

COMPARACIÓN DE TRES TÉCNICAS EN LA PREPARACIÓN DE NUESTRAS PARA LA CRISTALIZACIÓN DEL FLUJO CÉRVICO EN BOVINOS LECHEROS

Comparison of three techniques in the preparation of samples for the crystallization of cervical flow in lactating dairy cattle

J. Reátegui^{1,4}, S. Herrera^{1,4}, J. Boluarte², F. Fernández^{1,4}, V. Pacheco, S. Bernardi^{3,4}

¹ Universidad Católica de Santa María.

Vicerrectorado de Investigación.
Laboratorio de Biotecnología Animal.

² Practica Privada.

³ Laboratorio de Histología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario.

⁴ Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEP). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

* Autor correspondiente:
Juan Reátegui, Universidad Católica de Santa María.

E-mail address:
jreategui@ucsm.edu.pe

Recibido: 11/07/2017
Evaluado: 16/08/2017
Aceptado: 26/08/2017

RESUMEN

El objetivo fue comparar tres técnicas de preparación de muestras para cristalización del flujo cervical (Impronta por presión, impronta por contacto y frotis), analizando las formas arbóreas (cristalización) como caracterización del flujo cérvico vaginal de bovinos lecheros, según el día de colección y el momento del ciclo estral. Se muestrearon 10 vacas lecheras de la raza Holstein Friesian multíparas, clínicamente sanas y entre 30 a 50 días post parto. A cada una de ellas se le recolectó el flujo cérvico vaginal utilizando una pipeta descartable y una jeringa de 50 cc. Las dos improntas y el frotis fueron preparadas sobre laminas porta objetos, con protocolo de dos pasos según la metodología de Prado et al. (2012). Preparada las muestras se dejó secar a medio ambiente y se realizó la lectura al microscopio con objetivo de mayor aumento (40X) para observar la formación de los cristales, estos procedimientos se realizaron en 4 diferentes momentos del ciclo estral (0, 7, 14, 21 días). Para cuantificar la cristalización se utilizó una escala entre 0 a 4, la cual varía dependiendo de la formación de cristales típicos a menos formación o ausencia. En el día 0, 7, 14, 21, el nivel de cristalización en las tres técnicas tenía diferencia significativa ($P < 0,05$). En el día 0, el 50% de las muestras procesadas por la impronta por contacto e impronta por presión presentaron formación típica frente al 20% que fueron procesadas por la técnica de frotis. En el día 7, el 80% de las muestras procesadas por impronta por contacto, 90% de la técnica de frotis y 70% de la impronta por presión, presentan cristales atípicos. En el día 14, el 60% de las muestras procesadas por la impronta por contacto y 30% y 40% de las muestras procesadas por la técnica de frotis y la impronta por presión, respectivamente, mostraron n formación atípica de cristales. En el día 21, el 40% de las muestras procesadas por la impronta por contacto y 10% de las muestras procesadas por la técnica de frotis y la impronta por presión, presentaron formación típica de cristales. Se concluye que las técnicas de preparación de muestras influyen en la cuantificación de cristalización de mucus cervical, siendo los más recomendables, la impronta por contacto e impronta por presión.

Palabras clave: Moco cervical, flujo cervical, vacas lecheras, cristalización

ABSTRACT

The objective was to compare three techniques of sample preparation for cervical flow crystallization (pressure imprint, touch imprint and smear), analyzing the tree forms (crystallization) as a characterization of the cervical flow of dairy cattle, according to the day of collection and moment of the estrous cycle. Ten clinically healthy, multiparous Holstein Friesian dairy cows were sampled and 30 to 50 days postpartum. Each was collected from the vaginal cervix using a disposable pipette and a 50cc syringe. The two imprints and the smear were prepared on slides, with two-step protocol according to the methodology of Prado et al. (2012). The samples were then allowed to dry in the environment and the microscope was read with a higher magnification objective (40X) to observe the formation of the crystals, these procedures were performed in 4 different moments of the estrous cycle (0, 7, 14, 21 days). To quantify the crystallization, a scale from 0 to 4 was used, which varies depending on the formation of typical crystals at least formation or absence. At day 0, 7, 14, 21, the crystallization level in the three techniques had significant difference ($P < 0.05$). At day 0, 50% of the samples processed by the touch imprint and pressure

imprint showed typical formation compared to 20% that were processed by the smear technique. On day 7, 80% of the samples processed by touch imprint, 90% of the smear technique and 70% of the pressure imprint, present atypical crystals. On day 14, 60% of the samples processed by the contact imprint and 30% and 40% of the samples processed by the smear technique and pressure imprint, respectively, showed atypical crystal formation. On day 21, 40% of the samples processed by the touch imprint and 10% of the samples processed by the smear technique and pressure imprint showed typical crystal formation. It is concluded that the techniques of preparation of samples influence the crystallization of cervical mucus, being the most recommended, the touch imprint and pressure imprint.

Keywords: Cervical mucus, cervical flow, dairy cows, crystallization

INTRODUCCION

El moco cervical puede ser definido como sustancia pegajosa, medianamente viscosa, translúcida u opaca producida por el cérvix (Cortés *et al.*, 2014). Además, Tsiligianni *et al.* (2011) sostiene que un hidrogel y está compuesto por dos fases, la fase acuosa y la fase gel. En la Fase acuosa el moco cervical está formado mayoritariamente por agua, de un 90 a 99%, el porcentaje más alto se da cuando existe en un periodo periovulatorio. La Fase gel, también denominada fase solida o insoluble, está compuesta por glicoproteínas, biomoléculas de alta masa molecular. Se ha planteado que las glicoproteínas son las que otorga las propiedades estructurales y biofísicas características del moco, estas glicoproteínas se denominan mucinas (Gipson *et al.*, 2005).

Las principales funciones del moco cervical son: Proteger el tracto reproductivo gracias a la mantención de un medio húmedo y lubricado, manteniendo las superficies epiteliales lubricadas (Rutllant *et al.*, 2005). Participar en el transporte espermático en su ascenso hacia el lugar de la fecundación. Además, el moco cervical actúa como un obstáculo selectivo permitiendo el paso de los espermatozoides a través del tracto reproductivo (Barros, *et al.*, 1984). Modular la reacción acrosómica o exocitosis acrosomal, en la cual se da el cambio morfológico y ultraestructural complejo que experimentan los espermatozoides adquiriendo la capacidad de fecundar al ovulo (Del Rio *et al.*, 2007). La habilidad que tiene el moco cervical de permitir a los espermatozoides penetrar en él se menciona como receptividad y se han desarrollado técnicas al respecto para medir la motilidad de los espermatozoides en un período de tiempo específico (OMS, 1987, Akhtar *et al.*, 1980). Asimismo, es considerada como una barrera inmunitaria que inhibe el ascenso y la colonización de los microorganismos (Vickery *et al.*, 1978).

El moco cervical posee propiedades biofísicas de mucha importancia, sus características varían en el transcurso del ciclo ovárico, debido a una respuesta neuro-hormonal cíclica que experimentan las criptas del cérvix (Menarguez *et al.*, 1998). Entre las propiedades biofísicas tenemos la Viscosidad, Elasticidad, Filancia y Cristalización (Vigil *et al.*, 1989).

La cristalización del moco cérvico vaginal se refiere al fenómeno por el cual se produce un cambio físico que es la desecación en donde el soluto de la solución se tiende a solidificar decantándose y formando unidades cristalinas que se agregan unas a otras. Se reconocen varios patrones de cristalización del moco cervical los cuales se presentan principalmente en el periodo periovulatorio. Entre la diversidad de las formas podemos encontrar estructuras arborescentes, formas estrelladas con ejes bien definidos y otras con apariencia de filamentos simétricos y con un alto grado de ramificación paralela o perpendicular. El estudio de la cristalización del moco cervical ha podido clasificarlos en dos, moco strogénico y moco progestativo (Tsiligianni *et al.*, 2000), podemos decir que los estrógenos inducen a la formación de cristales, mientras que la progesterona reduce la incidencia de su formación (Tsiligianni *et al.*, 2000).

El objetivo general del presente trabajo fue comparar las tres técnicas de preparación de muestras para la observación de la cristalización del flujo cérvico vaginal. Como objetivo específico evaluar la cristalización del flujo cervical según el día de colección y momento del ciclo estral, analizando y comparando las formas arbóreas como caracterización del moco cervical en bovinos lecheros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron diez vacas de la raza Holstein Friesian multíparas, clínicamente sanas y entre 30 a 50 días post parto. Las muestras de moco cervical se obtuvieron de acuerdo con el protocolo establecido por Prado *et al.* (2012), procediéndose de la siguiente manera: en cada ejemplar seleccionado se procedió primeramente al lavado de la zona perineal con agua y desinfectante (yodo povidona). Las muestras de flujo cervical fueron obtenidas por pipeteo transcervical cada siete días (0, 7, 14, 21 días) a partir del día de celo franco.

Con el moco recolectado se procedió a preparar de tres diferentes formas, dos improntas y un frotis.

(G1) Impronta por presión: Se colocó el flujo colectado entre dos portaobjetos presionando fuertemente.

(G2) Impronta por contacto: Se dejó caer la gota (0,05 cc aprox.) del flujo sobre el portaobjetos y una vez que contactaron ambos se procedió a esparcirlo, esto se realizó varias veces sobre el mismo portaobjetos.

(G3) Frotis: Se colocó una gota (0,05 cc aproximadamente) de moco sobre una esquina del portaobjetos y se extendió la misma con otro portaobjeto en un ángulo de 45° hasta obtener una lámina fina.

Una vez realizada la técnica de impronta o frotis se procedió a dejar secar los portaobjetos al medio ambiente por un tiempo aproximado de 15 minutos. Se observó al microscopio óptico en diferentes aumentos 4X, 10X, 40X la formación de cristalización.

Se procedió a utilizar dos métodos de calificación para evaluar la cristalización del flujo cervical. El primero fue propuesto por Abusineina *et al.* (1962) y Tsiligianni *et al.* (2000). El cual consiste en dividir a los patrones de cristalización en tres tipos. Tipo A: Corresponde a un moco traslucido, celular, elástico y fácil de obtener del cérvix, bajo la luz del microscopio la cristalización es característica por presentar cristales con un largo tallo el cual es el eje principal que puede ser lineal o curvado de los cuales salen nervaduras de una longitud variable y estas poseen pequeñas subnervaduras, este moco está asociado a la ovulación. Tipo B: Corresponde a un moco semi traslucido, elástico y fácil de obtener del cérvix, que bajo la luz del microscopio se observa que presentan forma cercana a un helecho, su nervaduras y subnervaduras son bien definidas. Tipo C: Corresponde a un moco opaco con evidente contenido celular y con una gran dificultad de obtener del cérvix, estos presentan

crisales irregulares y las formas de helechos son atípicas, el eje central puede tener o no nervaduras.

Un segundo método fue propuesto por Bishnoi *et al.* (1982) y Tsiligianni *et al.* (2000) valorando la formación de crisales. Utilizando una escala arbitraria de 0-4. Grado 0: Corresponde a la ausencia de formaciones de crisales. Grado 1: Corresponde solamente a la formación de crisales atípicos. Grado 2: cuando hay alguna pequeña presencia de crisales en forma de helecho. Grado 3: Corresponde a formaciones de crisales típicos en forma de helecho con una pequeña presencia de crisales atípicos. Grado 4: Es cuando los patrones vistos muestran solamente formas de helecho típicas.

Los resultados se analizaron mediante la prueba de Friedman la cual es la alternativa no paramétrica equivalente al ANOVA para medidas repetidas en su versión no paramétrica. El método consiste en ordenar los datos por filas o bloques, reemplazándolos por su respectivo orden por ser muestras relacionadas. Al ordenarlos, debemos considerar la existencia de datos idénticos. Además, se realizó la prueba de Chi Cuadrado para resultados no paramétricos. El procesamiento de la información se realizó con el software estadístico SPSS versión 22. Se trabajó con una significancia del 5%, ($P > 0,05$),

RESULTADOS

En el día 0, 7, 14, 21, de obtenido el flujo cervical, el nivel de cristalización en las tres técnicas de preparación tenían diferencia significativa ($P < 0,05$). En el día 0, el 50% de las muestras procesadas por la impronta por contacto e impronta por presión presentaron formación típica frente al 20% que fueron procesadas por la técnica de frotis (ver figura 1A, 1B, 1C). En el día 7, el 80% de las muestras procesadas por impronta por contacto, 90% de la técnica de frotis y 70% de la impronta por presión, presentan crisales atípicos. En el día 14, el 60% de las muestras procesadas por la impronta por contacto y 30% y 40% de las muestras procesadas por la técnica de frotis y la impronta por presión, respectivamente, mostraron n formación atípica de crisales. En el día 21, el 40% de las muestras procesadas por la impronta por contacto y 10% de las muestras procesadas por la técnica de frotis y la impronta por presión, presentaron formación típica de crisales.

DISCUSION

Los resultados de cristalización de este trabajo son similares a los valores y características reportadas por Cortés (2012); Cortés *et al.* (2014) y Tsiligianni *et al.* (2011) quienes mencionan que la cristalización del flujo cervical es el resultado de la presencia de estrógenos en el torrente sanguíneo, los cuales afectan las células secretoras de mucina del cérvix uterino y son netamente responsables de la producción de moco. Un alto nivel de estrógeno es directamente proporcional a un alto porcentaje de crisales típicos. Lo que coincide fisiológicamente con el momento del ciclo estral en el muestreo inicial y del día 21 de nuestra investigación.

Hay una relación bien establecida durante el estro con los niveles de esteroides ováricos los cuales inducen al cambio biofísico en el moco cervical, esta es una característica que facilita el paso de los espermatozoides para poder llegar a la unión útero tubárica, capacitarse y fertilizar (Cortés, 2012; Cortés *et al.*, 2014; Tsiligianni *et al.*, 2011). Los autores mencionados indican que los estrógenos son responsables de una mayor secreción de moco cervical, lo que se produce por el alza

de estrógenos a mediados de la fase folicular logrando un aumento de la secreción cervical llamada moco estrogénico, que es un moco acuoso, transparente, filante, cristalino y tiende a tener formaciones geométricas características con mayor porcentaje de crisales típicos que son las formas geométricas parecidas a hojas de helecho (Cortés *et al.*, 2014; Tsiligianni *et al.*, 2011).

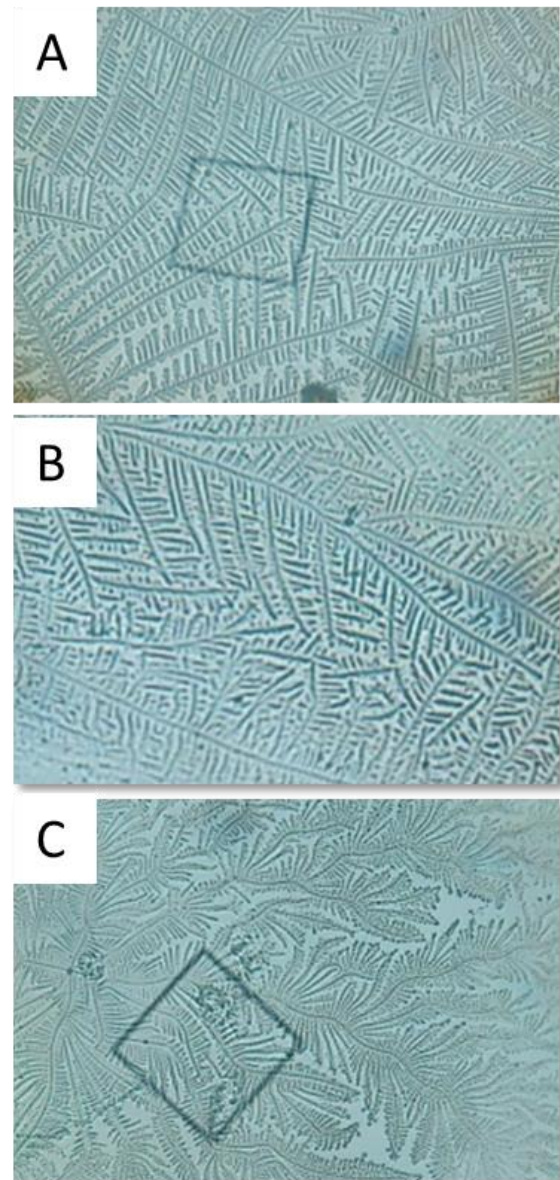


Figura 1: Cristalización del flujo cervical bovino. (A) En el día 0 se puede observar los crisales típicos por la acción de los estrógenos, en esta imagen el resultado final de lo que es la Impronta por Contacto. (B). En el día 0 se puede observar los crisales típicos por la acción de los estrógenos, en esta imagen podemos observar el resultado final de la Técnica por Frotis. (C) En el día 21 se puede observar los crisales típicos por la acción de los estrógenos, en esta imagen podemos observar el resultado final de lo que es la Impronta por Presión.

Benbia *et al.* (2011) reportaron que existe una relación entre la actividad enzimática y el moco cervical, todo esto regido por la hormona predominante, llegando a la conclusión que es importante tener en cuenta la medición de la hormona predominante para poder aplicar el momento adecuado de la biotecnología reproductiva, lo que nos permite indicar que se deben continuar con estudios que relacionen la cristalización del moco cervical con los niveles de hormonas circulantes en cada etapa del ciclo estral.

CONCLUSIONES

En la comparación de las tres metodologías podemos concluir que las dos técnicas de presión (Impronta por Contacto y la Impronta por Presión) tienen mejor resultados para la visualización de los cristales, ya que la presión que se ejerce en el moco es menor que la ejercida en la Técnica de Frotis lo cual repercute directamente en la formación de los cristales.

CÓDIGO DE ÉTICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: JR, JB
 Desarrollo de la metodología: JB, JR
 Concepción y diseño: JR, SH
 Edición del artículo: SH, VP
 Supervisión del estudio: FF, SB

REFERENCIAS

- Abusineina ME. A study of the fern-like crystalline patterns of the cervical and vaginal mucus of cattle. 1962; (74):619-621.
- Akhtar H, Singh B, Sinha R. Studies on migration rate of spermatozoa in bovine cervical mucus. Indian. Vet. J. 1980; (57):386-90.
- Barros C, Vigil P, Herrera E, Argüello B, Walker R. Selection of morphologically abnormal sperm by human cervical mucus. Arch. Androl. 1984;(12): 95- 107
- Benbia S, Kalla A, Yahia M, Belhadi K and Zidani A. World Academy of Science, Engineering and Technology, Vol: 5 2011-11-20.
- Bishnoi B, Vyas K, Dwaraknath P. Note on spinnbarkeit and crystallization pattern of bovine cervical mucus during oestrus. Indian. J. Anim. Sci. 1982; 52(6):438-40.
- Cortés ME. Morphological and ultrastructural characterization of different types of bovine cervical mucus using light and scanning electron microscopy [tesis doctoral]. [Santiago de Chile]: Pontificia Universidad Católica de Chile; 2012.
- Cortés M, Gonzales F, Vigil P. Crystallization of Bovine Cervical Mucus at Oestrus: An Update. Rev. Med. Vet.; 2014; 28(1): 103-116
- Del Rio MJ, Godoy A, Toro A, Orellana R, Cortés ME, Moreno RD, Vigil P. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. Rev Int Androl 2007; 5(4):368
- Gipson IK. Human endocervical mucins., Ernst. Schering. Res. Found. Workshop. 2005 ;(6): 1245–1255.
- Menarguez M, Pastor L, Odeblad E. Morphological characterization of different human cervical mucus types using light and scanning electron microscopy. Hum Reprod. 2003; 18: 1782-9.
- Prado A, Bernardi S, Bassi A, Marini P. Estudio de la Cristalización del Flujo Cérvico Vaginal en Hembras Holando Argentino. 2012, Vet. Arg. – Vol. XXIX - N° 286
- Rutlant J, López- Béjar M, López- Gatus F. Ultrastructural and rheological properties of bovine vaginal fluids and its relation to sperm motility and fertilization: A review. Reprod Dom Anim 2005; 40 (2):79.
- Tsiligianni Th, Karagiannidis A, Brikas P, Saratsis P. Relationship between certain physical properties of cervical mucus and fertility in cows. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. 2000;(107):28-31
- Tsiligianni Th, Amiridis G, Dovolou E, Menegatos I, Chadio S, Rizos D, Gutierrez–Adan A. Association between physical properties of cervical mucus and ovulation rate in superovulated cows.,Can.J. Vet. Res. 2011;(75):248-253.
- Vickery BH y Bennett J P. The cervix and its secretion in mammals. 1978. Physiol Rev. 48: 135-54
- Vigil P, Valdez E. Bases científicas de la planificación natural de la familia. Actual Ginecol Obstet. 1989; 3(2):59