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

Mostramos 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, tanto cambios a nivel biofísico mediante resonancia magnética nuclear o a través del estudio microscópico óptico y electrónico, como cambios a nivel bioquímico, mediante distintas técnicas de electroforesis buscando cambios enzimáticos, en las proteínas solubles, en los azúcares o en las glucoproteínas. Se ha hecho alguna incursión en biología molecular. Destacamos el trabajo del Dr. Erik Odeblad quién abrió el camino que han seguido otros investigadores como Temprano, Menárguez o Medialdea, así como la investigación clínica actualmente en marcha por parte del equipo IVAF. 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 proteoglucanos, una mucoproteína 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, 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 cervical[1]. Odeblad descubrió la existencia de distintos tipos de moco cervical 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 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 (1957-1994) con el descubrimiento y caracterización de distintos tipos y subtipos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y microscopia óptica, y son los trabajos de Temprano (1990,1996), Menárguez (1998, 1992, 1993) y Medialdea (2004) de los que hablaremos a continuación con más detalle.

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

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 están aquellas basadas en la observación del mismo a simple vista que encontraron diferencias en el aspecto del moco alrededor de la ovulación y que fueron 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. 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 finamente extendido 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.

Otros autores investigaron la canalización del moco cervical. Así, Davajan (1971) dejó secar el moco tapado con un cubreobjetos en una estufa a 37 ºC durante 48h, 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 ºC durante 2 horas. Estos autores pudieron observar en la zona de muestra que ha secado tapada bajo el cubreobjetos un nuevo fenómeno que denominaron canalización porque en momento periovulatorio se observan canales.

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 básica del moco cervical. 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%).

Se ha intentado identificar los azúcares de la glicoproteína con lecitinas pero por haber muchos azúcares y muchos isómeros no se ha sacado nada en claro. 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 según estos autores permite cuantificar el contenido de agua y los compuestos de bajo PM.

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) consiguió obtener e investigar el moco cervical de criptas individuales del endocervix y ha conseguido demostrar mediante diversos estudios biofísicos, fundamentalmente mediante Resonancia Magnética RMN y microscopia óptica, la existencia de varios tipos básicos de moco cervical (G, L, S y P) así como de varios subtipos de éstos.

El proceso de la investigación de Odeblad se inició con la sospecha en 1930 de la existencia de al menos dos tipos de criptas en el endocervix que producirían distinto tipo de moco y que estarían activas en distintos momentos del ciclo ovárico, ya en 1968 pudo demostrar mediante RMN la existencia de dos tipos de moco diferentes con distinta viscosidad, moco G y moco E, y tras un refinamiento de la técnica demostró que el moco E era en realidad una mezcla de dos clases, que llamó L y S, más adelante, también con RMN demostró la existencia de diversos subtipos y en 1991 descubrió el moco tipo P. Además caracterizó todos estos tipos y muchos subtipos por su aspecto particular una vez cristalizado.

Para poder observar los distintos tipos y subtipos utilizó la técnica de extensión en todas las direcciones (Spread it out) que 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, las tres investigadoras han podido observar además todos los tipos y subtipos de cristalización característica descritos por Odeblad así como les ha resultado de utilidad su diagrama de porcentajes para conocer el momento aproximado del ciclo al que pertenece cada 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 (1990) ofreció una clasificación de la canalización en 10 grados y siguiendo la hipótesis de Odeblad investigó algunas diferencias en la cristalización de distintos tipos de moco cervical con microscopia electrónica de transmisión y 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 mediante microscopia electrónica de barrido (1999 y 2003)

Odeblad (2001) expuso en líneas generales el estado de la cuestión cara a futuras investigaciones. 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, que se complementan para realizar un 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 glucosilada 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 tranferasa, el ácido ascórbico y algunos enzimas aumentan en fase ovulatoria y que hay enzimas bactericidas de fase fértil y enzimas bactericidas de fase infértil. Expresó que el corazón proteico se sintetizaría por activación DNA-RNA, después se sintetizarían los azúcares y los enzimas necesarios para que se unan estos azúcares al corazón proteico para componer la glicoproteína mientras que la transcripción sería estimulada por receptores de hormonas esteroideas.

Medialdea (2004) realizó un estudio biofísico mediante microscopia óptica de 926 muestras de 118 pacientes, muestras autoextraídas por la paciente y muestras extraídas en la consulta. Partiendo de la clasificación morfológica de Temprano consiguió simplificarla y ofreció una clasificación de la canalización en sólo 5 grados al tiempo que mostró algunos elementos que cuando son observados facilitan y optimizan la clasificación de las muestras contribuyendo a conseguir un diagnóstico de fertilidad más preciso. Esta clasificación en 5 grados junto con la observación de dichos elementos permite clasificar las muestras autoextraídas por la paciente siempre que se consiga una extensión de la muestra sobre el porta muy fina mediante la técnica spread it out antes de cubrir con el cubreobjetos. Medialdea (2008) aportó que para el diagnóstico de muestras obtenidas por la paciente mediante autoextracción conviene secar la muestra en estufa con termostato a 37 ºC durante 8 horas, lo cual permite ofrecer el diagnóstico a la paciente en el mismo día.

Medialdea (2004) ofrece también un estudio bioquímico del hidrogel cervical con electroforesis SDS PAGE mediante el cual logró detectar la presencia de dos glucoproteínas distintas, la que denominó glucoproteína E la cual se evidenció en momentos del ciclo con predominio estrogénico y la que denominó glucoproteína G que se evidenció en momentos del ciclo con predominio gestagénico.

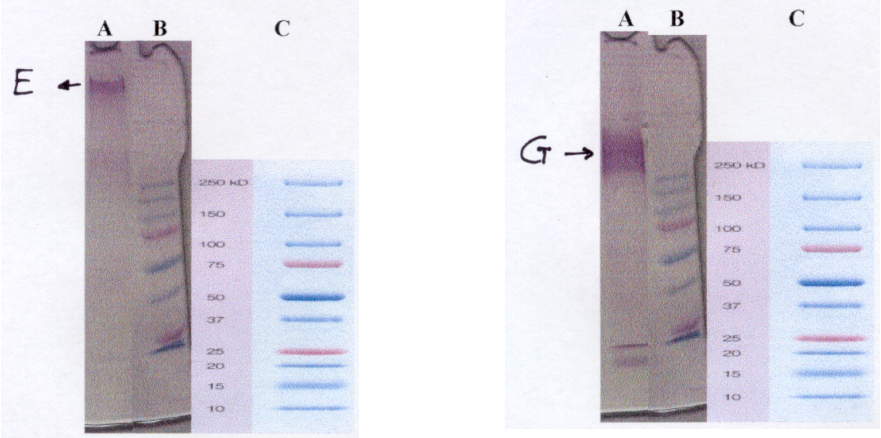

Fig. 3: Izquierda: A: banda de glucoproteína E evidenciada en color rosa al teñir con reactivo de Schiff tras la electroforesis SDS-PAGE. **B:** patrón de proteínas tras su migración por electroforesis SDS-PAGE. **C:** prospecto del patrón de proteínas preteñido de BIO-RAD mostrando los PM de las proteínas 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 los distintos momentos del ciclo ovárico a nivel de las proteínas solubles que forman parte del hidrogel cervical. Así, la proteína D se reveló como específica de fase posovulatoria y la presencia de otras proteínas que denominó A, B y C mostraron variaciones típicas en los distintos momentos del ciclo ovárico. Estos hallazgos ayudan a pensar que en el caso de los tipos de moco L, S o P descritos previamente por Odeblad se trataría de una misma glucoproteína (glucoproteína E) que sin embargo variaría su configuración con cierta facilidad por contener pocos enlaces y débiles y constituiría las distintas estructuras de red correspondientes a estos tres tipos. Algunas imágenes de cristalización captaron la transformación desde una configuración hasta otra, en concreto moco L transformándose en moco de tipo P. Esta investigación parece confirmar que el moco G se corresponde con una única glucoproteína que 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-CI. Día del ciclo aproximado: 0. De: C. Medialdea. Tesis doctoral.

Conclusión

En la actualidad, la mayoría de la comunidad científica no está interesada en ir más allá en la investigación del hidrogel cervical porque en el tratamiento de la infertilidad se recurre casi exclusivamente a la IA o FIV de modo que se prescinde absolutamente de la función del moco cervical en la fertilidad. Pero quienes queremos respetar la concepción natural y consideramos que en las personas no debe desvincularse del acto conyugal queremos seguir investigando y que otros investiguen porque en la medida en que se vayan llenando lagunas de conocimiento podremos ayudar mejor tanto en el tratamiento de la infertilidad como en la evitación del embarazo por causas justas en situaciones muy complejas. El hidrogel cervical es de gran importancia para la supervivencia, ascenso, selección, conducción y aproximación de los espermatozoides al ovocito dentro del tracto genital femenino tras la realización del acto sexual conyugal y por lo tanto para la concepción natural. Así, una de las futuras aplicaciones del mejor conocimiento de las gluproteínas y proteoglucanos, así como de las proteínas solubles que componen el complejo hidrogel cervical sería poder curar algún tipo de infertilidad debida al factor proteico. Con vistas a ello, necesitamos que se avance en la investigación básica del hidrogel cervical, que sean identificadas con precisión para conocer su exacta composición, las distintas glucoproteínas y proteínas cuya presencia se ha evidenciado con variaciones características.

El estudio microscopio sigue teniendo aplicación en la clínica tanto para confirmar, sólo en algunos casos muy concretos, el estado de fertilidad o infertilidad a alguna paciente así como para la investigación de cambios en el moco cervical de la paciente tras recibir algún tratamiento que se aplique para tratar de mejorar las características del hidrogel cervical. En este sentido, en Agrupación Clínica de Valencia estamos aplicando un tratamiento local a nivel vaginal con estriol a algunas pacientes con características concretas, con el propósito de poder verificar alguna mejora en la calidad del moco cervical que responde al estímulo de los estrógenos. Además de las anotaciones del moco cervical por parte de la paciente en el gráfico sintotérmico antes, durante y después del tratamiento, estamos realizando un estudio microscópico del moco cervical del periodo de posible fertilidad de la paciente antes del tratamiento, durante el mismo y también después del mismo, y esperamos poder aportar resultados en futuras reuniones científicas.

Por otra parte, 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 ayudado de la microscopia 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, hay que seguir trabajando en el estudio bioquímico, simplificando el tratamiento de la muestra, o en el estudio genético del hidrogel cervical para poder contar, tal vez en el futuro, con un test de uso en casa que detecte la presencia o ausencia de alguna proteína, glucoproteína, o gen que sea determinante para la fertilidad, de modo que, incluso en situaciones muy complicadas, su detección permita saber si ese día concreto podría o no ocurrir un embarazo.

Bibliografía

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 léxamen 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. Glober 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.

Menárguez M. estudios en moco cervical con microscopía electrónica de barrido. Tesis, Univ. 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 electrón 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 Ginaecol 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 differents types of cervical mucus and the Billings Ovulation method. Bull NFP Cuncil 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.

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

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

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