

INVESTIGACIÓN EN BIOFÍSICA, BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL HIDROGEL CERVICAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO. UNA INVESTIGACIÓN DENTRO DEL «ÁREA DEL RECONOCIMIENTO DE LA FERTILIDAD» (ARF).

Concepción Medialdea Fernández.

Resumen

Se refiere la investigación en parámetros biofísicos, bioquímicos y microscópicos para facilitar el conocimiento de la fertilidad humana que inició el IVAF con Medialdea 2005¹ así como sus antecedentes y aspectos pendientes de ulterior investigación. Se reseñan de modo muy sintético aspectos de la investigación de diversos autores sobre el hidrogel cervical entre 2005 y 2010 ya referidos por la autora en el II Congreso Internacional en Reconocimiento de la Fertilidad (II CIRF)² y que ahora completa mostrando la ruta de la investigación en bioquímica y biología molecular del hidrogel cervical hasta 2012 y los principales objetivos que la guían. Se indica por donde podrían ir futuras investigaciones en este campo, lugar donde el IVAF tiene previsto reabrir la investigación en los próximos meses. Se apuntan las claves de una investigación científica desde el *área del reconocimiento de la fertilidad*.

Palabras clave: glucoproteínas del endocervix; proteínas del hidrogel cervical humano; caracterización de mucinas; área del reconocimiento de la fertilidad, métodos de reconocimiento de la fertilidad.

Introducción

Comencé mi formación universitaria en la universidad de Valencia con la licenciatura en farmacia y a continuación la especialización en análisis clínicos. Trabajé unos años como farmacéutica adjunta y analista pero circunstancias personales me llevaron a buscar una nueva especialización en ginecología. Entre los años 1995 y 2005 estuve en el departamento de ginecología de la universidad de Valencia buscando esta especialización. Realicé un master en reproducción humana, después los cursos de doctorado en ginecología, obtuve la suficiencia investigadora en ginecología y a continuación inicié y concluí mi tesis doctoral en un programa de doctorado de ginecología la cual leí en la facultad de medicina de la universidad de Valencia en 2005.

Dejé de trabajar en farmacia y análisis clínicos cuando mi segundo hijo tenía 8 meses porque era un niño que necesitaba mucha atención, tanto de día como de noche, y llegó un momento en que me resultaba agotador compaginar la vida familiar y profesional, ambas con un horario demasiado extenso.

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

2 Los CIRF son los Congresos Internacionales en Reconocimiento de la Fertilidad que han sido impulsados por CIFER e IVAF junto con instituciones del país de celebración. El primer CIRF se celebró en Managua (Nicaragua) junto con la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Trópico Seco en octubre de 2008. El II CIRF tuvo lugar en Monterrey en noviembre de 2010 y el III CIRF se celebra en la Universidad de Piura, sede Lima en Noviembre de 2012. Vid: www.reconocimientodelafertilidad.com.

Concepción Medialdea Fernández. Concepción Medialdea es doctora en ginecología por la Universidad de Valencia. Responsable de investigación del Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares y del comité científico del III Congreso Internacional en Reconocimiento de la Fertilidad. [cursos@ivaf.org]

Un par de años después de la llegada de nuestra cuarta hija tuvimos que posponer el embarazo por motivo de enfermedad y constatamos que los que hoy denominamos «métodos de reconocimiento de la fertilidad» los cuales entonces nos enseñaron bajo la denominación de «métodos naturales» se enseñaban de forma muy precaria por personas sin titulación universitaria como «para salir del paso». Era «eso o nada». Esta constatación supuso un giro en mi vida. Empecé a estudiar, a especializarme en reconocimiento de la fertilidad. No existía dicha especialidad así que busqué la especialización en la facultad de medicina del modo que he descrito al inicio de esta introducción y también mediante la asistencia a congresos de esta temática y la lectura de la literatura científica de referencia.

Me encontré con Erik Odeblad primero a través de sus publicaciones en la literatura científica, más adelante le conocí personalmente, por entonces ya habíamos fundado el IVAF, en los symposium internacionales que se realizaron en España por aquellos años y desde entonces mantuve una correspondencia epistolar durante varios años. Mi investigación, que es también la investigación del IVAF, en biofísica y bioquímica del hidrogel cervical, se inició queriendo continuar de algún modo desde los hallazgos que había realizado el investigador, ginecólogo y físico sueco doctor Odeblad. En mi búsqueda bibliográfica encontré también la tesis doctoral de Helvia Temprano, a quien conocí personalmente en La Coruña cuando asistí a un curso de especialización, e intenté que ella dirigiera mi tesis doctoral continuando desde su clasificación de la canalización, pero en aquel momento no le interesaba continuar con el estudio de la canalización y no aceptó.

Conseguí por fin que me la dirigiera Miguel Tortajada, catedrático de ginecología de la Universidad de Valencia que hoy ya no está entre nosotros. No le interesaba el asunto y sólo aceptó después de comprobar que yo me esforzaba horrores y que no cejaría en el intento. No fue fácil ni conseguir quien me quisiera dirigir, ni el lugar donde investigar, ni el dinero, ni nada de nada porque no había por entonces ninguna línea de investigación abierta sobre el hidrogel cervical en la Universidad de Valencia ni nadie estaba interesado en facilitar, con los resultados de una investigación, el reconocimiento de la fertilidad en la consulta o en casa pues tampoco existía formalmente esta especialidad clínica. Todos los esfuerzos y dineros, o casi todos, en el área de la fertilidad humana, estaban focalizados entonces en la contracepción o en las técnicas de reproducción asistida ¿a quien le podía interesar llenar lagunas de conocimiento en biofísica o bioquímica del hidrogel cervical? A mi me interesaba horrores y me puse a ello con la ayuda de Dios.

Esta ponencia pretende reseñar el estado de la investigación básica en hidrogel cervical al momento de realizar mi tesis doctoral como miembro del IVAF, así como los aportes de la misma detallando aspectos de nuestra investigación de interés para ulterior investigación. Ofreceremos algunas pinceladas del estado de la cuestión en bioquímica y biología molecular del hidrogel cervical hasta hoy. Queremos avivar el estado de la cuestión para procurar que personas jóvenes decidan investigar en esta área apasionante y necesaria y por ello referiremos por donde, a nuestro entender, debería discurrir la investigación básica en hidrogel cervical en el futuro. En IVAF vamos a retomar nuestra línea de investigación en «parámetros biofísicos, bioquímicos y microscópicos» en los próximos meses, si Dios quiere, estamos ya pidiendo ayudas económicas para poder hacerlo. Invitamos desde aquí a las personas interesadas en investigar en esta temática a contactar con nosotros para, en equipo, poder poner las bases que faciliten un trabajo multidisciplinar desde distintas instituciones que pueda dar mejores frutos y servir mejor a todos.

Antecedentes de nuestra investigación

1) En biofísica (estudio microscópico) del hidrogel cervical:

En años previos a la tesis doctoral de Medialdea (2005) se había descrito, mediante microscopia electrónica aplicada al moco cervical humano 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 cervical de tipo membranoso en fase posmenstrual y con amplios espacios que dejan pasar los espermatozoides durante la ovulación (Faccioli, 1984). Y mediante microscopia óptica en moco cervical extendido y secado al aire se había descrito el fenómeno de la cristalización formando ramas, arborización o «ferning», y su observación se había usado en varios test para medir la actividad estrogénica (Rydberg, 1948; Roland, 1952 o Keseru, 1972). Estos autores habían detectado diferencias observables con ayuda del microscopio óptico entre el moco cervical periovulatorio y el moco cervical de la fase posovulatoria que fueron utilizadas en varios test clínicos para uso en el tratamiento de la infertilidad por aquellos años.

Erik Odeblad (1966, 1994a, 1997) primero con ayuda de la resonancia magnética nuclear y de la microscopia óptica sobre moco cervical extendido mediante su técnica spread it out encontró primero cuatro tipos distintos de secreciones: moco G (Gestagenic), L (Loaf), S (String), y P (Peack) y después varios subtipos de cada uno de estos 4 tipos. Y contribuyó al diagnóstico clínico del moco cervical extraído del canal endocervical, extendido y dejado secar, mediante su diagrama de porcentajes. Así, el *estudio de los distintos tipos de cristalización* y el cálculo de los porcentajes de los mismos 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). El estudio de la cristalización y el cálculo del grado de porcentajes ha sido ya suficientemente utilizado y probado en clínica y no necesita de ulterior investigación.

Por otra parte, cuando el moco cervical, una vez extendido sobre el portaobjetos, se cubre en su totalidad o una parte del mismo con un cubreobjetos y se deja secar, podemos observar un fenómeno distinto de la cristalización, nos referimos al que se conoce como *fenómeno de la canalización* del moco cervical humano. Creo que no es una buena denominación, aunque en algunas de las muestras se observen canales y por ello me referiré a ello simplemente como estudio y clasificación de las muestras que han secado bajo cubreobjetos. Algunos autores han 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). Temprano (1990) propuso una clasificación morfológica de la canalización en diez grados.

2) En bioquímica del hidrogel cervical:

Antes de 2005 se había realizado electroforesis de moco cervical humano, muy abundantemente en los años 1955-75, se buscaban principalmente las inmunoglobulinas y su relación con la infertilidad. Se observaron las proteínas solubles de la fase acuosa así como una mucoproteína (MP) insoluble (Spencer et al., 1957; Moghissi et al., 1960; Schumacher et al., 1965; Elstein and Polard, 1968; Moghissi, 1972; Zaneveld et al., 1975). Años más tarde se aplicó electroforesis SDS-PAGE, y se observó que la proporción de proteínas con respecto a MP es mínima antes de la ovulación y aumenta de prisa después de la misma, así el nivel de MP es máximo antes de la ovulación y la proporción de agua baja mucho después de la misma (Roelof et al., 1980; Van Kooij et al., 1983; Morales et al., 1993). Hirano et al., 1999, identifican un componente capaz de blindar inmunoglobulinas.

Detalle nuestras aportaciones de 2005 y de cómo continuarlas

1) En biofísica (microscopía óptica) del hidrogel cervical:

Medialdea (2005) propusimos una clasificación simplificada en 5 grados para clasificar como 1) *con potencial fertilidad* o 2) *sin potencial fértil* las muestras de hidrogel cervical bajo cubreobjetos y demostramos su utilidad para conocer el estado de fertilidad o infertilidad de una muestra de moco cervical humano en la consulta de reconocimiento de la fertilidad, útil tanto si la muestra ha sido extraída por el ginecólogo como si ha sido autoextraída por la propia paciente entrenada previamente en el procedimiento de obtención, de extensión y de tapado de parte de la muestra. Medialdea describió por primera vez tres elementos como claves para afinar en el diagnóstico del estado de fertilidad de las muestras tapadas con un cubreobjetos, y para diagnosticar la cercanía de la ovulación.

En IVAF dejamos de asistir a los symposiums internacionales de esta temática celebrados en España desde 2003 por disentir en puntos que consideramos fundamentales³ y en consecuencia la clasificación de muestras tapadas con un cubreobjetos para conocer su grado de fertilidad no es conocida ni ha sido difundida en ese circuito. Si que fue presentado en el I CIRF (2008). Voy a explicar a continuación detalles del estudio de las muestras tapadas con cubreobjetos porque creemos que debe ser probado para ayudar en la atención clínica de algunos casos en los cuales es más dificultoso definir el estado de fertilidad por el motivo que fuere o bien por motivo investigación con vistas a un posterior tratamiento clínico.

Detalle de nuestra clasificación de muestras tapadas con cubreobjetos (Figuras 1 y 2)

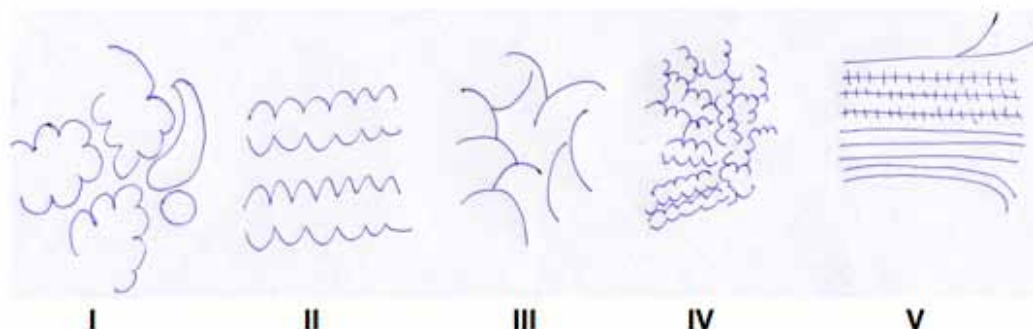


Fig. 1: Dibujo de nuestra clasificación en cinco grados. I: Cuarteado con formas redondas o en nube; II: Las nubes se estiran y alinean; III: Compactación grande; IV: Compactación pequeña; V: Canales con o sin espículas.

³ El motivo está explicado en: Concepción Medialdea y José Pérez Adán. "El «área del reconocimiento de la fertilidad y los «métodos de reconocimiento de la fertilidad». Concepto y terminología. Actas del I Symposium Internacional en Reconocimiento de la Fertilidad, Managua 2008. En Actas, Congresos Internacionales en Reconocimiento de la Fertilidad, nº1..

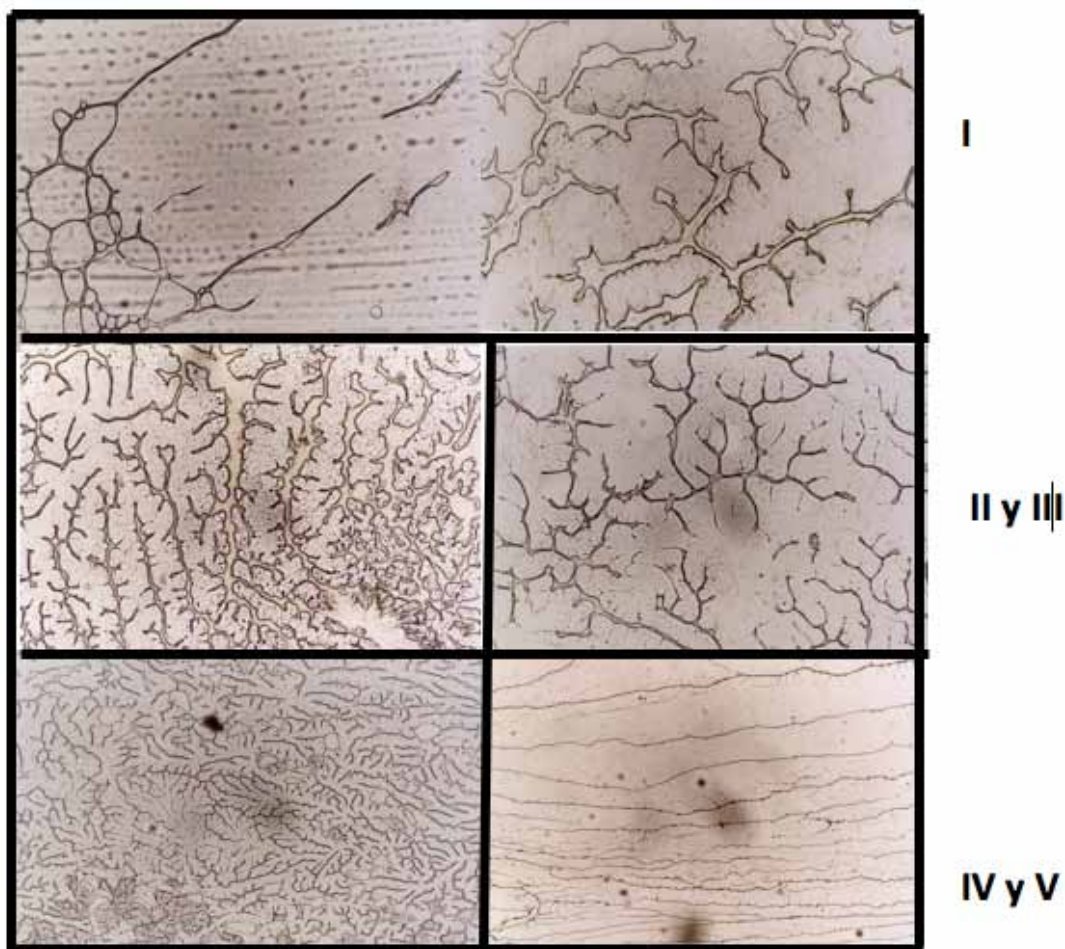


Fig. 2: Fotografías mostrando nuestra clasificación en 5 grados: Arriba: Grado I; En el centro: Grado II (izda..) y Grado III (drcha.), Debajo: Grado IV (izda.) y Grado V (drcha.).

Hemos descrito tres elementos adicionales que se mostraron, durante nuestra investigación, como elementos clave para afinar en el diagnóstico del estado de fertilidad de las muestras tapadas con un cubreobjetos, y para diagnosticar la cercanía de la ovulación:

1. **Mucolisis**, en las muestras bajo cubre se muestra como transparentación o borrado. Cuando la ovulación está muy cerca la lisis es intensa, se observan muchos segmentos transparentes, e incluso zonas de transparentación. Ello se observa mejor moviendo el «micro» (Fig. 3):

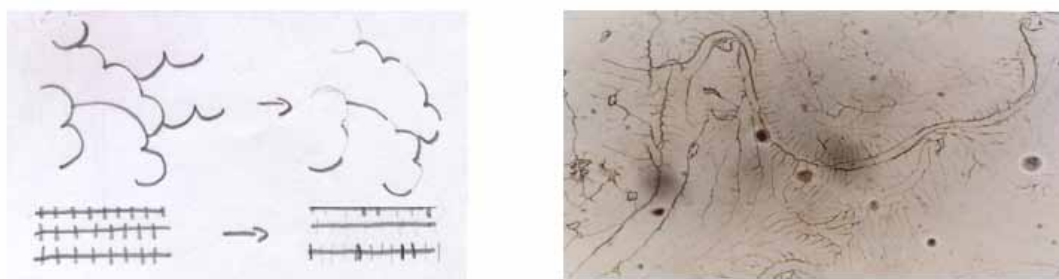


Fig. 3: Izquierda: El dibujo muestra la transparentación o borrado de líneas o espículas, modo en que se observa al microscopio el efecto de la lisis en el moco cervical en las muestras que han secado tapadas con un cubre. Derecha: Foto de la muestra 7-IVAF (día -4): Zona bajo cubre mostrando un grado de canalización V en algunas zonas y transparentación o borrado por efecto de la lisis y con ello la proximidad de la ovulación. 10X.

2. Maclas de cristales cúbicos, bien conformadas se corresponden siempre con fase folicular tardía⁴. Se pueden observar pequeñas o restos de maclas en fase folicular media o en fase lútea inicial. En muestras autoextráidas la observación de sólo algún fragmento de cristal cúbico se debe interpretar como signo de ovulación muy cercana (Fig. 4):

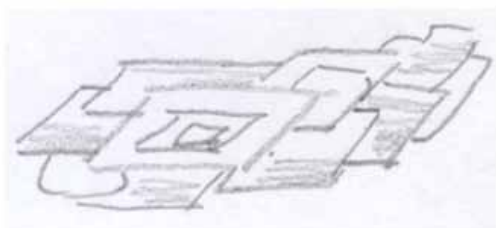


Fig. 4: Izquierda: Dibujo de una macla de cristales cúbicos. Derecha: Foto de la muestra 4-FIV (día -1): Zona bajo cubre mostrando una macla de cristales cúbicos y mucha transparentación por efecto de la lisis y con ello inminencia de la ovulación. 10X.

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, su estructura residual, ayudando a la clasificar la muestra (Fig. 6):



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

Los grados 1 y 2 de nuestra clasificación en 5 grados indican ausencia de fertilidad. El grado 3 por sí solo también se interpreta como momento no fértil pero la presencia de lisis, maclas, o ramas de moco típico de momento fértil constituyen un diagnóstico de posible fertilidad.

El estudio microscópico de la muestra tapada con cubreobjetos se realiza del modo siguiente (Fig. 6):

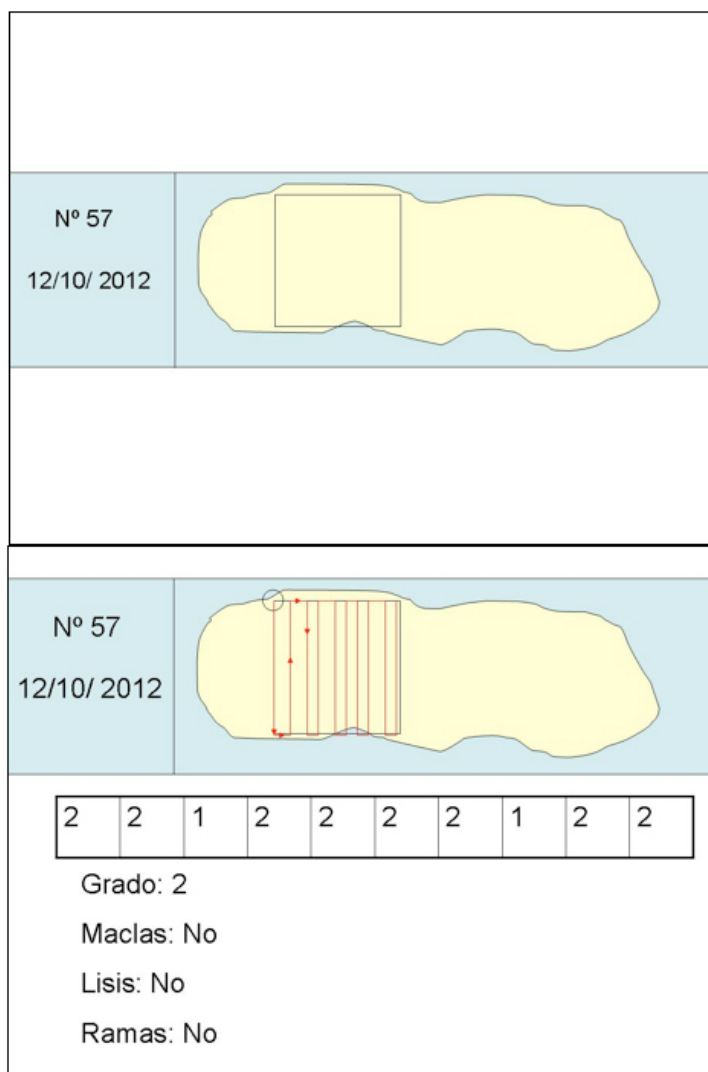


Figura 6: Arriba: la muestra se extiende sobre el portaobjetos muy finamente estirándola en todas las direcciones y se coloca un cubreobjetos sobre una parte de la misma el cual se presiona suavemente con la yema del dedo índice para quede bien fijado; Debajo: Una vez seca la muestra, se coloca el visor del microscopio en la esquina superior izquierda y se va desplazando primero hacia abajo hasta el borde inferior, después hacia la derecha un corto espacio y de nuevo hacia arriba hasta el borde superior. Se realizan 10 recorridos completos. Al final de cada uno de los 10 recorridos se asigna el grado más frecuentemente observado durante el mismo y se anota en la cuadrícula. En las muestras autoextraídas se obtiene el grado más alto asignado en los 10 recorridos. En las muestras extraídas en la consulta se obtiene el grado más frecuentemente asignado en los 10 recorridos.

Durante la investigación de mi tesis doctoral estudié muchas muestras de moco cervical con el microscopio óptico, algunas obtenidas en la consulta de ginecología y otras autoextraídas por la paciente entrenada, pero había muchas más obtenidas mediante autoextracción. Las muestras de autoextracción si bien se han obtenido del canal endocervical sin embargo siempre tienen algo de contaminación de moco gestagénico de la portio y en la parte de la muestra dejada secar al aire, el moco gestagénico de más no permite observar los tipos de moco más fino por lo que el estudio de los distintos tipos de cristalización y el cálculo de los porcentajes de los distintos tipos que aportó Odeblad no es posible con buenos resultados. Sin embargo, nuestra clasificación en 5 grados de la parte de la muestra tapada con un

cubreobjetos nos permitió una clasificación adecuada de todas las muestras autoextraídas que resultó de mucha utilidad en nuestra investigación. El hecho de que, una vez colocado el cubreobjetos sobre una parte de la muestra, siempre aplicábamos presión con la yema del dedo para conseguir una mejor fijación del mismo es seguramente uno de los motivos, porque queda una muestra muy aplastada y por lo tanto muy fina. Cuando se requiere el diagnóstico de fertilidad en el mismo día de recepción de la muestra hay que proceder a dejarla secar en una estufa con termostato a 37° C. durante 8 horas antes de proceder al estudio microscópico de la parte tapada con el cubreobjetos.

Para nuestra investigación, fue suficiente con llegar hasta aquí en el estudio microscópico, pero creemos que el estudio de las muestras bajo cubreobjetos debería ser continuado. Lo que se observa, con microscopio óptico, en la parte de la muestra dejada secar sin cubrir y lo que se observa en la parte que ha secado tapada con un cubreobjetos es la misma cosa. Es decir que estamos observando otro ángulo o apariencia de los mismos distintos tipos de moco cervical y aún no sabemos con que apariencia concreta se muestra cada uno de los tipos después de secar aplastado y tapado con un vidrio fino. Tal vez se puedan reconocer los distintos tipos que se observan bajo cubre y realizar también un cálculo de porcentajes consiguiendo un resultado más preciso. En muestras autoextraídas es la única posibilidad de análisis y la autoextracción es de interés en lugares en los que no hay una consulta de ginecología para extraer la muestra pero si que se cuenta con un buen microscopio óptico. También porque si la muestra se consigue en casa mediante autoextracción es más fácil obtener muestras de varios días seguidos para ulterior investigación o para seguimiento clínico por ejemplo para estudio de fertilidad. Pero las muestras autoextraídas no se pueden clasificar microscópicamente secadas al aire, pero si que es posible hacerlo si han secado tapadas con cubreobjetos.

Creo que para avanzar bien en el estudio de las muestras que han secado bajo cubreobjetos tenemos que hablar quienes hemos investigado en este campo y unificar criterios.

2) En bioquímica (electroforesis SDS-PAGE de proteínas y glucoproteínas) del hidrogel cervical

Medialdea (2005) realizamos electroforesis SDS-PAGE de proteínas y de glucoproteínas, con muestras extraídas por el ginecólogo y con muestras autoextraídas por la paciente, con el propósito de contribuir a la caracterización bioquímica de los distintos tipos de moco cervical que ya habían sido descritos por Odeblad con su investigación pero sólo a nivel biofísico (RMN y microscopía óptica). Encontramos evidencia, a nivel bioquímico, de la existencia de dos glucoproteínas distintas, la glucoproteína E (PM por encima de 300 KD) característica de momentos del ciclo con predominio estrogénico y la glucoproteína G (PM por encima de 200 KD) típica de momentos del ciclo con predominio gestagénico (Fig. 7).

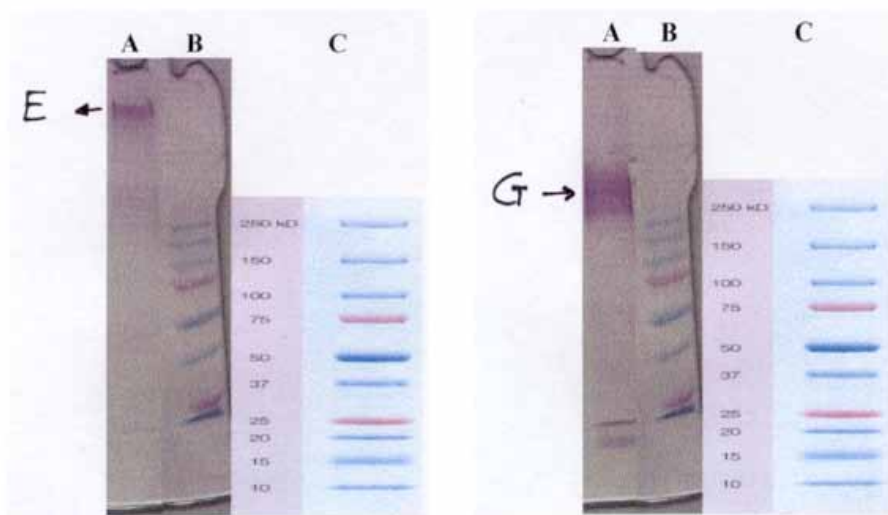


Fig. 7: Izquierda: A: Glucoproteína E evidenciada como banda de color rosa al teñir con reactivo de Schiff tras la electroforesis SDS-PAGE; B: bandas del patrón de proteínas evidenciadas tras su migración por electroforesis SDS-PAGE; C: prospecto del patrón de proteínas preteñido de BIO-RAD mostrando el PM de cada banda. Vemos que glucoproteína E tiene un PM bastante por encima de 250 KD y por lo tanto por encima de 300 KD. Derecha: A: Glucoproteína G evidenciada como banda más ancha de color rosa al teñir con reactivo de Schiff después de la electroforesis SDS-PAGE; B: patrón de proteínas después de su migración por electroforesis SDS-PAGE; C: prospecto del patrón de proteínas preteñido de BIO-RAD mostrando el PM de cada banda. Podemos ver que la glucoproteína G tiene un PM claramente por encima de 200 KD.

Y además hemos evidenciado la presencia de cuatro proteínas que aparecen solas o en grupo de forma típica y diferenciada en el hidrogel cervical de cinco momentos distintos del ciclo ovárico (FI, FM, FT, LI-LT y LM)⁵ (Fig. 8).

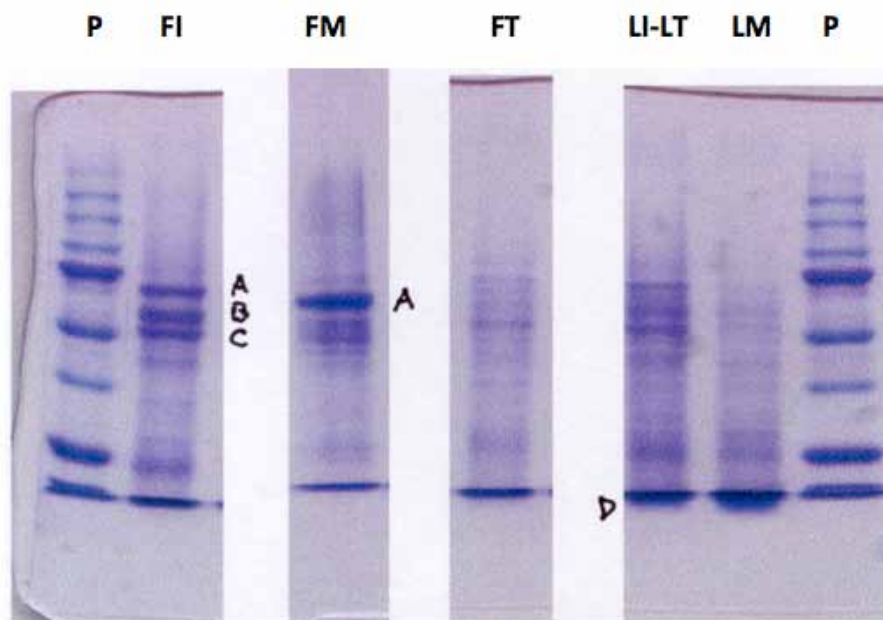


Fig. 8: P: Patrón de proteínas tras su migración. En FI aparecen de forma típica las proteínas A (70 KD), B (60 KD) y C (50 KD); En FM sólo alguna de las mismas; En FT no aparece ninguna En LI-LT aparecen A, B y C desdibujadas junto con D; En LM aparece sólo D (15 KD) con más intensidad.

⁵ FI: Fase Folicular Inicial (día -7 y anteriores); FM: Fase folicular Media (-6 a -3); FT: Fase Folicular Tardía (-3 a 0); LI: Fase Lútea Inicial (+1 a +3); LM: Fase Lútea Media (+4 a +10) y LT: Fase Lútea Tardía (+10 en adelante).

Tenemos que continuar esta investigación porque aún está pendiente la caracterización de las dos glucoproteínas del endocervix G y E. Conviene hacerlo porque estos hallazgos abren la esperanza de lograr un test de tipo bioquímico de uso en clínica o en casa para conocer el estado de fertilidad o infertilidad de mujeres incluso no cicladas que requieren una prueba de su estado de fertilidad de un solo día que no son capaces de situar en un ciclo. Se trataría de un test fácil de usar y de interpretar por los usuarios en su propia casa lo cual no es posible con el estudio microscópico porque, para que sea fiable, se necesita un buen microscopio óptico y el estudio minucioso de personal técnico bien entrenado. Por ejemplo serviría para mujeres que reciben tratamiento agresivo por cáncer durante mucho tiempo y dejan de tener ciclos normales. Tampoco está completado el trabajo con proteínas A, B, C y D.

Conocer al detalle la relación de las distintas proteínas y glucoproteínas con la función fértil normal puede ser el principio para poder llegar a curar algunos casos de infertilidad que estén relacionados con el contenido proteico alterado del hidrogel cervical. En IVAF retomaremos esta investigación en bioquímica, si Dios quiere, durante el próximo año. Tenemos previsto también hacer una incursión en biología molecular del hidrogel cervical. Y nos gustaría que contacten con nosotros personas interesadas.

¿Por donde y con qué objetivos ha ido la investigación en bioquímica y biología molecular del hidrogel cervical humano desde 2005 hasta hoy? Sugerencias de continuidad

Tal como ya avanzamos en el II CIRF, se han realizado estudios tratando de identificar las proteínas del moco cervical humano. Tal vez el más ambicioso sea el de Andersch-Björkman et al (2007) en el cual identificaron 194 proteínas, 3 mucinas formadoras de gel y 2 mucinas transmembrana. Sin embargo los autores sugieren que la O-glicosilación es la mayor alteración que ocurre en el moco ovulatorio al tiempo que reconocen que no se sabe la relación de esta alteración con las distintas propiedades físico-químicas del moco cervical humano.

Creemos, como también ellos reconocen, que algunas mucinas no han sido completamente secuenciadas. Las glucoproteínas G y E del endocervix evidenciadas por Medialdea (2005) no lo han sido, al menos no todavía al completo y es trabajo pendiente.

Hasta 2010, la mayoría de las investigaciones en hidrogel cervical se realizaron a la búsqueda de agentes antimicrobianos y para evaluar la actividad antibacteriana in Vitro de los mismos, por ejemplo el trabajo de Ming y colaboradores (2007) mediante cromatografía líquida y difusión radial. Encontraron proteínas con actividad antimicrobiana frente a *Scherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* y *Cándida Albicans*. Samuel K y colaboradores (2009) sugirieron relación entre el dominio de lactobacilo con la actividad anti VIH. Becher (2009) estudiaron las propiedades inmunológicas del tapón cervical durante el embarazo y la presencia en el mismo de marcadores inflamatorios buscando la relación con embarazos pre-término y ello nos interesa porque el mismo está constituido por moco gestagénico similar al producido en las criptas del endocervix durante la fase lútea de los ciclos normales.

Ulcova-Galova (2010) realizó una extensa revisión de las investigaciones para determinar parámetros inmunológicos y bioquímicos del moco cervical humano de momento ovulatorio que podrían tener relación con los abortos de repetición, entre ellos la glucosa, fructosa, inmunoglobulinas, C3, hormonas, prostaglandina E2, citokinas Th1 y Th2 o anticuerpos antiespermatozoides. Suleyman (2007) planteó una interesante hipótesis para tratar de explicar por qué los anticonceptivos orales usados durante mucho tiempo se asocian con un incremento en el riesgo de padecer cáncer cervical. Sugirió que el moco muy viscoso inducido por los anticonceptivos hormonales prolongaría el efecto de agentes carcinógenos que llegan a través del coito y no pueden ser eliminados por el patrón de moco permanentemente viscoso mientras permanece la toma de los mismos. Esta es una investigación que nos interesa iniciar y continuar

a quienes trabajamos desde el Área del Reconocimiento de la Fertilidad (ARF) pues de momento es sólo una hipótesis. En cuanto a la investigación en biología molecular, no podemos dejar de decir, en este apartado, que, desde 1997, se ha venido informando en múltiples artículos sobre la existencia de 6 genes de mucina que son expresados en el tracto genital femenino y que han sido denominados: MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B y MUC6⁶. MUC2, MUC5B, MUC5AC y MUC6 se han encontrado en el cromosoma 11p15.5 y expresan gel formador de mucinas, mientras que MUC1 y MUC4 se expresan en el epitelio del ectocervix y son mucinas asociadas a membrana⁷. MUC4 y MUC5B se han descrito como los principales genes expresados por el endocervix⁸. Tal vez estos genes están implicados en la expresión de las glucoproteínas E y G que hemos evidenciado y ello es algo que podremos saber si continuamos esta investigación.

Hemos hecho una nueva revisión de la literatura científica con vistas al III CIRF y constatado que sigue de primera actualidad la consideración del tracto cervical como la más efectiva primera línea de defensa contra muchos tipos de gérmenes. Encontramos nuevos trabajos sobre la búsqueda de actividad antimicrobiana en el tapón mucoso del embarazo y nos sigue interesando por su similitud con el moco cervical de la fase lútea. Habton H Habte (2008) purificaron y caracterizaron mucinas del tapón mucoso y determinaron actividad antiHIV1 en un 97,5% en el tapón mucoso del embarazo purificado pero no en el mismo, tal cual, sin una previa purificación⁹.

Se ha realizado análisis proteómico del fluido cervico-vaginal usando muestras de lavado previo a laparoscopia. Si bien no son muestras que quienes trabajamos en el área del reconocimiento de la fertilidad consideremos adecuadas porque no utilizan el hidrogel del endocervix únicamente sino el mismo junto con flujo vaginal dentro del agua de lavado que se suele desechar de forma rutinaria, sin embargo se trata de intentos de aproximación en orden a demostrar el importante papel de prevención de infecciones ginecológicas que constituye la barrera cervical. Así Geert Zegels (2009) consiguieron identificar 339 proteínas, 151 de las mismas no habían sido antes identificadas en fluido Cervico-vaginal¹⁰.

Un campo de investigación interesante para nuestra área de trabajo es conocer la protección que supone el hidrogel cervical frente a la transmisión del virus del SIDA porque si se demuestra una eficaz protección, detectable y por eso comprobable, durante algún periodo del ciclo ovárico los matrimonios en los que sólo uno de los dos está infectado podrían decidir de mutuo acuerdo tener relaciones sexuales sólo durante esos días del ciclo en los cuales el hidrogel cervical provee de protección frente al virus de la inmunodeficiencia humana. Por eso nos interesa la investigación de algunos autores buscando los guardabarreras del HIV. Así Grivel JC (2010) y colaboradores han estudiado la transmisión selectiva de las variantes del R5 HIV-1. Estos autores piensan que en el caso de los guardabarreras X4/R5 la tarea de futuras investigaciones está en identificar cada uno de los guardabarreras selectivos y en descifrar sus mecanismos moleculares de cara a la prevención futura de las distintas variantes de HIV¹¹. Así pues una vía de investigación para nosotros puede ser buscarlos, de forma específica, en el hidrogel distinto que se sintetiza en el endocervix en los diferentes momentos del ciclo ovárico.

6 Gypson IK et al. "Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia!". *Biol Reprod* 1997; 56: 999-1011.

7 Wiggins et al. "Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract". *Sex Transm Infect* 2001; 77: 402-408.

8 Idris N, Carraway KL. "Sialomucin complex (MUC4) expression in the rat female reproductive tract". *Biol Reprod* 1999; 61: 1431-1438.

9 Habton H Habte et al. "The inhibition immunodeficiency Virus type 1 activity by crude and purified human pregnancy plug mucus and mucin in an inhibition assay". *Viral Journal* 2008; 5: 59. Este autor recoge el resumen de las aportaciones que mostramos aquí en referencia al estudio de los genes de mucina.

10 Pert Zegels et al. "Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid using colposcopy samples". *Proteome Science* 2009; 7: 17.

11 Jean- Charles Grivel et al (2010). "Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper?". *J Translat Med* 2010; 9(suppl 1): 6.

Levinson P y colaboradores (2012)¹² han encontrado en fluido cervico-vaginal de mujeres seronegativas expuestas a ser infectadas pero de bajo riesgo y de mujeres seropositivas que contiene actividad neutralizante del virus HIV. Varias proteínas innatas de inmunidad, incluida HNP1-3 y LL-37, contribuyen a ello pero esas moléculas pueden tener también propiedades inflamatorias y contribuyen otros factores. La muestra que han utilizado estos autores no es adecuada para el propósito de los investigadores del área del reconocimiento de la fertilidad quienes deben buscar en muestras de hidrogel cervical.

Wiechula B (2010) han investigado el fluido Cervico-vaginal de mujeres con candidiasis, chlamydia y otras infecciones bacterianas, buscando y comparando la concentración de beta-defensinas humanas selectivas (Hbd-1, Hbd-2) y han encontrado que la *Chlamydia trachomatis* activa la producción de Hbd-2 mientras que *Cándida albicans*, *Chlamydia trachomatis* y otras bacteria patógenas inducen aumentos variables en la concentración de Hbd-1¹³.

Recientemente Buckner LR y colaboradores (2011) han experimentado in Vitro con una línea celular epitelial derivada de tejido endocervical, éstas células secretan mucus y expresan MUC5B y también receptores hormonales que responden adecuadamente a las hormonas esteroideas femeninas. Las células expresan péptidos antimicrobianos, citocinas proinflamatorias y chemocinas, éstas últimas en dependencia del influjo hormonal al cual están expuestas las células. Este experimento abre las puertas a posteriores investigaciones in Vitro sobre el papel de factores exógenos y endógenos que regulan el epitelio cervical en orden a la inmunidad¹⁴.

Recientemente ha sido identificada y secuenciada una glucoproteína en moco humano del oviducto la cual está presente cuando hay un predominio del efecto estrogénico. Se trata de la glucoproteína oviductal 1 (OVGP-1) con un peso molecular de 120 KD¹⁵. El gen correspondiente codifica un larga glucoproteína con numerosos lugares de O-Glicosilación, su regulación y expresión sería estrógeno dependiente. La expresión del gen y la secreción de la glucoproteína ocurren durante la fase folicular tardía. Es secretada por células no ciliadas del epitelio oviductal y se asocia con ovocitos ovulados, blastómeros y regiones del acrosoma del espermatozoide. Estos autores han investigado OVGP-1 como posible marcador del cáncer de ovario con resultados esperanzadores de cara a la detección precoz.

Habrá pues que ver si existe alguna relación entre esta glucoproteína del oviducto y la glucoproteína E del endocervix la cual tiene un peso molecular bastante más alto, por encima de 300 KD (Medialdea 2005).

Conclusión

Una investigación desde el ARF abre muchas posibilidades, no sólo la investigación sobre el hidrogel cervical. También la investigación del hidrogel oviductal que pueda llevar a conocer mejor los procesos implicados en los primeros estadios de la vida embrionaria durante el transporte por el oviducto y la implantación en el endometrio, si bien las muestras de moco oviductal son más difíciles de conseguir que las muestras de moco cervical.

12 Levinson P et al. "HIV-Neutralizing activity of cationic polypeptides in Cervix-vaginal secretion of women in HIV-Serodiscordant relationships". Plos one 2012; 7(2): 1-9.

13 Wiechula B et al. "HBD-1 and HBD-2 are expressed in Cervix-vaginal lavage in female genital tract due to microbial infections. Ginekol Pol 2010; 81 (4): 268-71.

14 Buckner LR et al. "Innate immune mediator profiles and their regulation in a novel polarized immortalized epithelial cell model derived from human endocervix". J Reprod Immunol 2011; 92(1-2): 8-20.

15 Maines-Bandiera S et al. "Oviductal glycoprotein (OVGP-1, MUC9): A differentiation-based mucin present in serum of women with ovarian cancer". Int J Gynecol Cancer 2010; 20 (1): 16-22.

Además el conocimiento a nivel bioquímico y molecular del tapón mucoso del embrazo porque ello actúa en la prevención del embarazo pretérmino y por tanto a favor de la vida. Los factores implicados en el transporte y selección de los espermatozoides, tanto en el interior del sistema genital masculino como en el interior del sistema genital femenino, en la fecundación, en el transporte embrionario e implantación. También la investigación que facilita a los matrimonios conocer y poder utilizar mejor no sólo los métodos de reconocimiento de la fertilidad tradicionales de uso en casa que les sirven para reconocer la fertilidad al servicio de la paternidad responsable (Billings, Temperatura corporal basal y sintotérmico de doble comprobación) sino también los monitores técnicos de uso en casa. Obtener marcadores de algunos tipos de cáncer ginecológico y avanzar en su tratamiento etc.

Desde el área de la salud y la sexualidad reproductiva (ASSR) no se encuentran ayudas ni líneas de investigación en relación con los métodos de reconocimiento de la fertilidad ni con el área del reconocimiento de la fertilidad. Por eso conviene que trabajemos en equipo para encontrar los modos de investigar y de publicar lo más y mejor posible. Es de interés que los distintos equipos que trabajamos en investigación en esta temática tengamos relación, nos comuniquemos y favorezcamos y contribuyamos a un trabajo multidisciplinar en equipo para configurar un área de trabajo investigador dentro del «Área del Reconocimiento de la Fertilidad» (ARF).