ácido ascórbico y algunas enzimas aumentan en fase ovulatoria y que hay enzimas bactericidas de fase fértil y enzimas bactericidas de fase infértil. Expresó, para explicar la biología molecular a nivel de una célula secretora, que el corazón proteico se sintetizaría por activación DNA-RNA, después se sintetizarían los azúcares y actuarían los enzimas necesarios para que se unan estos azúcares al corazón proteico hasta componer la glicoproteína, mientras que la transcripción sería estimulada por receptores de hormonas esteroideas.

Medialdea (2004) tratando de confirmar y dar consistencia a la hipótesis de Odeblad de la existencia de distintos tipos de moco cervical, realizó primero un estudio biofísico, microscopia óptica, de 926 muestras de moco cervical procedentes de 118 pacientes, muestras autoextraídas por la paciente en su mayoría, pero también muestras extraídas en la consulta. Consiguió observar todos los tipos de moco descritos por Odeblad así como comprobó, tras el estudio microscópico durante varios años de un elevado número de muestras, que la teoría de Odeblad parecía consistente, ello le llevó a iniciar un estudio de la bioquímica del moco cervical para tratar de encontrar diferencias bioquímicas en el moco cervical de los diferentes momentos del ciclo ovárico.

Medialdea (2004) realiza electroforesis SDS PAGE de moco cervical de diferentes momentos del ciclo ovárico. Incluso moco cervical de una misma paciente obtenido varios días seguidos del mismo ciclo. Evidenció dos glicoproteínas distintas, la que denominó glicoproteína E la cual se evidenció en momentos del ciclo con predominio estrogénico y la que denominó glicoproteína G que se evidenció en momentos del ciclo con predominio gestagénico.

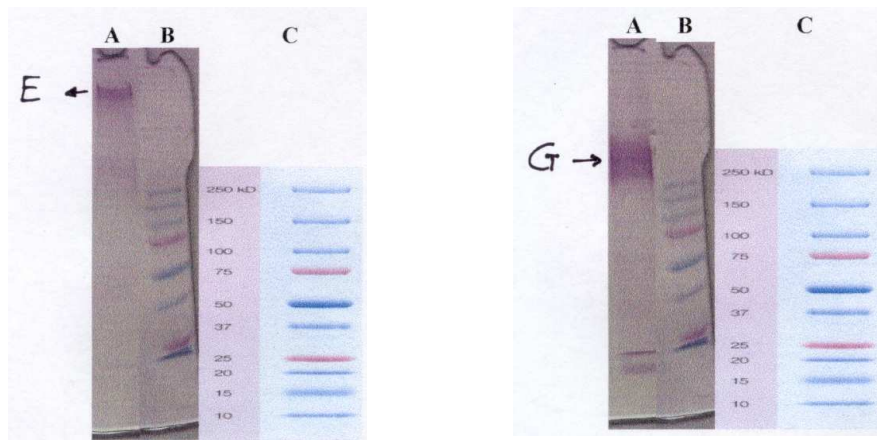


Fig. 3: **Izquierda:** **A:** banda de glucoproteína E evidenciada en color rosa al teñir con reactivo de Schiff tras la electroforesis SDS-PAGE. **B:** patrón de proteínas tras su migración por electroforesis SDS-PAGE. **C:** prospecto del patrón de proteínas preteñido de BIO-RAD mostrando los PM de las proteínas que contiene. **Derecha:** **A:** banda de glucoproteína G evidenciada en color rosa al teñir con reactivo de Schiff tras la electroforesis SDS-PAGE. **B:** patrón de proteínas tras su migración por electroforesis SDS-PAGE. **C:** prospecto del patrón de proteínas preteñido de BIO-RAD mostrando los PM de las proteínas que contiene. De: C. Medialdea. Tesis doctoral.

Encontró también algunas diferencias en la aparición y desaparición de algunas proteínas solubles en el hidrogel cervical de los distintos momentos del ciclo ovárico. Así, la proteína que denominó D, con un PM de alrededor de 15KD se reveló como específica de fase posovulatoria y además las proteínas que denominó A (70KD) B (60KD) y C (50KD) mostraron variaciones típicas en los distintos momentos del ciclo ovárico. Estos hallazgos concuerdan bien con las aportaciones previas de Odeblad, ayudan a sospechar que en el caso de los tipos de moco L, S o P previamente descritos se trataría de una misma glucoproteína (glucoproteína E) que sin embargo variaría su configuración con cierta facilidad, tal vez por variaciones en los carbohidratos y en cualquier caso facilitadas por contener pocos enlaces y débiles, y constituirían las distintas estructuras de red correspondientes a estos tres tipos de moco. Algunas imágenes de cristalización captadas por Medialdea muestran la transformación desde una configuración hasta otra, en concreto moco L transformándose en moco de tipo P subtipo t. Esta investigación parece confirmar también que el moco G se corresponde con una única glucoproteína distinta de la glucoproteína E, la cual no varía su configuración por contener, tal como supuso Odeblad,, más enlaces y más fuertes que el moco de tipo E.



Figura 2: 10X. Sin cubre: Debajo vemos moco L, y arriba vemos moco Pt. Parece que el moco L se transforma en moco Pt. 5-Cl. Día del ciclo aproximado: 0. De: C. Medialdea. Tesis doctoral.

Hallazgos recientes

Se ha encontrado una relación entre el cáncer cervical por Virus del Papiloma Humano (HPV) y el uso de esteroides hormonales por su afectación del moco cervical, ello ha centrado la atención sobre la importante función del moco cervical como barrera de defensa frente a diversas infecciones de transmisión sexual pero también frente a otras infecciones vaginales y su relación por ejemplo con el embarazo pre-término. En esta línea de interés se encuentran algunos trabajos recientes.

Así, Suleyman et al (2007), propone una hipótesis para explicar por qué los anticonceptivos orales (OCs) usados durante mucho tiempo (5 años o más) se asocian con un incremento en el riesgo de padecer cáncer cervical. El moco viscoso, pegajoso que se produce por efecto de los OCs estaría envuelto en la patogénesis de este tipo de cáncer y ello posiblemente porque la arquitectura de este moco modularía y prolongaría el efecto de agentes carcinógenos que llegan a través del coito y que no podrían ser eliminados debido a un patrón mucoso tan viscoso y permanente, ello le lleva a proponer que sea investigado el papel de los cambios fisiológicos del moco cervical a lo largo del ciclo, la regulación hormonal de las mucinas, así como las mucinas individuales y su función. Se sabe que el riesgo de padecer cáncer endometrial y ovárico se reduce con el uso de anticonceptivos mientras que el riesgo de padecer cáncer de mama o cáncer cervical está aumentado en usuarias de COs.

Ming et al (2007), realiza cromatografía líquida de alta resolución para separar factores antimicrobianos que contiene el moco cervical y posteriormente un ensayo de difusión radial para evaluar la actividad antibacteriana de los mismos, los cuales identificó mediante espectrometría de masa. Purificó 2 proteínas antimicrobianas HMG N2 y SLPI. HMG N2 ha demostrado in Vitro una potente actividad frente a Escherichia Coli, Pseudomonas Aeruginosa y Candida Albicans entre otros gérmenes.

Andersch-Björkmans et al (2007), han identificado 194 proteínas en el moco cervical humano, 3 mucinas formadoras de gel (MUC5B, MUC5A, MUC6), y 2 mucinas transmembrana (MUC16 y MUC1). Se han realizado estudios de espectrometría de masa, Northern blot e hibridación in situ. Estos autores sugieren que la O-glicosilación es la mayor alteración que ocurre en el moco ovulatorio pero reconocen que aún no se sabe la relación de esta alteración con las distintas propiedades físico-químicas del moco cervical humano. Se han encontrado muchos enlaces disulfuro y largos dominios de mucina, dominios PTS, ricos en aminoácidos como serina, threonina, prolina y provistos de muchos lugares para enlace con O-carbohidratos. Varias mucinas no han sido completamente secuenciadas.

Samuel K et al (2009), comprueban in Vitro que el moco cervical de mujeres con flora bacteriana normal a nivel vaginal, con dominio de lactobacilo, atrapa el virus HIV probablemente porque el pH ácido mediado por el ácido láctico altera la carga negativa de la superficie del virus limitando muchísimo su difusión.

Becher et al (2009) han estudiado las propiedades inmunológicas del tapón mucoso cervical durante el embarazo, su papel de protección del embrión-feto frente a infecciones externas, así como la presencia en el mismo de marcadores inflamatorios que si son detectados se podrían prevenir algunos casos de embarazo pre-término. Hay que tener en cuenta que este tapón mucoso está constituido por moco gestagénico, tal como ha comprobado Odeblad quien lo denomina moco G+, es decir el mismo que se produce durante cada ciclo ovárico normal si bien con más células de defensa de modo que conociéndolo mejor tendremos mucha información útil para la fase posovulatoria bien establecida de mujeres no embarazadas.

Ulcova-Gallova (2010), revisa muchas de las investigaciones que se han realizado en moco cervical humano para determinar parámetros inmunológicos y bioquímicos del moco cervical humano de momento ovulatorio los cuales son relevantes para la fertilidad, algunos relacionados con los abortos de repetición. Entre ellos: glucosa, fructosa, inmunoglobulinas, C3, hormonas, prostaglandina E2, citocinas Th1 y Th2, anticuerpos anti-espermatozoides.

Discusión

Durante mucho tiempo ha sido escasa la investigación para conocer más a fondo el moco cervical y ello porque las primeras investigaciones fueron motivadas por su interés en el tratamiento de la infertilidad pero durante años se ha perdido este interés por la mayoría de los investigadores debido a que el tratamiento de la misma se ha reducido casi exclusivamente al recurso a la fecundación artificial en la cual se prescinde del moco cervical. En los últimos años sin embargo se ha despertado el interés por conocer más sobre la composición bioquímica del hidrogel cervical y por saber detalles relativos a su síntesis a nivel molecular. Actualmente este interés viene motivado por la necesidad de conocer sus características inmunológicas y bioquímicas, tal vez debido al aumento de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) sobretudo entre los adolescentes y jóvenes, o por evitar abortos de repetición o embarazos pre-término, no sólo pero también, en relación con la eficiencia de las técnicas de fecundación artificial. Sea como fuere estas investigaciones las celebramos todos.

En el tratamiento de la infertilidad, se recurre actualmente casi exclusivamente a las técnicas de fecundación artificial en las cuales se introduce el semen directamente en el útero o se producen in Vitro los embriones para transferirlos a continuación al útero o a las trompas de Falopio, evitándose en cualquier caso la barrera cervical. Pero quienes queremos ayudar a conseguir la concepción fisiológica fruto del acto conyugal nos beneficiaremos también del mejor conocimiento del hidrogel cervical, el cual es de gran importancia para la supervivencia, ascenso, selección, conducción y aproximación de los espermatozoides al ovocito. Por eso, el mejor conocimiento de las glicoproteínas y proteoglicanos, así como de las proteínas solubles que componen el complejo hidrogel cervical permitirá en el futuro curar algunos tipos de infertilidad por factor proteico.

El estudio microscópico sigue teniendo aplicación en la clínica tanto para confirmar, sólo en algunos casos muy concretos, el estado de fertilidad o infertilidad de alguna paciente, así como para la investigación de cambios en el moco cervical tras recibir algún tratamiento clínico para tratar de mejorar sus características. Uno de los motivos que llevan a un matrimonio a necesitar posponer o evitar el embarazo es la salud de la madre, y en muchos casos la enfermedad de la madre o el tratamiento agresivo que requiere la misma es causa de gran alteración del ciclo ovárico y del hidrogel cervical. La consecuencia es que la simple observación del moco cervical por la mujer en su casa o por el especialista en la consulta, incluso ayudado de la microscopía óptica, no siempre es suficiente para poder confirmarle si puede o no quedar embarazada en un momento concreto del ciclo si mantienen relaciones sexuales. Por ello, conocer con precisión algunas proteínas y simplificar el modo de detectarlas serviría para poder contar con un test de uso en casa que detecte la presencia o ausencia de alguna proteína, glicoproteína, o gen determinante para la fertilidad, de modo que, incluso en situaciones muy complicadas, su detección en un día concreto del ciclo permita saber si ese día concreto podría o no ocurrir un embarazo.

Es difícil identificar genes específicos de mucinas porque hay muy pocos anticuerpos lo suficientemente específicos bien caracterizados y porque las mucinas individuales no han sido bien purificadas. Falta mucho en cualquier caso para conocer bien las funciones de cada tipo de moco cervical que estarán seguramente en relación con las glicoproteínas, más en concreto con los carbohidratos que forman parte de las mismas, cuya síntesis es muy complicada precisando un enzima específico para cada paso, ello hace pensar que tendrán funciones muy importantes.

Es curioso que la investigación de Erik Odeblad es seguida por muy pocos, a pesar de ser probablemente quien más ha aportado en este campo. Es muy distinto partir de la hipótesis de un único tipo de moco cervical que partir de la existencia de muchos tipos bien caracterizados. Por algún motivo, Odeblad dejó de publicar en las revistas científicas de mayor difusión hace muchos años y las últimas investigaciones no tienen en cuenta sus aportaciones, sólo en alguno de los artículos es citado en la bibliografía pero siempre se trata de un artículo de los años 60 o 70, no se conoce nada más. Somos privilegiados de contar con estas aportaciones para poder avanzar mejor en esta investigación.

Los artículos más recientes que investigan la composición bioquímica del moco cervical lo hacen con un material muy escaso y siendo las muestras de momentos aislados del ciclo. Creemos que hay que investigar el moco cervical de varios días consecutivos del ciclo porque, de no hacerlo así y si además se investigan muy pocas muestras como se está haciendo, quedan sin detectar algunas variaciones cíclicas en las proteínas y glucoproteínas que si que fueron observadas por Medialdea 2004.

Bibliografía

Becher N, Adans Waldorf K, Hein M, y Ulbjerg. "The cervical mucus plug: structured review of the literature". *Acta Obstet Gynecol* 2009; 88: 502-513.

Davajan V. Nakamura R.M. Mishell D.R. "A simplified technique for evaluation of the biophysical properties of cervical mucus". *Am J Obstet Gynecol* 1971; 109: 1042-1048.

Chretien FC. « Filance et pH du mucus cervical : intérêt et modalités pratiques de leur détermination au cours de l'examen clinique ». *Contracep Fertil Sex* 1987 ; 15: 147.

Chrétien F.C. Belaisch J. « Étude clinique du mucus cervical ovulatoire *Contracep Fertil Sex* 1996 » ; 24: 359- 367.

Elstein M. "Cervical mucus : its physiological role and clinical significance". *Brit Med Bull* 1978 a; 34: 83-88.

Elstein M. Moghissi K. Borth R. "Cervical mucus in human reproduction". Copenhagen: Scriptor, 1973.

Faccioli G. "Hormone dependence of human cervical mucus and variability of mucus canalization and cristalization during menstrual cycle". *Acta Europaea fertilitatis* 1984; 15: 43-49.

Fleetwood L. Landgren BM. Eneroth P. "Quantitation of human cervical mucin during consecutive days and hourly during one day at midcycle". *Gynecol Obstet Invest* 1986; 22: 145-152.

Flynn A.M. Bertrand P.V. "The value of a cervical score in the assessment of ovarian function". *J Obstet Gynaec Brit Cwlth* 1973; 80: 152-159.

Garcea N. Giacci E. Campo S. Messina M. Panetta V. Moneta E. "Canalization of human cervical mucus". *Obstetrics and Gynecology* 1984; 64: 164-169.

Gibbons R.A. Gloor F.A. "The physicochemical properties of two mucoids from bovine cervical mucus". *Biochem J* 1959; 73: 217-225.

Gibbons R.A. Roberts G.P. "Some aspects of the structure of macromolecular constituents of epithelial mucus". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1963; 106: 218-232.

Gipson K. "Mucins of the human endocervix". *Front Biosci* 2001; 1 (6): D 1245-55.

Li Ming, Pan Xiaoling, Li Yan, Wan Lili, Wu Qi, Yu Xiyong, Wan Boyao y Huang Ning. "Purification of antimicrobial factors from human cervical mucus". *Human Reprod* 22 (7): 1810-15.

Menárguez M. "Estudios en moco cervical con microscopía electrónica de barrido". Tesis, Universidad de Murcia, 1998.

Menárguez M. Odeblad E. "Secreción cervical y líneas de investigación". VII Curso de Fisiopatología de la ovulación y Planificación Familiar Natural. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona, 2002.

Menárguez M. Pastor L.A. Odeblad E. "Morphological characterization of different human cervical mucus types using light scanning electron microscopy". *Human Reproduction* 2003; 18: 1782-1789.

Medialdea C. "Estudio de proteínas y glucoproteínas del hidrogel cervical para facilitar el reconocimiento de la fertilidad". Actas del VII Symposium Internacional sobre regulación natural de la fertilidad, Universidad Internacional de catalunya, Barcelona 2004.

Medialdea C. *Parámetros biofísicos, bioquímicos y microscópicos para facilitar el conocimiento de la fertilidad*. Tesis doctoral, Universidad de Valencia 2004.

Medialdea C. "Estudio microscópico del hidrogel cervical para facilitar el conocimiento de la fertilidad". Actas del I Congreso Internacional en reconocimiento de la fertilidad. Managua, 2008.

Odeblad E. Bryhn U. "Proton magnetic resonance of human cervical mucus during menstrual cycle". *Acta radiologica* 1957; 47: 315-20.

Odeblad E. "The physics of the cervical mucus". *Acta Obstet Gyn Scan* 1959a; 38: 44-58.

Odeblad E. "In general discussion to conference of the cervix". *Acta Obstet Gynecol Scand* 1959b; 38 Suppl 1: 126-127.

Odeblad E. "Studies of the molecular structure and function of human cervical mucus". *J Japan Obstet Gynaecol Soc* 1963a; 10: 273.

Odeblad E. "Biophysical techniques of assessing cervical mucus and microstructure of cervical epithelium". In: *Cervical mucus in human reproduction*; World Health Organisation Colloquium. Geneva, 1972.

Odeblad E. "Micro-NMR in high permanent magnetic fields". Acta Obstet Gynecol Scand 1966; 45 Suppl 2: 126-139.

Odeblad E. "The functional structure of human cervical mucus". Acta Obstet Gynec Scand 1968 a; 47: 58-79.

Odeblad E. "An NMR method for determination of ovulation". Acta Obstet Gynec Scand 1968b; 47 Suppl 8.

Odeblad E. "Biophysical techniques of assessing cervical mucus and microstructure of cervical epithelium". In: Cervical mucus in human reproduction; World Health Organisation Colloquium. Geneva, 1972.

Odeblad E. "Physical properties of cervical mucus. In mucus in health and disease". Ad Exp Med Biol 1977; 89. Ed Elstein M & Parke V (217-225).

Odeblad E. "The discovery of different types of cervical mucus and the Billings Ovulation method". Bull NFP Council of Victoria 1994; 21: 5-33.

Odeblad E. "Recent research on cervical mucus". Actas del III Symposium Internacional sobre avances en Regulación Natural de la Fertilidad. Edit Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de Málaga, 1994 (86-91).

Odeblad E. Menarguez M. Slettvoll J. Temprano H. "How to study the cervical secretory system and its role in NFP". Bull Ovul Method Research Ref Centre Austral 1996; 23: 3-20.

Odeblad E. "Cervical mucus and their functions". J Irish Coll Phys Surg 1997; 26: 27-32.

Papanicolau GN. "General survey of vaginal smear and its use in research and diagnosis". Am J Obstet Gynec 1946; 51: 316.

Rohr G. Eggert-Kruse W. Pehlke A. Sahrbacher U. Runnebaum B. Kalbitzer H.R. "Biochemical analysis of cervical mucus by nuclear magnetic resonance spectroscopy". Human Reproduction 1992; 7: 915-917.

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

Rydberg E. "Observation on the cristalization of the cervical mucus". Acta Obstet Gyn Scan 1948; 28: 172-187.

Sahrbacher U. Pehlke-Rimpf A. Rohr G. Eggert-Kruse W. Kalbitzer H.R. "High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of human cervical mucus". J Pharma Biomed Anal 2002; 28: 827-40.

Samuel K. Lai et al. "Human Immunodeficiency Virus Type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal fluid". *Journal Virology* 2008; 83 (21): 11196-11200.

Suleyman G, Cavit K et al. "The underlying cause of cervical cancer in oral contraceptive users may be related to cervical mucus changes". *Med Hypoth* 2007; 69: 550-552.

Temprano H. "Estudio de los parámetros biofísicos del moco cervical humano e investigación de la cristalización con microscopía óptica y electrónica". Influencia de los inductores de la ovulación. Tesis doctoral, Universidad de la Coruña, 1990.

Ulcova-Gallova Z. "Immunological and physicochemical properties of cervical ovulatory mucus". *Journal Reprod Immunol* 2010; 86: 115-121.

Usala SJ, Schumacher GFB. "Volumetric self-sampling of cervicovaginal fluid: a new approach to ovulation timing". *Fertil Steril* 1983; 39: 304.

Ylva Andersch-Björkman, Kristina A, Thomsson, Jessica M. Holmen Larson, Erling Ekerhovd y Gunnar C. Hanson. "Large scale identification of proteins, mucins, and their O-Glycosilation in the endocervical mucus during menstrual cycle". *Mol Cell Proteom* 2007; 6 (4): 708-16.

Zondek B, Rozin S. "Cervical mucus arborization. Its use for the determination of corpus luteum function". *Obstet Gynec* 1954; 3: 463- 470.