Electroforesis SDS-PAGE de distintos tipos de hidrogel cervical

CONCEPCIÓN MEDIALDEA FERNÁNDEZ

INSTITUTO VALENCIANO DE FERTILIDAD, SEXUALIDAD Y RELACIONES FAMILIARES (IVAF)

«Esta investigación ha recibido una ayuda de la Obra Social de la Caja de Ahorros y Pensiones de Barcelona»

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

JUSTIFICACIÓN

- Hay que facilitar el diagnóstico de fertilidad en la clínica,
- Hace falta un test para reconocer en casa la situación de fertilidad o infertilidad sin depender del ciclo ovárico,
- Hay lagunas de conocimiento en fisiología y bioquímica del hidrogel cervical.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

-1º: Estudio microscópico del hidrogel cervical para facilitar el diagnóstico clínico,

-2º Estudio electroforético de distintos tipos de hidrogel cervical para encontrar diferencias de tipo bioquímico,

- En ambos estudios empleamos muestras obtenidas en clínica y muestras autoextraídas en casa.

OBJETIVOS

Microscopía óptica:

- Observar la conformación y evolución de la canalización a lo largo del ciclo ovárico
- Simplificar el estudio de la canalización
- Encontrar algún elemento o factor que facilite reconocer el grado de fertilidad
- Comparar autoextracción y obtención en clínica al estudiar la canalización
- Probar el cálculo y diagrama de porcentajes de Odeblad en muestras autoextraídas

Electroforesis SDS-PAGE:

- Encontrar diferencias bioquímicas en distintos tipos de hidrogel cervical y su evolución en el ciclo
- Validar el método de obtención de la muestra mediante autoextracción
- Contribuir a la caracterización bioquímica del hidrogel cervical

Estudios previos del HIDROGEL CERVICAL (HC)

- Estudios previos muestran que el HC presenta cuatro tipos de secreciones. G, L, S y P. Cada tipo tiene distinta viscosidad (RMN) y distinta cristalización observada con el microscopio de luz (Odeblad 1997).

- Cada uno de los 4 tipos de HC presenta una arquitectura molecular diferente (Menárguez y cols. 2003).

- El cálculo de porcentajes de los 4 tipos de HC con ayuda de microscopio óptico y el diagrama de porcentajes de Odeblad permite situar una muestra en su día del ciclo y conocer su grado de fertilidad.

Estudios previos sobre canalización del HC

- Davajan 1971 deja secar el moco tapado con un cubre en estufa a 37ºC durante 48 horas antes de observar la canalización
- Faccioli 1984 deja secar las muestras durante 72 horas una parte tapada y otra sin cubrir y relaciona la canalización con la cristalización
- Garcea 1984 deja secar las muestras bajo cubre en termostato a 50ºC durante 2 horas y comprueba la estrógeno dependencia del fenómeno
- Hilgers y Previl 1979 tratan de contar el nº de canales
- Capella 1980 expone la ventaja del contaje del nº de canales para valorar el grado de fertilidad de la muestra

- Temprano 1990 relaciona la imagen observada con la medición de estradiol, progesterona o ambos y/o con el estudio ecográfico y propone una clasificación de la canalización en 10 grados.

Estudios precedentes de electroforesis del HC

Spencer et al 1957, Moghissi et al 1960, Schumacher et al 1965, Elstein y Polard 1968, Moghissi 1972, Zaneveld et al 1975 identificaron albúmina, inmunoglobulinas, transferrina, lactoferrina, amilasa, lisozima, inhibidores de la proteasa, antitrombina,, haptoglobina y factores de complemento de las globulinas, observaron también una mucina que no migraba y una banda no migratoria compuesta por polisacáridos no solubles y células de descamación.

Roelof et al 1980 mediante **SDS-PAGE** observan que la proporción de proteínas con respecto a mucoproteínas (MP) es mínima antes de la ovulación y aumenta deprisa después de la misma. Van Kooij 1983 calculan concentración relativa de proteínas con respecto a MP. Morales et al 1983 observan que el nivel de MP es máximo antes de la ovulación y la proporción de agua después de la misma baja mucho. Hirano et al 1999 identifican componente capaz de blindar inmunoglobulinas.

RESULTADOS

- El cálculo y diagrama de porcentajes (Odeblad 97) no sirve en muestras autoextraídas

- Aportamos una gradación de la canalización (5 grados) para determinar el grado de fertilidad tanto de muestras obtenidas en clínica como autoextraídas, la cual resume bien el proceso de canalización cíclico que hemos observado

- Describimos por primera vez 3 elementos que ayudan en el análisis de fertilidad de las muestras que han secado cubiertas, y que son anuncio de ovulación inminente: lisis, maclas de cristales cúbicos, y algunas "ramas" que bajo el cubre han permanecido

- Tras SDS-PAGE y teñido con reactivo de Schiff hemos descubierto una glucoproteína que aparece cuando hay predominio estrogénico, con PM por encima de 300 KD; Y otra glucoproteína que se nuestra con predominio gestagénico y su PM está por encima de 200 KD

- Tras SDS-PAGE y tinción con Coomasie hemos observado la presencia y evolución de 4 proteínas significativas: A (70KD), B(60KD), C(50KD) y D(15KD).

- La tendencia de aparición es similar en muestras extraídas por el ginecólogo y en muestras autoextraídas por la paciente.

Material del estudio microscópico

	Nº DE PACIENTES	Nº DE MUESTRAS
CICLOS ESPONTÁNEOS		
Autoextracción	22	626
Consulta ginecológica	87	87
LACTANCIA MATERNA		
	1	25
CICLOS INDUCIDOS		
	7	7
TOTAL	**119**	**745**

Material del estudio electroforético

	Nº DE PACIENTES	Nº DE MUESTRAS
CICLOS ESPONTÁNEOS		
AUTOEXTRACCIÓN	8	86
CONSULTA	87	87
CICLOS INDUCIDOS		
CONSULTA	7	7
TOTAL	**102**	**180**

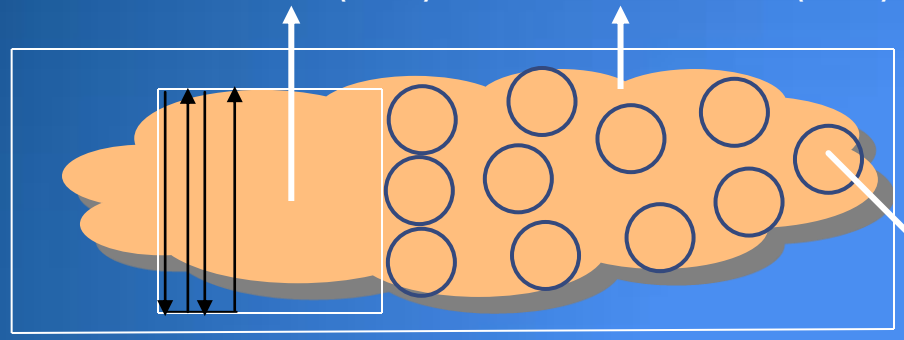
Material total = 925 muestras

- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF)-

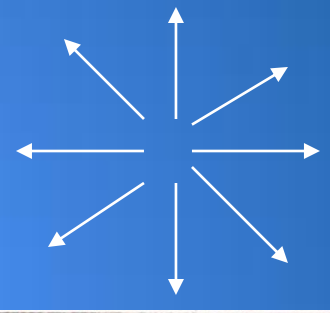
Método del estudio microscópico: **muestras extraídas en la consulta**

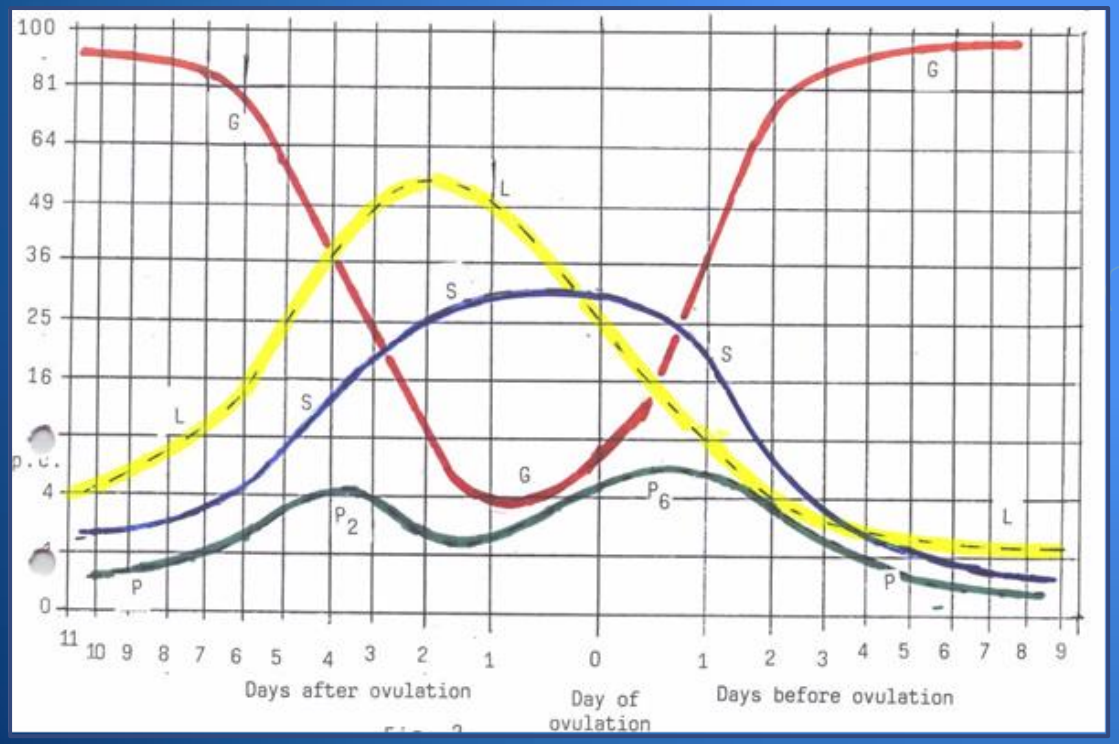
Canalización (10X)

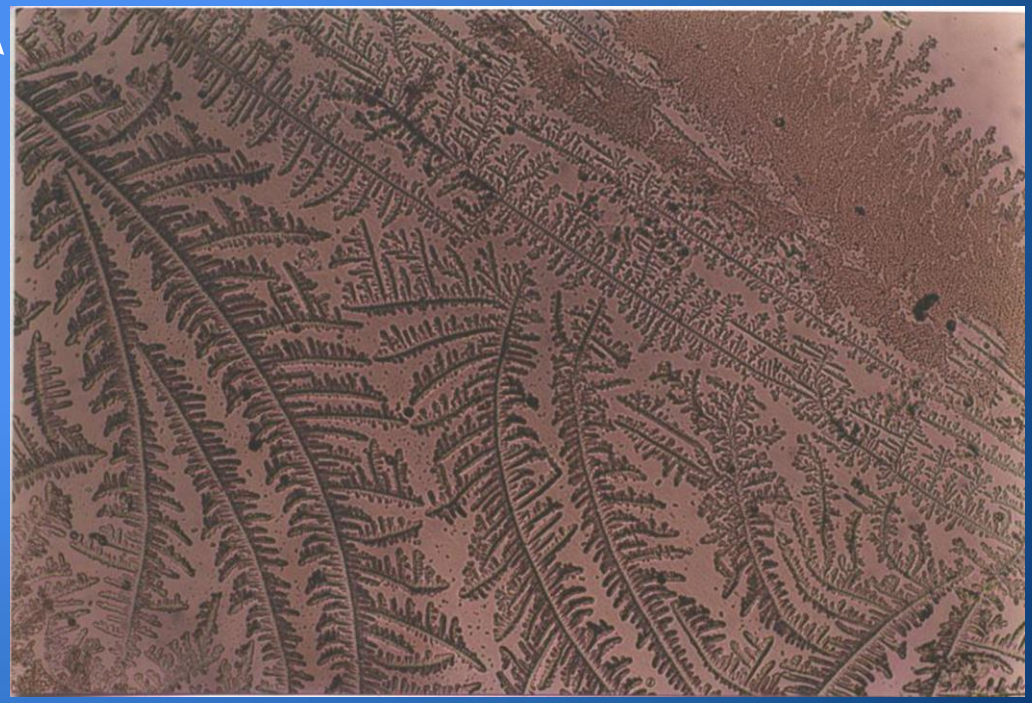
Cristalización (40X)



«Spread it out» (Odeblad 1994)

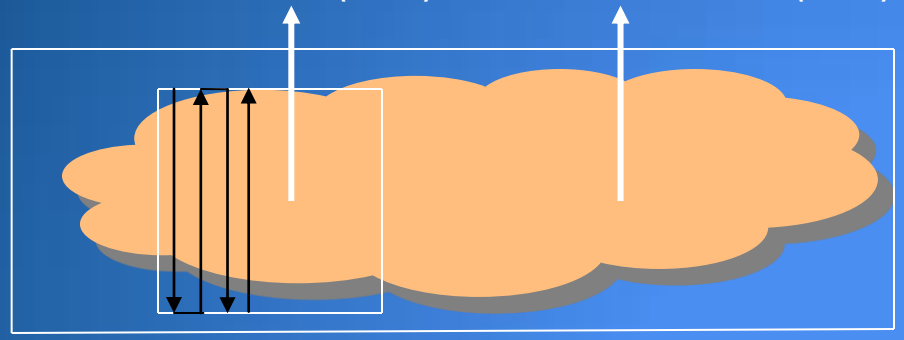




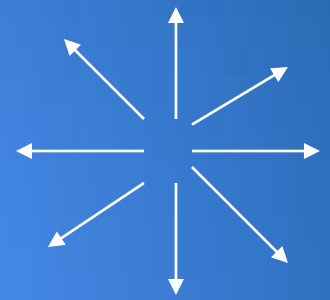


- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF) -

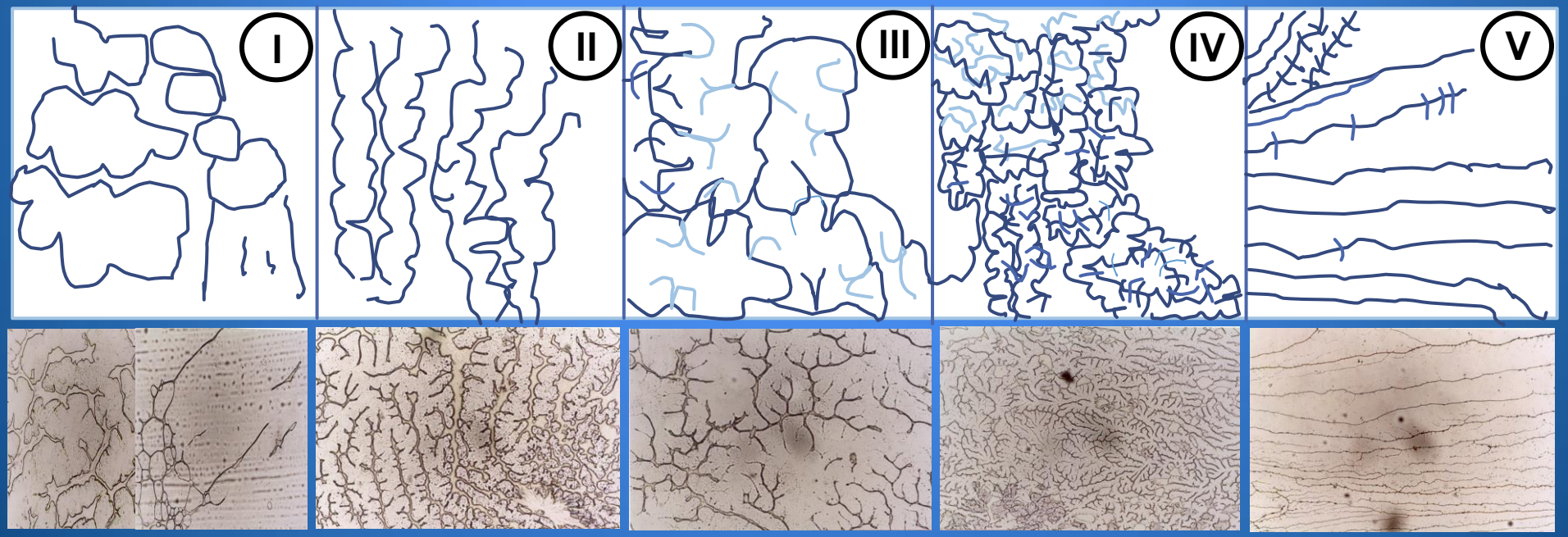
Método del estudio microscópico: **muestras autoextraídas**



«Spread it out» (Odeblad)



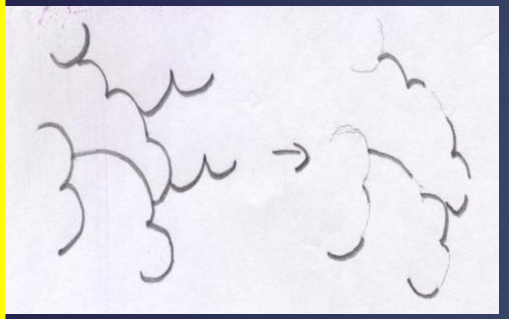
- Grado más alto observado – Búsqueda de tipos de MC presentes y lisis -

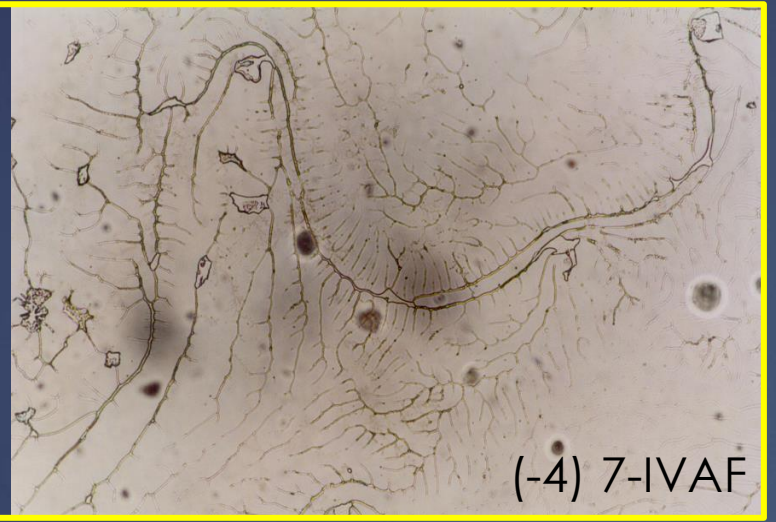


- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF) -

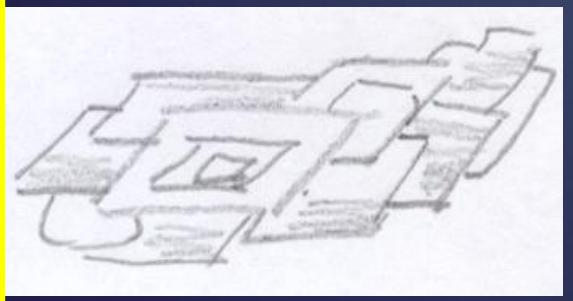
3 elementos adicionales que significan «ovulación inminente» en las muestras que han secado bajo cubre

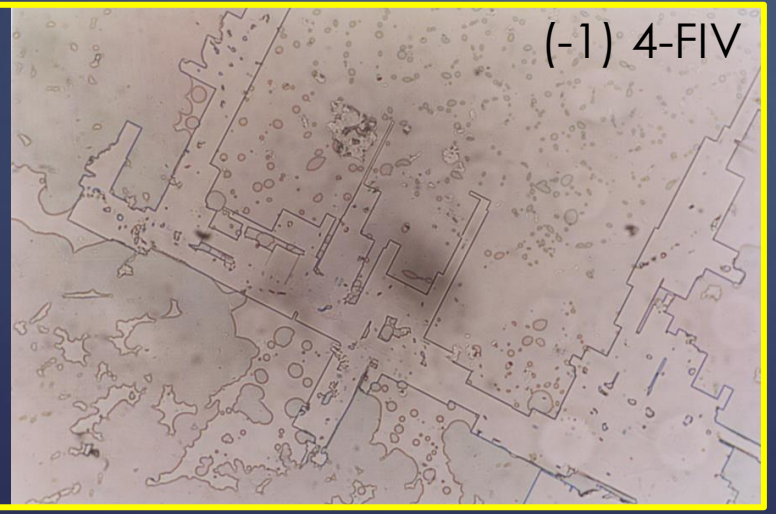
1



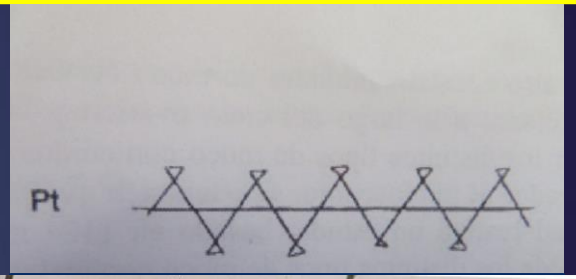


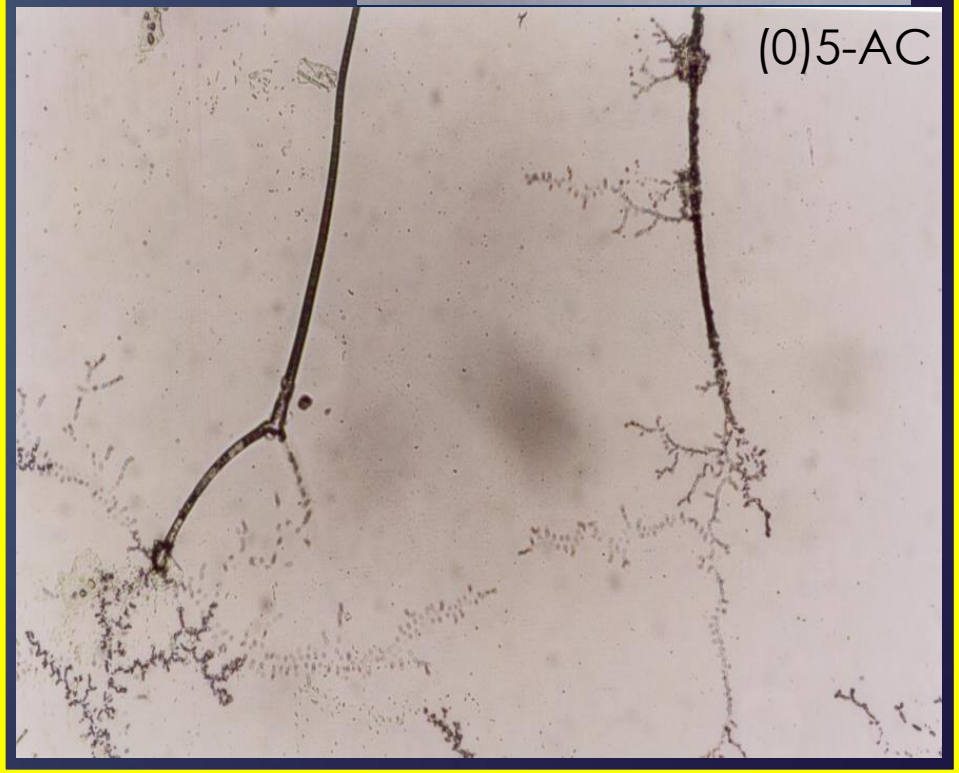
2



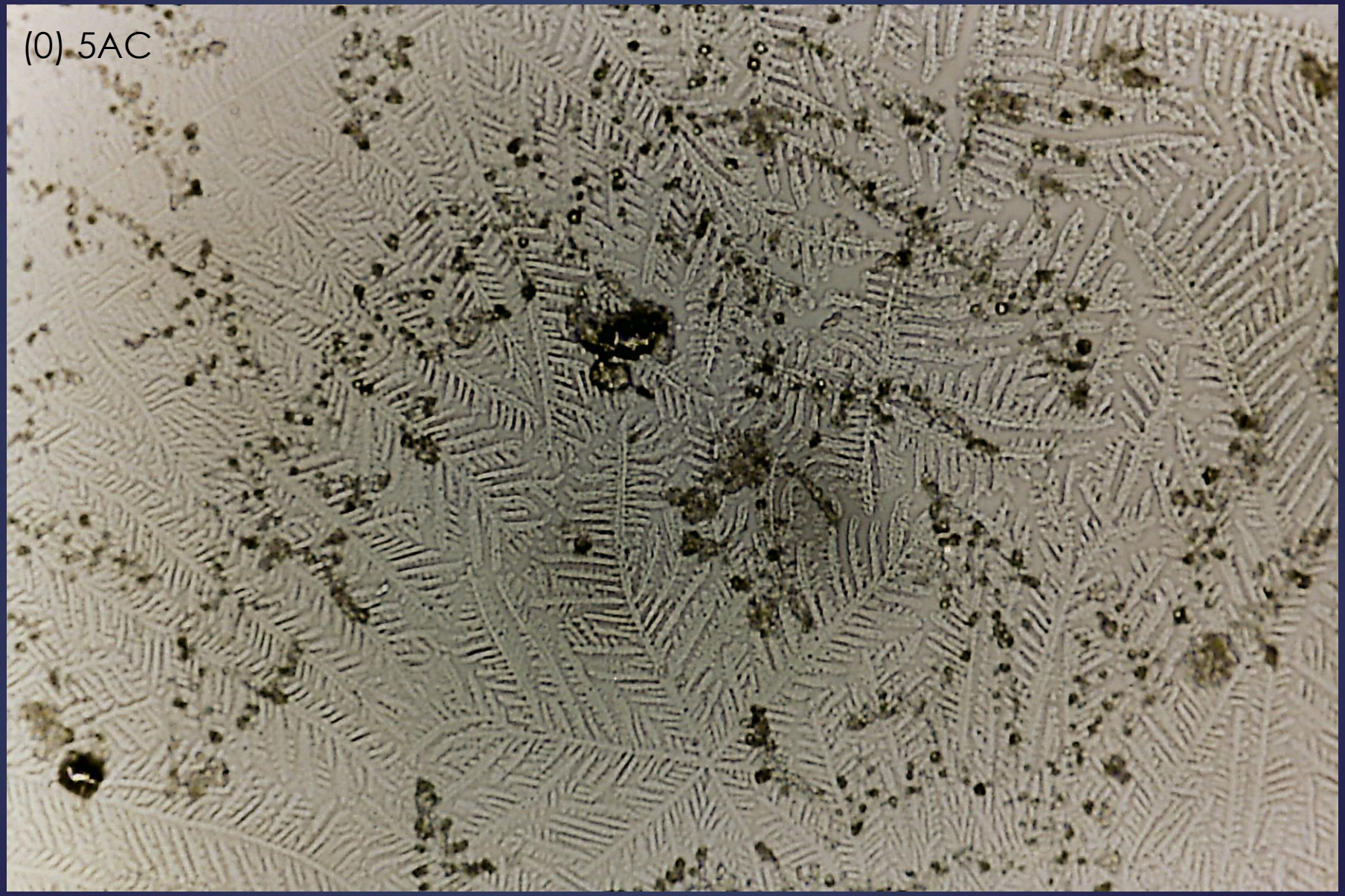


3





Lisis en muestras que han secado sin cubrir

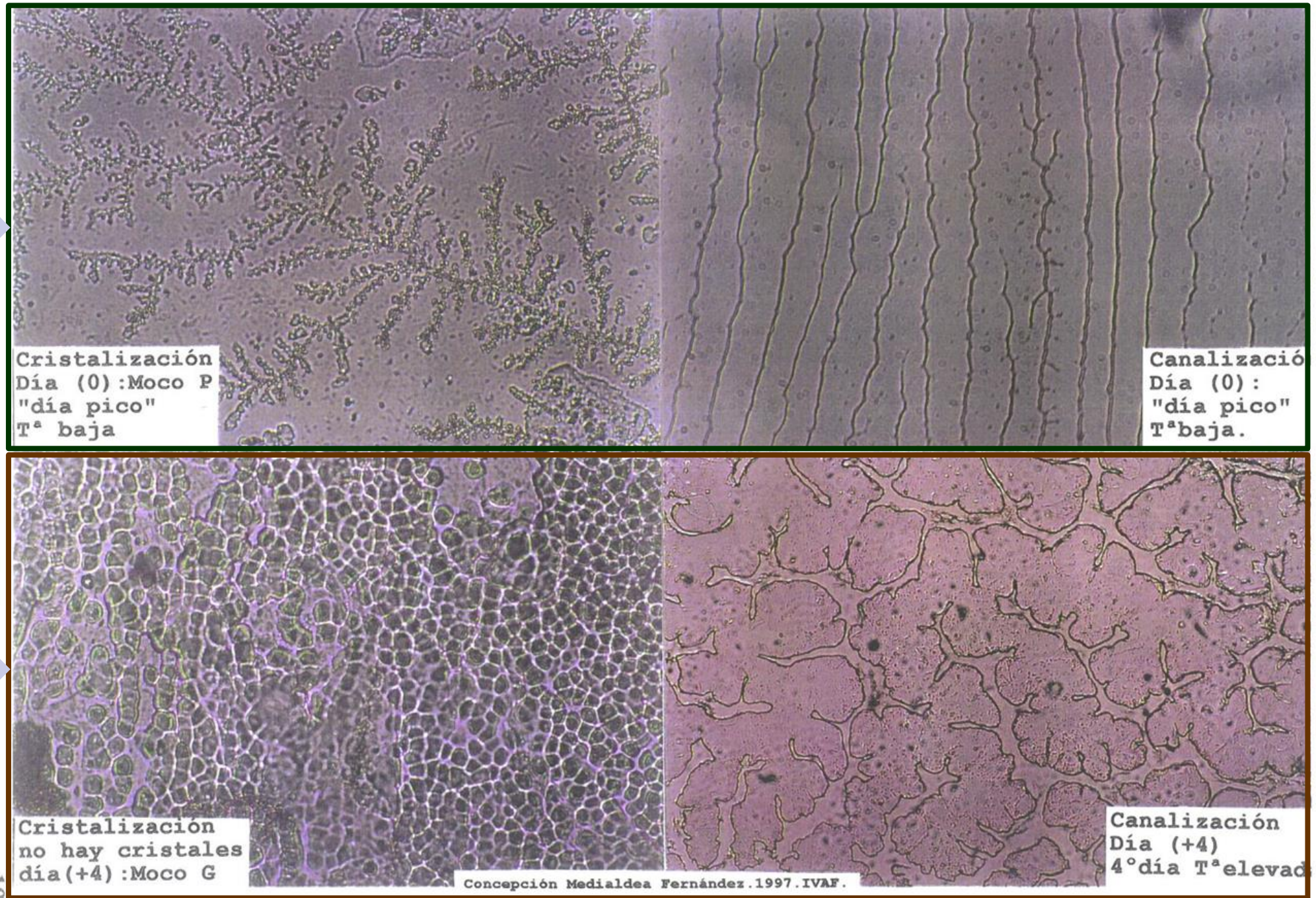


- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF) -

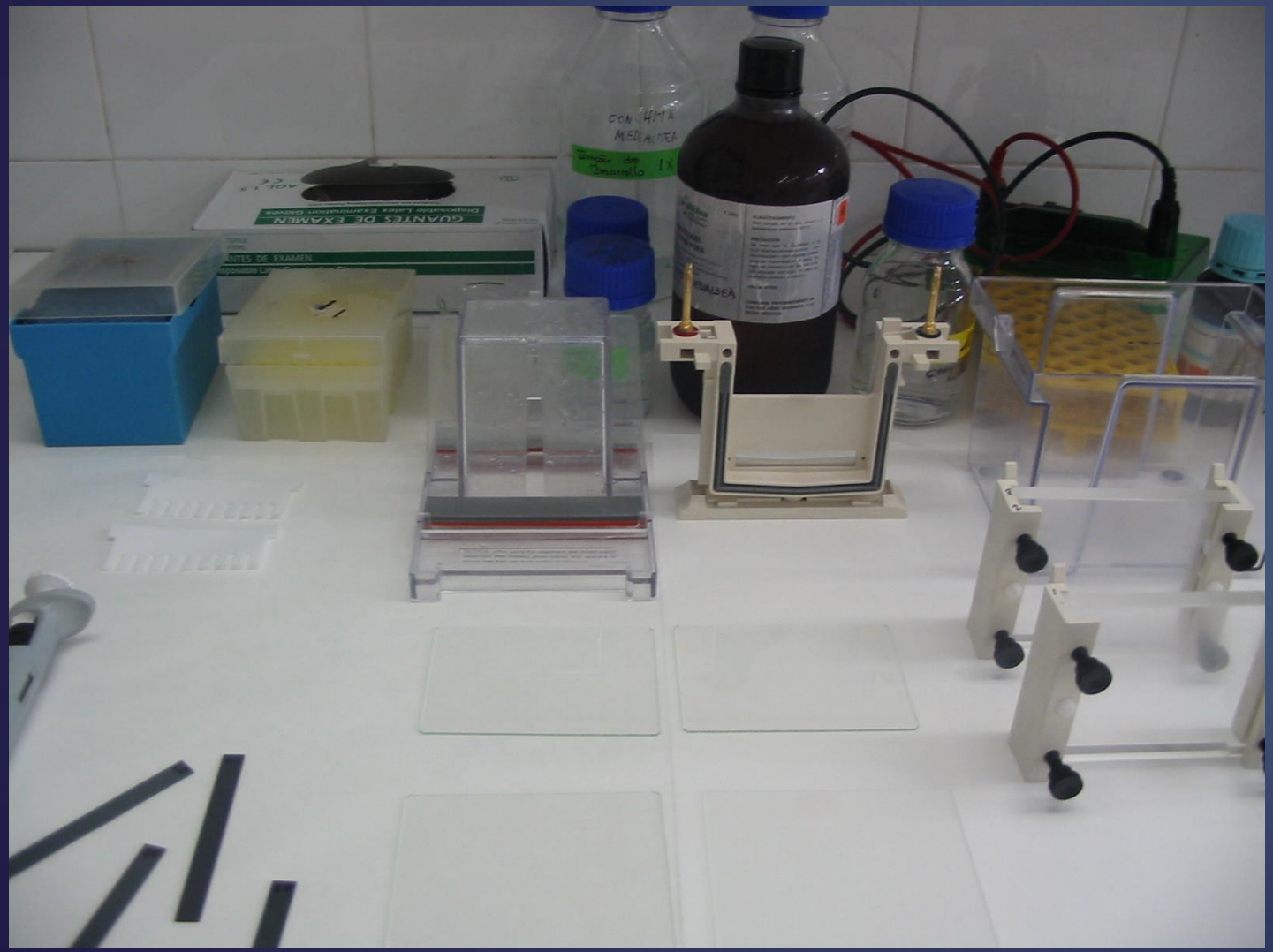
Muestra 1
Día 0:

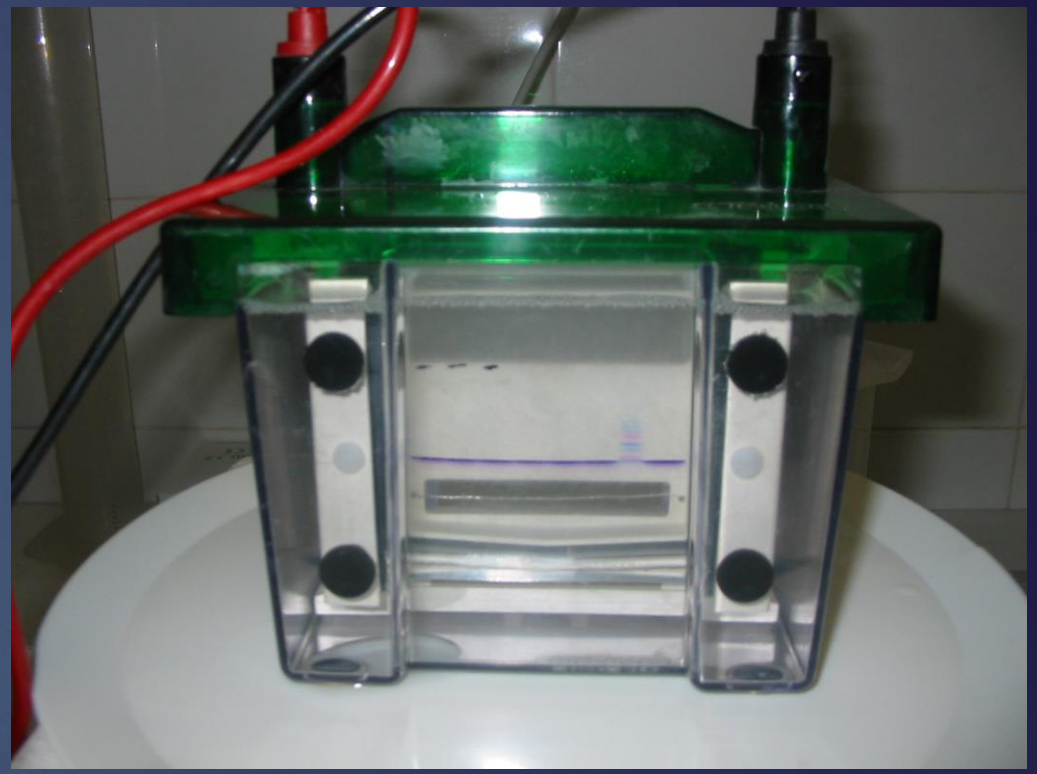
Muestra 2
Día +4:

Moco cervical obtenido mediante autoestracción



Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

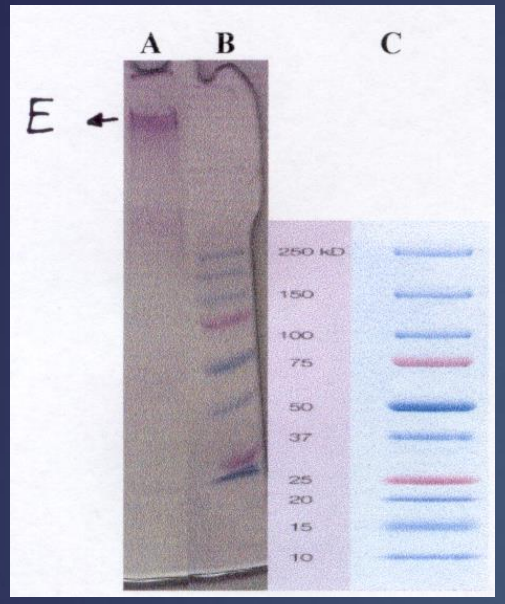


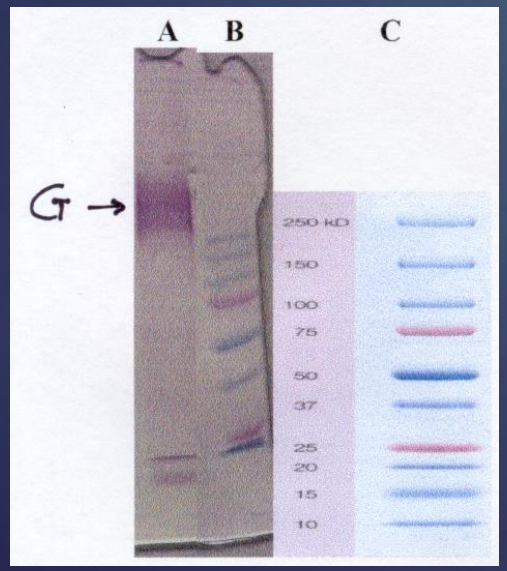


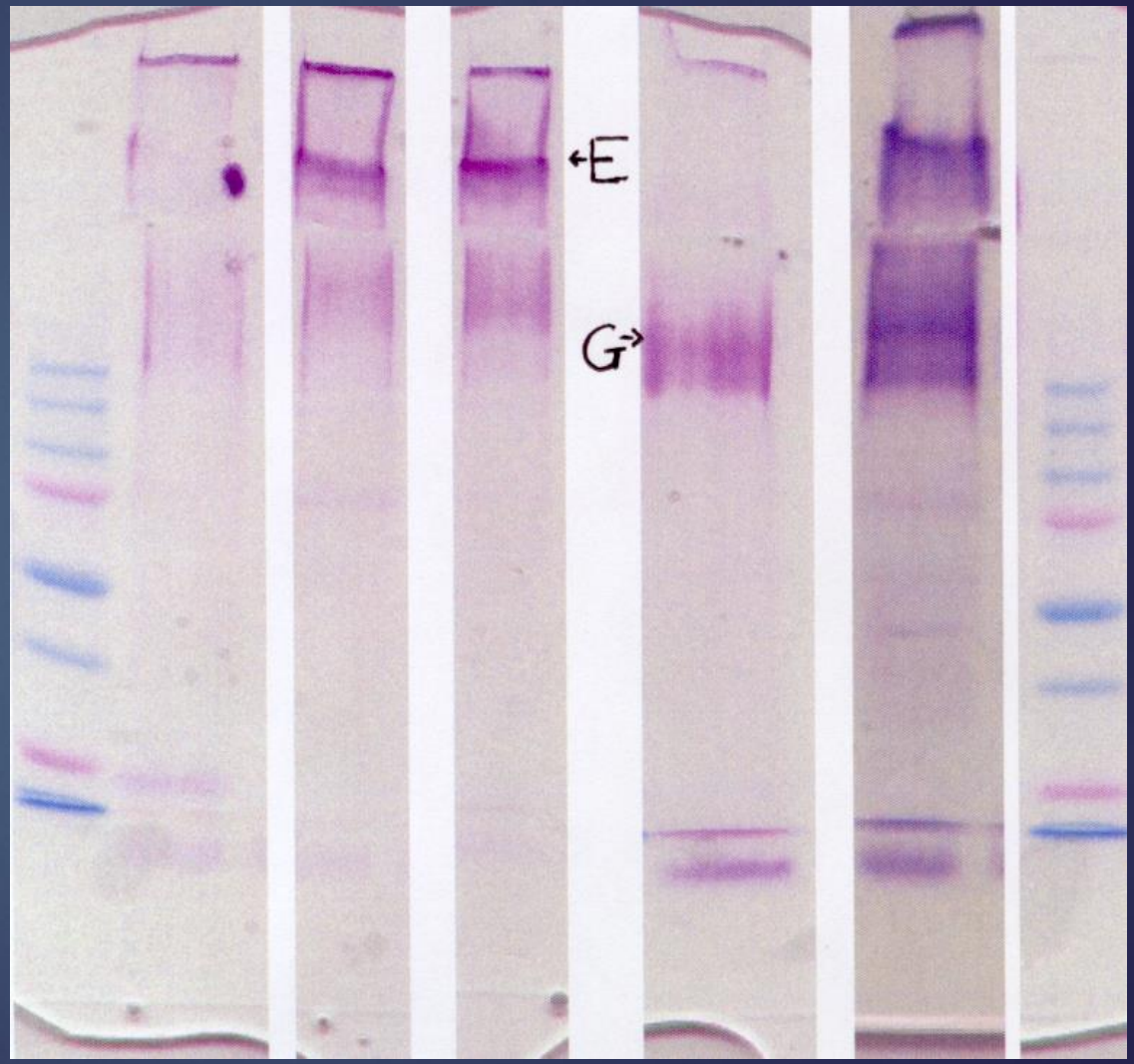
Kit mini-PROTEAN II de BIORAD

Junio 2002

GLUCOPROTEÍNAS E Y G Y SU EVOLUCIÓN EN EL CICLO OVÁRICO

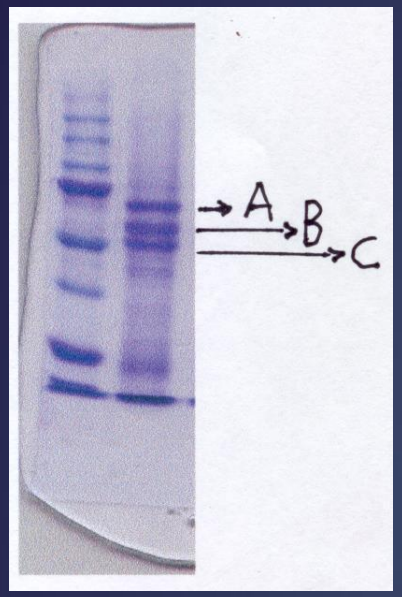


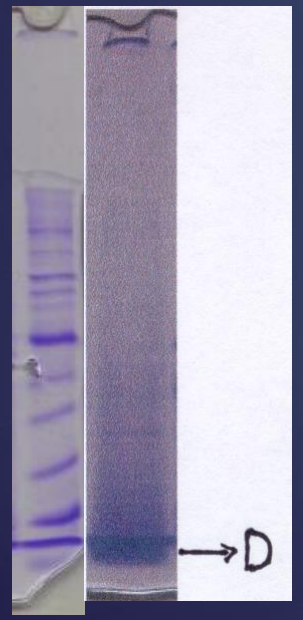


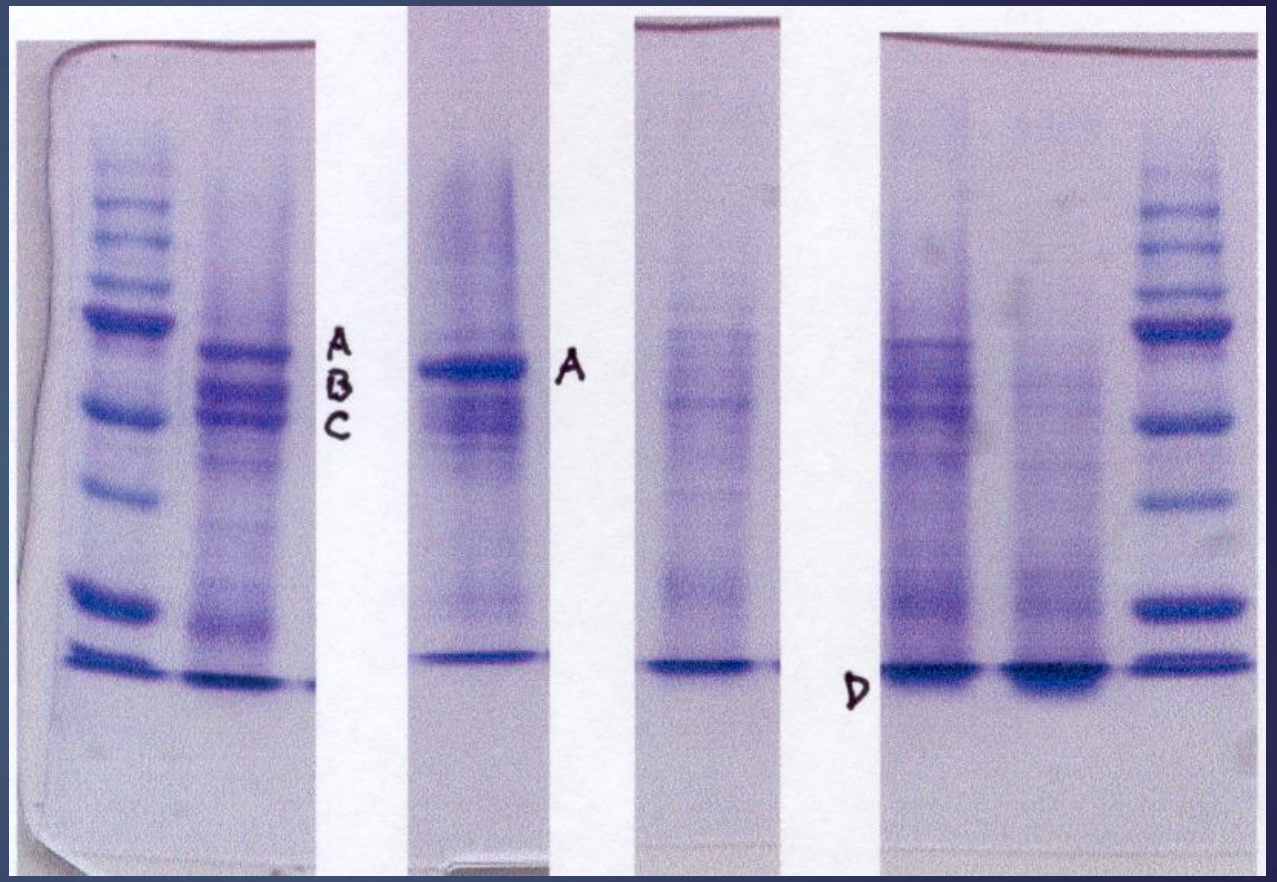


- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF) -

PROTEÍNAS A, B, C Y D Y SU EVOLUCIÓN EN EL CICLO OVÁRICO







P F.I. F.M. F.T. L.I L.M P

L.T

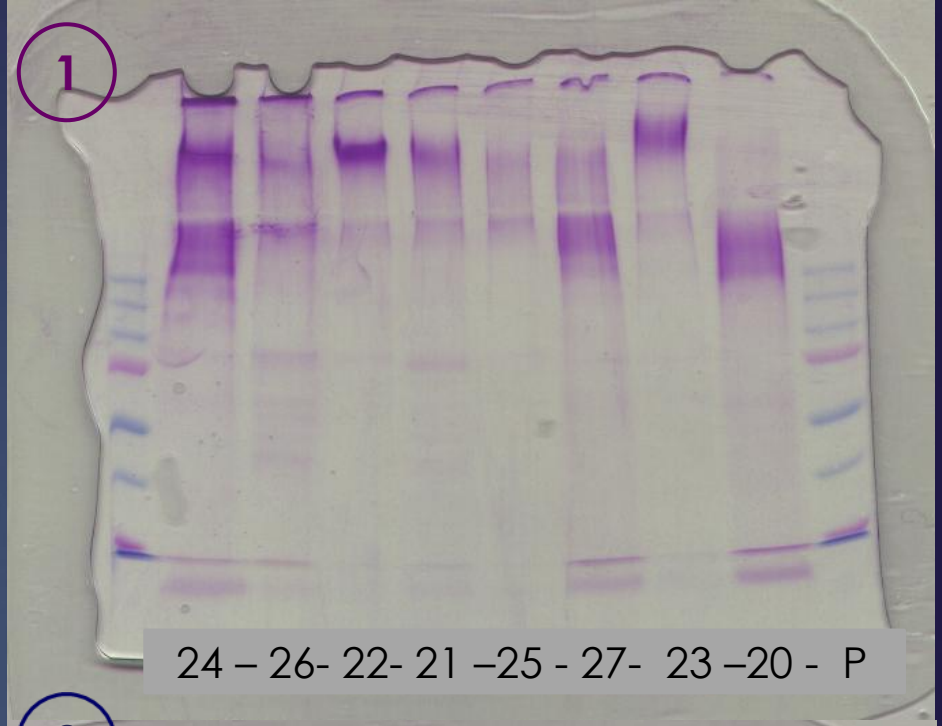
- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF) -

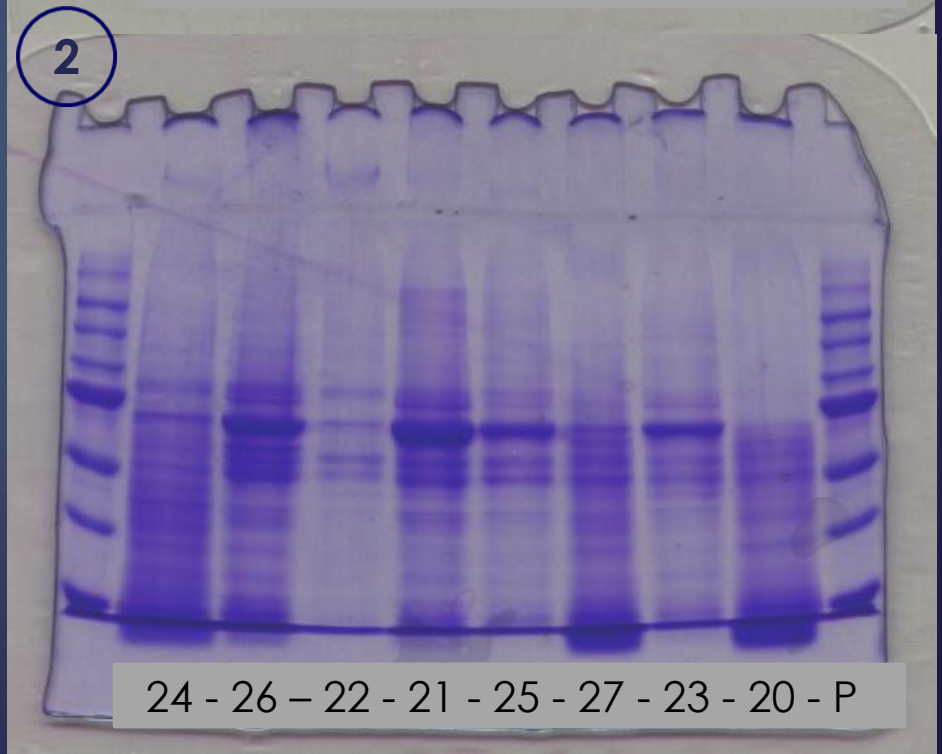
Ciclos espontáneos: Muestras obtenidas en la 1ª consulta por infertilidad del HCU

Las mismas muestras han migrado, en el mismo orden y al mismo tiempo, en dos geles:

1.- gel teñido con Schiff que muestra en magenta las glucoproteínas que han migrado según su tamaño y conocemos su PM

2.- gel teñido con Coomasie que evidencia en azul las proteínas que han migrado en base a su tamaño y conocemos su PM.

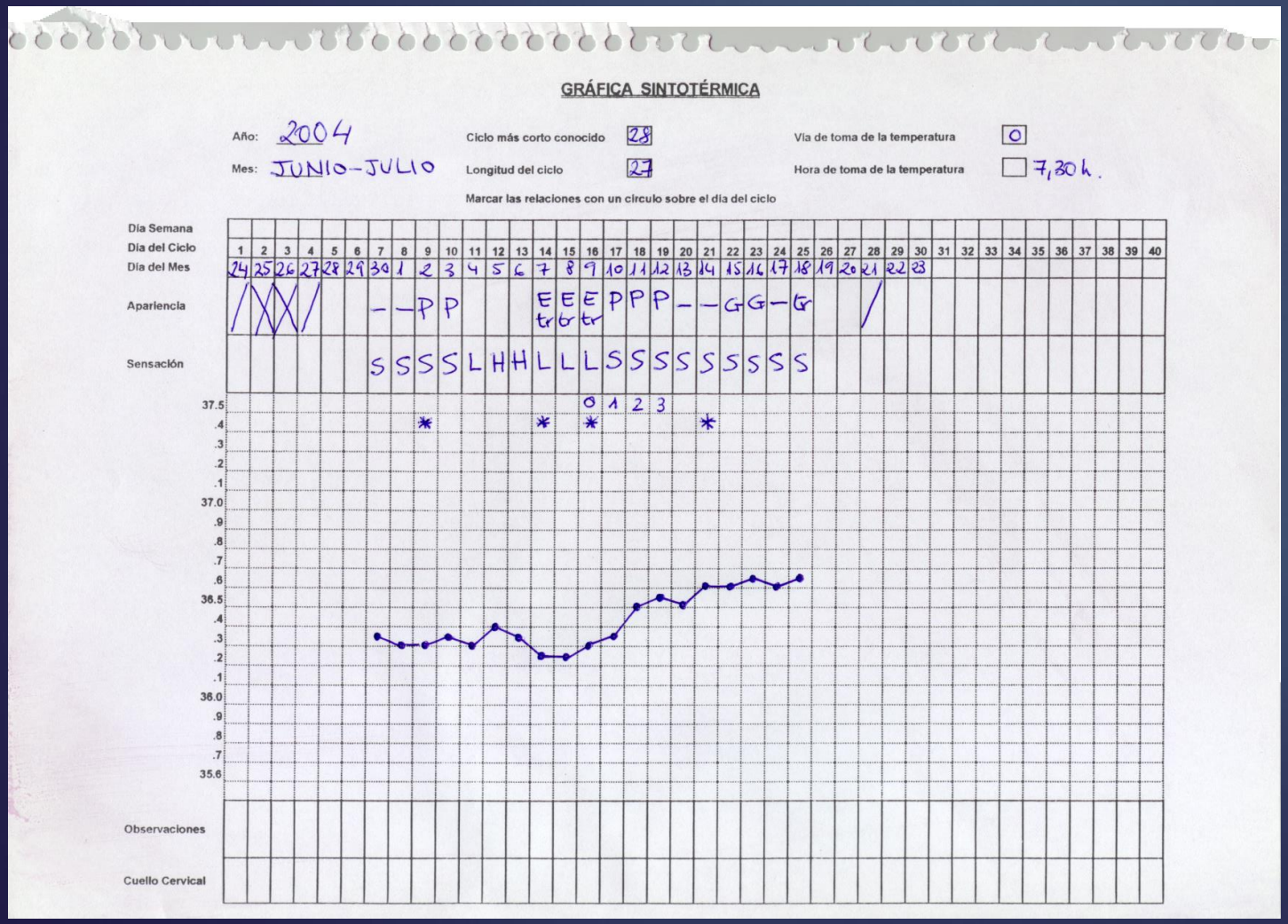




- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF) -

Ciclos espontáneos: Muestras autoextraídas.

Las mismas muestras (*) han migrado en dos geles al mismo tiempo, las hemos colocado en los pocillos según el orden de los días del ciclo: **1.-** gel teñido con Coomasie; **2.-** gel teñido con Schiff.



GRÁFICA SINTOTÉRMICA

Año: 2004 — Ciclo más corto conocido: 28 — Vía de toma de la temperatura: O

Mes: JUNIO-JULIO — Longitud del ciclo: 27 — Hora de toma de la temperatura: 7,30 h.

Marcar las relaciones con un círculo sobre el día del ciclo

Día Semana

Día del Ciclo 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

Día del Mes 24 25 26 27 28 29 30 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

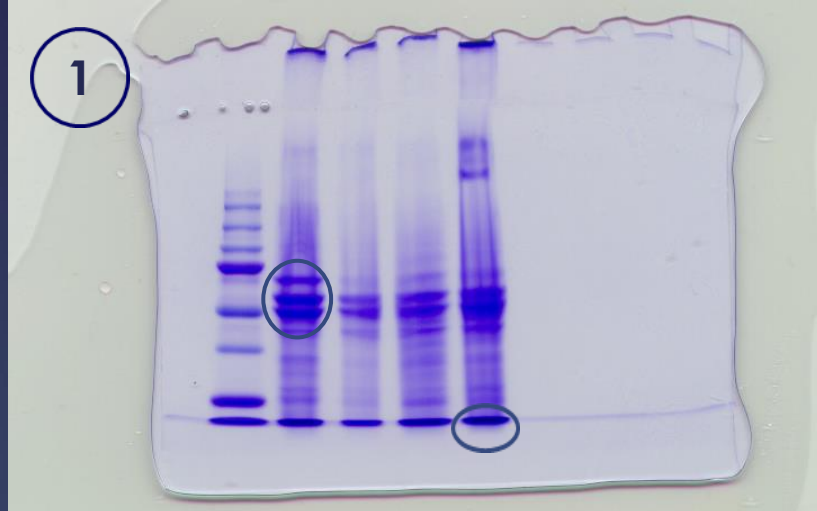
Apariencia: / X X / — — P P E E E P P P — — G G — G /

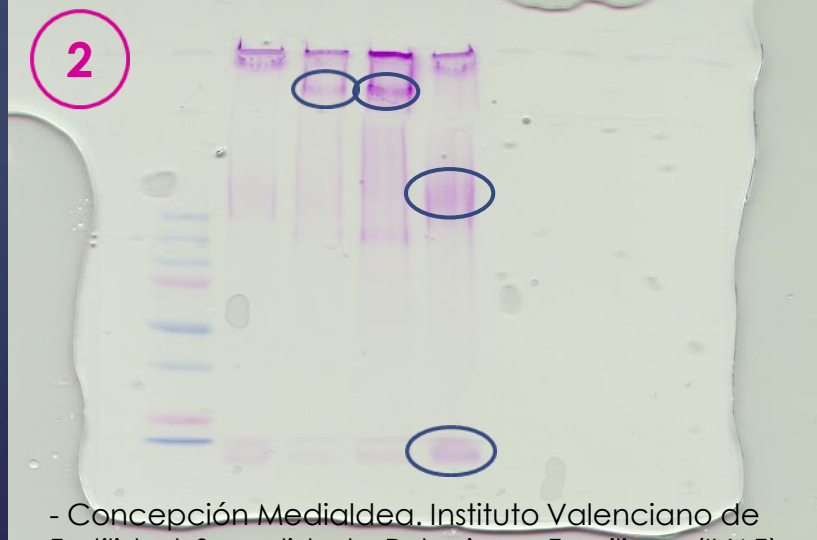
Sensación: S S S S L H H L L L S S S S S S S S

37.5 .4 .3 .2 .1 37.0 .9 .8 .7 .6 36.5 .4 .3 .2 .1 36.0 .9 .8 .7 35.6

Observaciones

Cuello Cervical

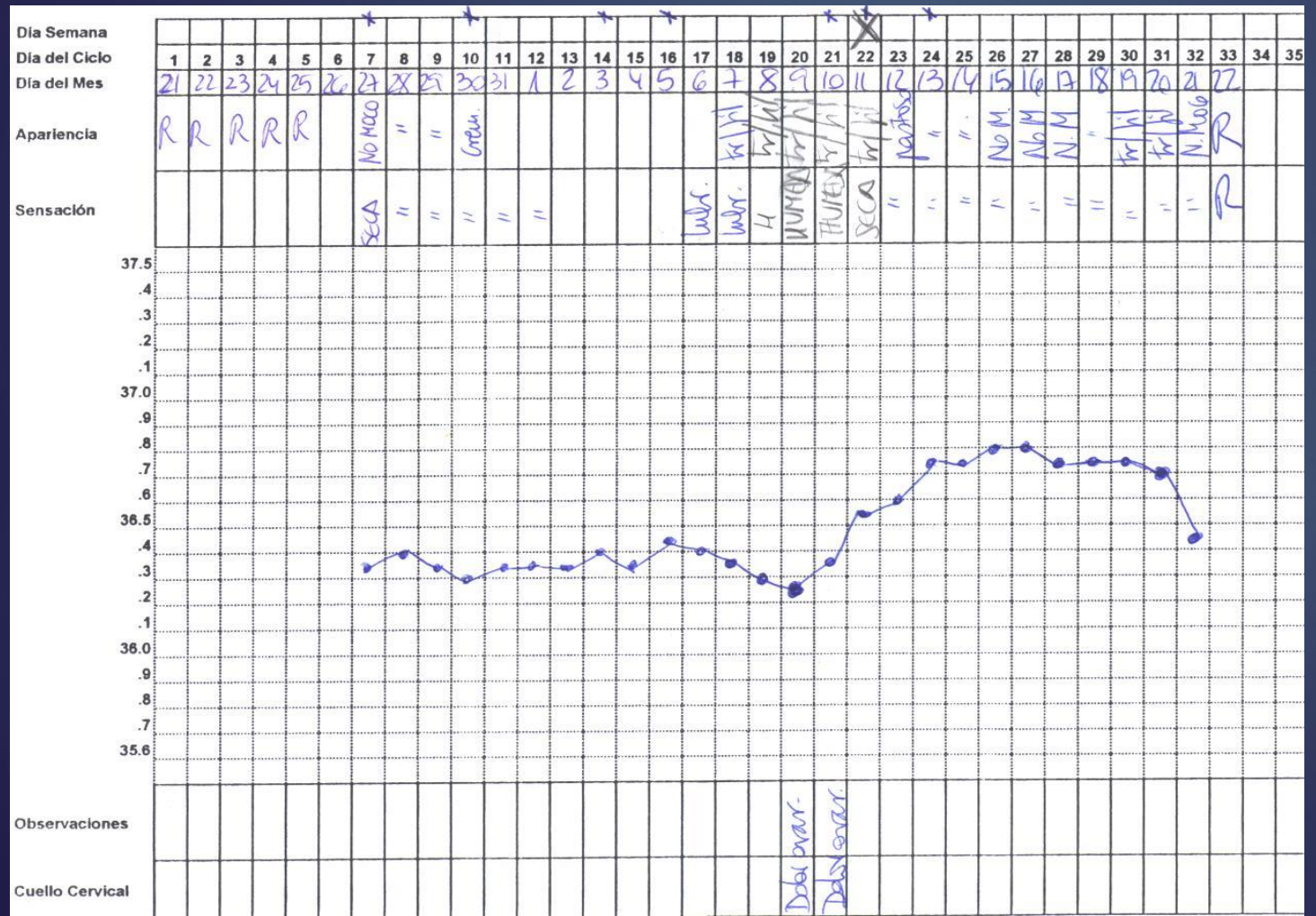




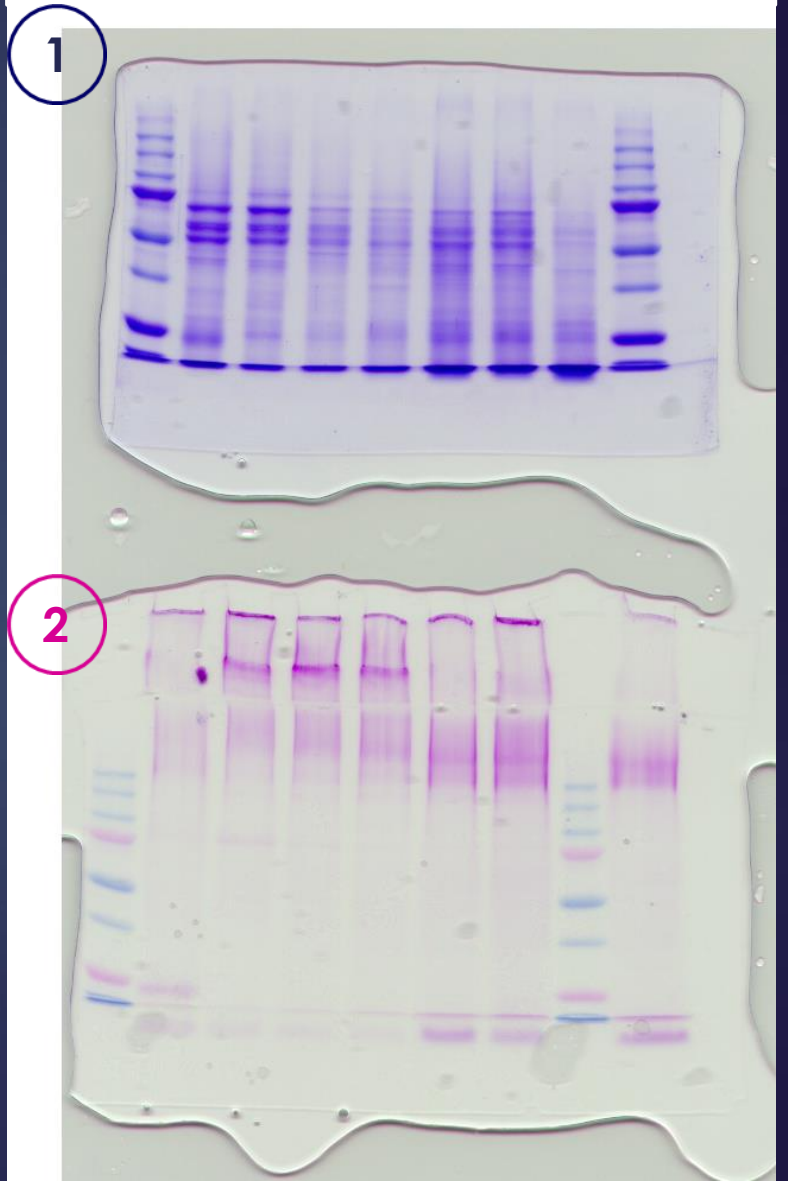
- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF) -

Ciclos espontáneos: Muestras autoextraídas.

Las mismas muestras (*) han migrado en dos geles al mismo tiempo, las hemos colocado en los pocillos según el orden de los días del ciclo: **1.-** gel teñido con Coomasie; **2.-** gel teñido con Schiff.

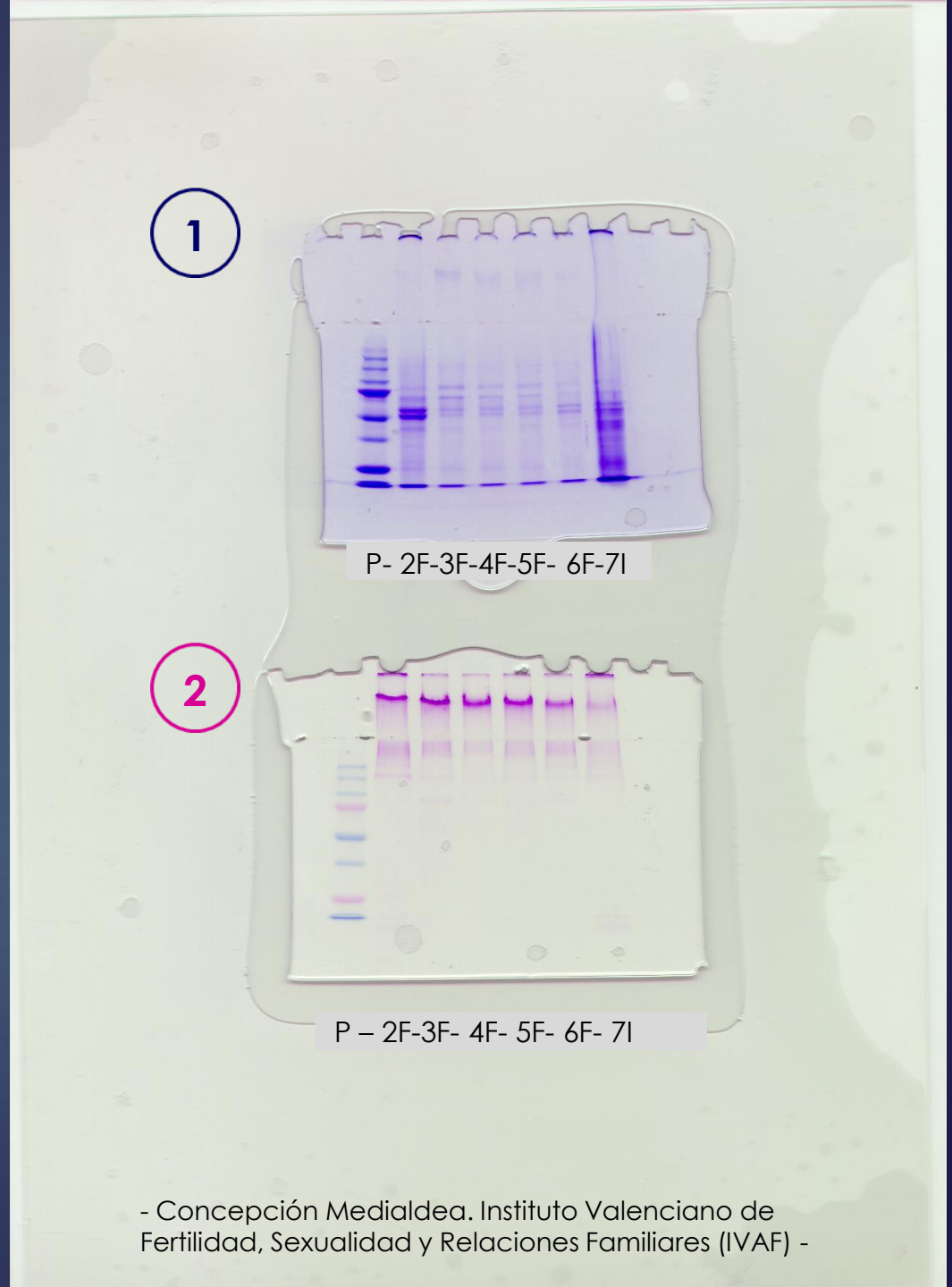


- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF -



Ciclos inducidos Muestras obtenidas ciclos de FIV o IA (HCU):

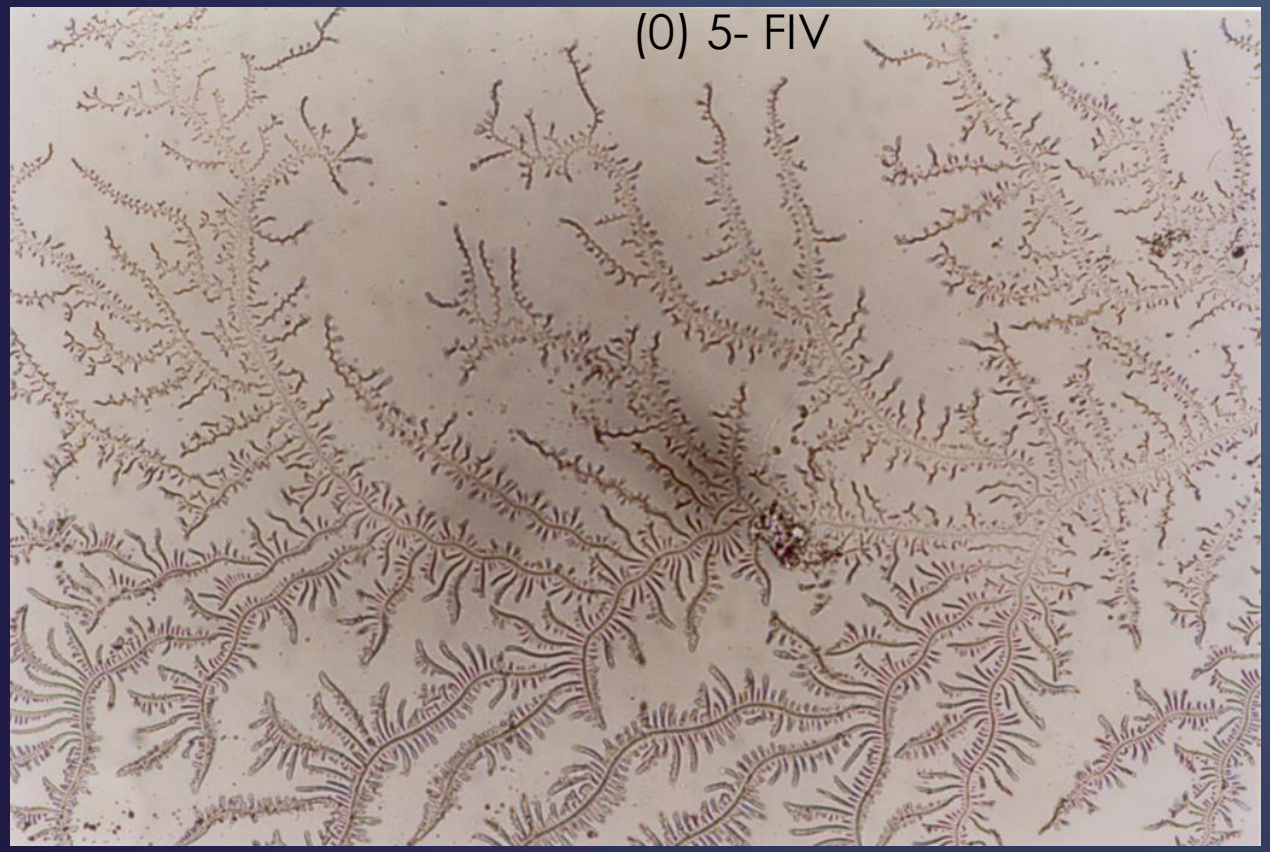
Se ha tomado cada muestra el día que la paciente acudía para pautar la HCG



- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF) -

Transformación de la cristalización desde un tipo de moco cervical hacia otro

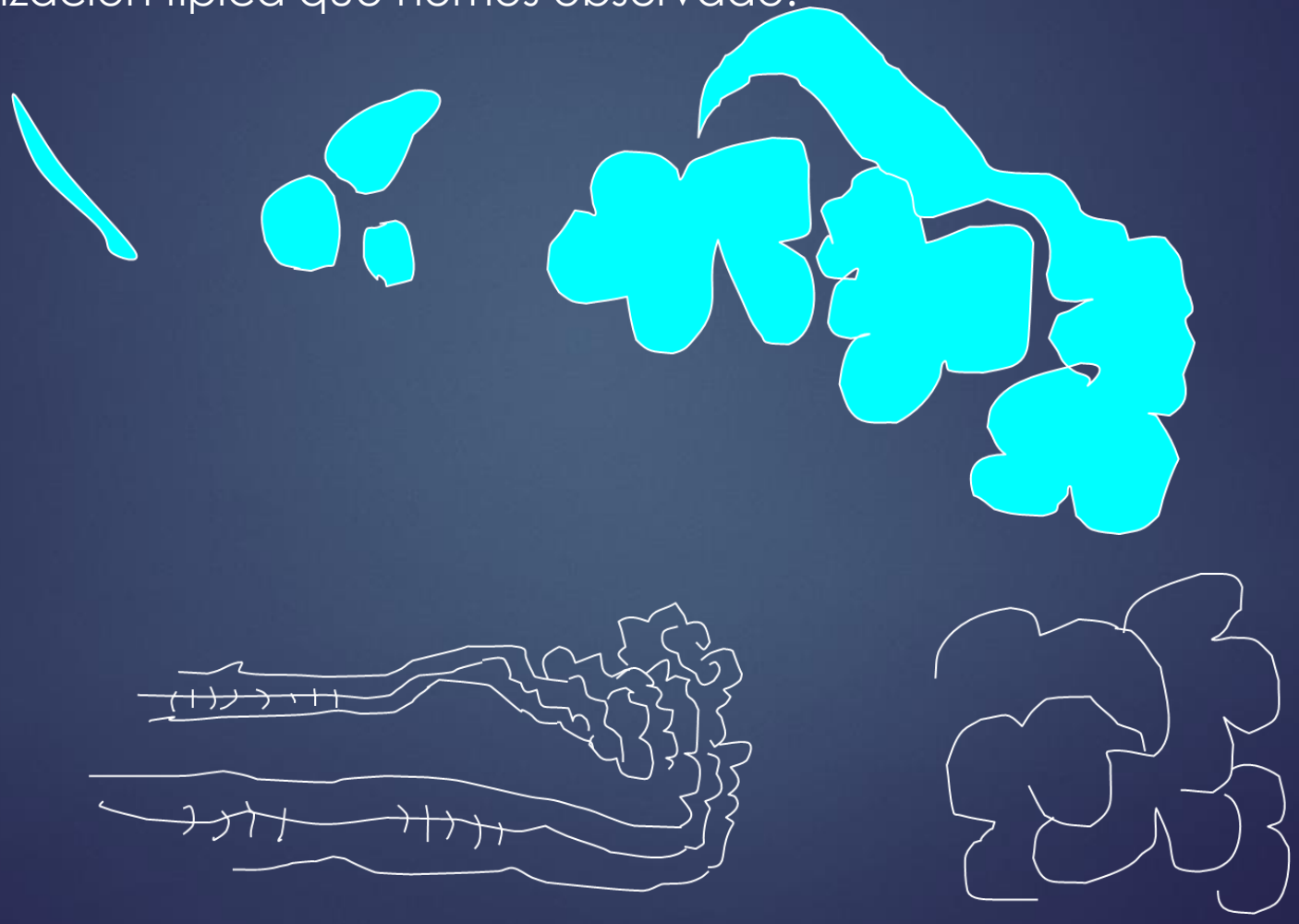
Evolución de la cristalización típica que hemos observado:



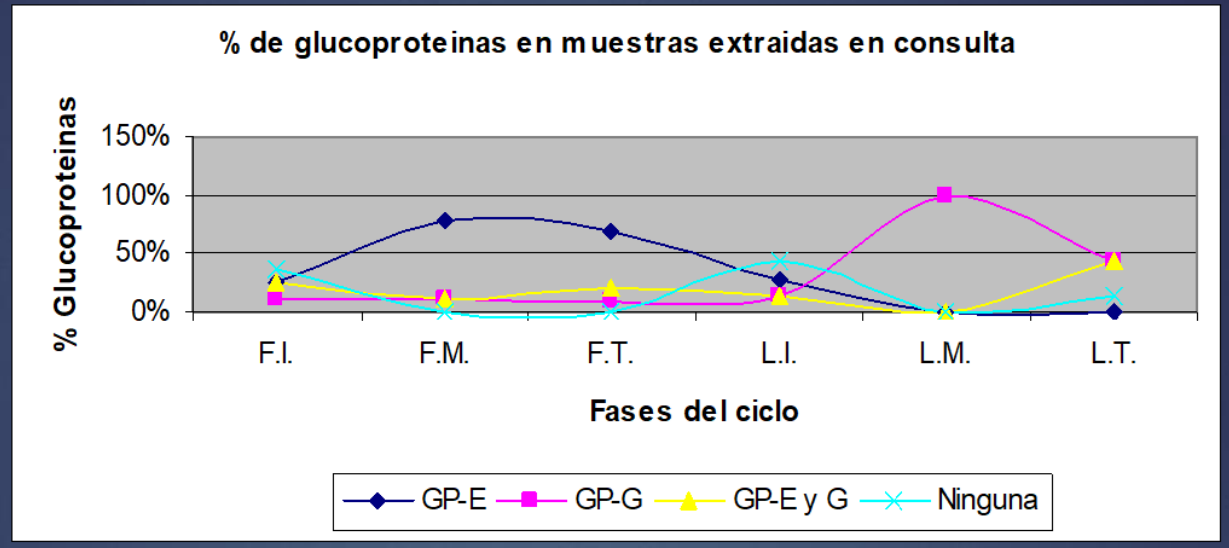
- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF)

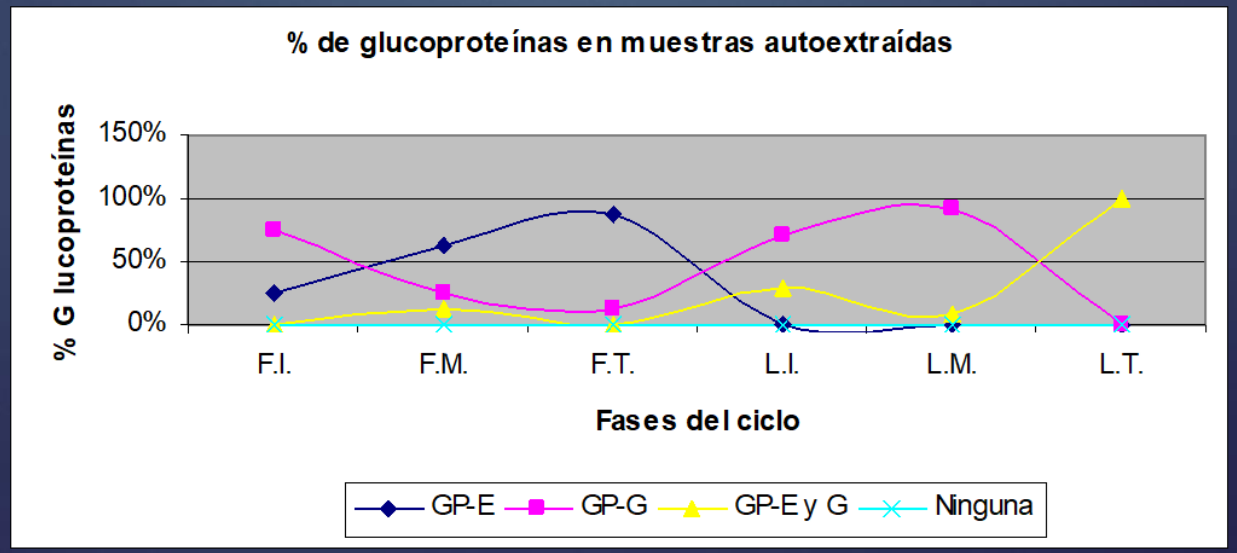
Transformación de la canalización desde un tipo de moco cervical hacia otro

Evolución de la canalización típica que hemos observado:



Comparación de la tendencia de aparición de la GPE Y GPG





Concepción Medialdea Fernández. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF) -

DISCUSIÓN

- En muestras de tiempo pre y periovulatorio es típica la lisis. En la parte de la muestra de hidrogel cervical que ha secado bajo cubreobjetos, la lisis se muestra como «transparentación/borrado de líneas o expículas». En la parte de la muestra que ha secado al aire, la lisis aparece como «cristalitos rotos/sueltos».

- Tras SDS-PAGE y teñido con reactivo de Schiff hemos descubierto la glucoproteína E que aparece cuando hay predominio estrogénico; Y la glucoproteína G que se muestra con predominio gestagénico. Tras SDS-PAGE y tinción con Coomasie hemos observado la presencia y evolución en el ciclo de 4 proteínas significativas: A (70KD), B(60KD), C(50KD) y D(15KD). Hay que seguir investigando hasta conocer la composición del segmento glucosilado y del péptido desnudo de estas dos glucoproteínas. Y la de las proteínas disueltas en el agua que contienen ambas.

- Solo hemos observado dos glucoproteínas: E y G. Y ello nos lleva a pensar que la glucoproteína G se correspondería con el moco G descrito por Odeblad y confirmado por Menárguez a nivel biofísico, la cual contendría más enlaces y sería por ello más estable. Mientras que la glucoproteína E tendría menos enlaces, más posibilidad de transformación dando lugar a tres configuraciones básicas posibles que se corresponderían con los hidrogeles L, S y P previamente descritos. La transformación en las distintas configuraciones se facilitaría, tal vez, por efecto de la lisis presente en tiempo pre y periovulatorio y por una mayor o menor afinidad por algunas proteínas solubles. Pero hay que seguir investigando para saber, definitivamente, si es así o no.

- Concepción Medialdea. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF) -

DISCUSIÓN

- Hemos observado, al microscopio óptico, en moco secado al aire procedente de ciclos inducidos, moco L unido a moco Pt como si se acabase de transformar variando su configuración, esto parece apuntar hacia nuestra hipótesis. En muestras de ciclos espontáneos se puede, a veces, intuir, pero no lo hemos observado con tanta claridad hasta ahora.

- Odeblad decía que conviene hablar de unidades secretoras en el cervix mejor que de criptas, porque, a veces, en una misma cripta había observado más de un tipo de moco, y esto también sugiere que podrían sintetizarse juntas dos configuraciones, necesitando una de la otra.

- Algunos días que, según solo la observación del moco cervical, la TCB, o ambos, anotados por la paciente, son de posible fertilidad, sin embargo el estudio del grado de canalización (en 5 grados, Medialdea 2004) indica grado de fertilidad I o II, y por tanto infertilidad. Y algunos días que tras aplicar las normas del MMTDC/MSTDC aún no ha comenzado el tiempo infértil posovulatorio, sin embargo aparece ya nítida, tras electroforesis, la glucoproteína G, lo que lleva a pensar que, en una paciente concreta, hay días infértiles que aún no detectamos y hay que seguir investigando para poder reconocerlos.
- Conocer bien la parte glúcídica y la proteica de las glucoproteínas podría ayudar a detectar y curar anomalías que son causa de infertilidad, conviene pues seguir con esta investigación.

En Homenaje a Erik Odeblad

Abril 2022

MUCHAS GRACIAS

- Concepción Medialdea Fernández. Instituto Valenciano de Fertilidad, Sexualidad y Relaciones Familiares (IVAF): cursos@ivaf.org -