



Universitat Autònoma de Barcelona

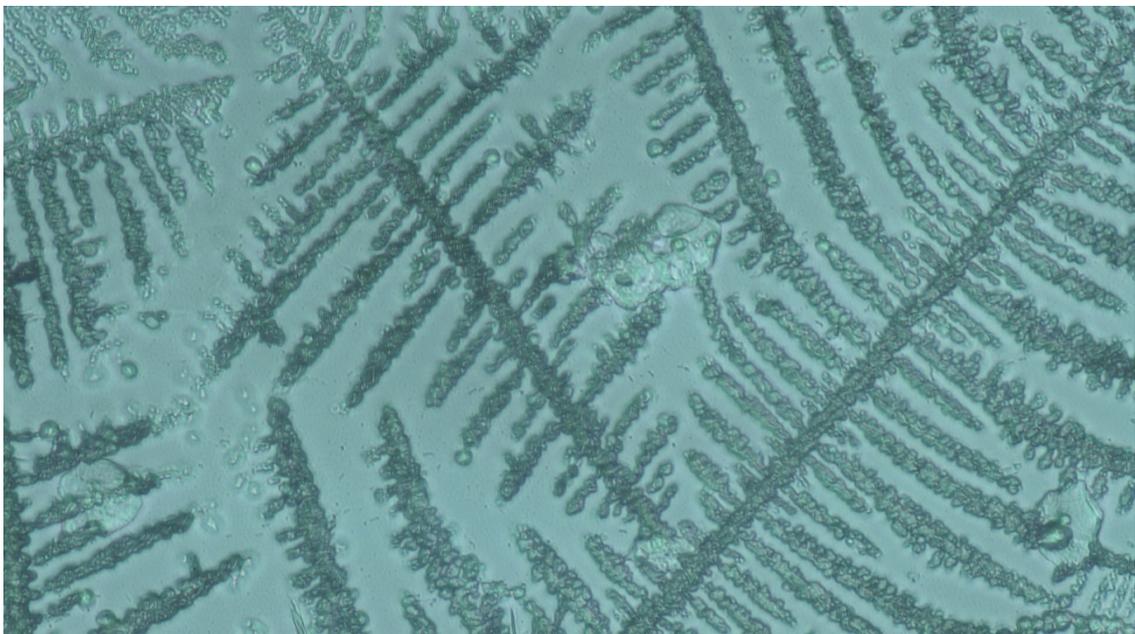
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis doctoral

LAS ENZIMAS CERVICOVAGINALES COMO PARÁMETROS PREOVULATORIOS



Autor: Yolanda Fernández Hermida

Director: Dr. Rafael Azagra Ledesma

Tutor: Dr. Albert Selva O'Callaghan

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona

2021

Agradecimientos.

Mis más sinceros agradecimientos:

A la Dra. Micaela Menárguez, por su importantísima contribución en el conocimiento del Moco Cervical, por hacerme descubrir la belleza del mismo, por hacerme partícipe de su hipótesis y animarme a hacer mi tesis doctoral sobre este tema. Por ser un referente, no sólo en el ámbito profesional, sino también en el personal.

Al Dr Rafael Azagra Ledesma, de la Universidad Autónoma de Barcelona, por la dedicación, apoyo y guía en el desarrollo del estudio, por su paciencia y por sus valiosos consejos. Ha sido un verdadero honor tenerlo como director de tesis y conocer no sólo su extraordinaria valía profesional y experiencia científica, sino su gran calidad humana.

Al Dr. Giuseppe Grande, de la Fundación Instituto Científico Internacional "Pablo VI", Policlínico Universitario Agostino Gemelli, por el interés que ha demostrado desde el principio por esta investigación, por la inestimable ayuda con el análisis proteómico de las muestras, el tratamiento e interpretación de los resultados.

A la Dra. Helvia Temprano, del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Teresa Herrera de A Coruña, que me acogió en La Coruña, por transmitirme con enorme generosidad sus conocimientos sobre la identificación y clasificación de las muestras, por las horas compartidas frente al microscopio óptico y por su gran ayuda en la realización de las fotografías.

A la Dra. Montserrat Rutllant, por confiar en mí, por su apoyo y por su generosa ayuda.

Al Dr. Jokin de Irala, por transmitirme con enorme generosidad sus avances sobre esta investigación y por insistir en que acabase la tesis.

A Esperanza Coll y Nuria Recto por su ayuda, y su sincero interés en esta investigación.

A las voluntarias, por su entusiasmo al colaborar en el estudio, su paciencia y su siempre buena y generosa predisposición.

Al Dr. Jose Luis Poza, Jefe Clínico de Ginecología del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona, por su inestimable ayuda en la obtención de las muestras, por su generosidad y paciencia.

A la Dra. Isabel Montserrat Lloan, del Servicio de Hematología Clínica del Hospital Universitari Vall d'Hebron, por su apoyo y por la gran ayuda en la observación de las muestras.

A las Dras. Antonia Andreu y Lidia Goterris del Servicio de Microbiología de Valle Hebron por su generosa ayuda y valiosa colaboración con el tratamiento y almacenaje de las muestras.

A los doctores Pedro Dosil y Victor de la Fuente, a la Dra. María Goya, a la Dra. Teresa Hermida, del complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, a Juanjo, Elena Marcet y Fátima Jimenez del Instituto de Investigación Valle Hebron VIHR, por su valiosa ayuda.

A las diferentes instituciones que han participado en la investigación: la Facultad de Medicina de la UAB, el Hospital Universitario Valle Hebron de Barcelona, el Hospital Policlínico Universitario Agostino Gemelli de Roma, el Hospital Universitario Teresa Herrera de A Coruña.

Al Profesor Erik Odeblad, por su extraordinaria contribución al conocimiento del Moco Cervical durante los últimos 50 años.

A mis Padres, por su ayuda en el transporte de las muestras con hielo seco, por su ejemplo de vida, por su apoyo incondicional y por quererme siempre tanto.

A mi marido y a mis hijos por su ayuda en la búsqueda de voluntarias, y por todo su cariño.

A mis amigos, especialmente a Daniel, por su ayuda en la obtención de los resultados, por ser una pieza clave en la finalización de este proyecto y por su buena predisposición para ayudarme siempre.

A todos, muchísimas gracias.

Abreviaturas relevantes por orden alfabético.

AUC. Area bajo la curva

FCV. Fluido cervicouterino-vaginal

GO. Ontología Génica

HPLC. Cromatografía de líquidos de alto rendimiento

kDA. Kilodalton

LC. Cromatografía de líquidos

MALDI. Desorción/ionización láser asistida por matriz

MC. Moco cervical

MCP. Tapón de Moco Cervical

MDa. Mega Dalton

MS. Espectrometría de Masas

MUC5B. Mucina 5B

PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida

SDS. Dodecilsulfato sódico

TOF. Tiempo de vuelo

µm. Micra

2D. 2 Dimensiones

Sumario

RESUMEN ESTRUCTURADO	10
STRUCTURED SUMMARY.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. Interés por determinar fertilidad.....	17
1.2. Ciclo Menstrual y Ventana de Fertilidad	18
1.3 Moco Cervical: Introducción	19
1.4 Moco Cervical: Propiedades físico-químicas	19
1.4.1 Biofísica del Moco Cervical.....	20
1.4.2 Bioquímica del Moco Cervical.....	24
1.5 Moco Cervical: Funciones	25
1.6 Moco Cervical y fertilidad	26
1.7 Lisozima.....	27
1.7.1 Factores que afectan la actividad de la lisozima	28
1.8 Cambios en las propiedades antimicrobianas del Moco Cervical a lo largo del ciclo	29
1.9 Proteómica	30
1.10 Proteómica del Moco Cervical en mujeres fértiles	31
2. JUSTIFICACIÓN	36
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVOS	41
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
5.1 Muestra.....	44
5.2 Metodología de obtención de las muestras	45
5.3 Preparación de las muestras.....	45
5.3.1 Desecado al aire.....	46
5.3.2 Proteómica	46

5.4 Análisis de las muestras.....	46
5.4.1 Microscopías Óptico	46
5.4.1.1 Observación de las muestras.....	46
5.4.1.2 Clasificación de las muestras.....	47
5.4.2 Proteómica	48
5.5 Consideraciones éticas.....	52
6. RESULTADOS	53
6.1 Identificación y descripción de los tipos de Moco Cervical procedentes de la luz del canal cervical desecados al aire.....	54
6.1.1 Identificación de Moco L	54
6.1.2 Identificación de Moco S.....	55
6.1.3 Identificación de Moco P	56
6.1.4 Identificación de Moco G	57
6.1.5 Clasificación de las muestras según la fase del ciclo.....	59
6.1.6 Identificación de secreción Z.....	61
6.2 Análisis proteómico	62
6.2.1 Relación de proteínas.....	62
6.2.2 Identificación de Proteínas Pico y procesos en los que participan	65
6.2.3 Evolución de las Proteínas Pico.....	66
6.2.4 Análisis de las proteínas más abundantes.....	69
6.2.5 Análisis bioinformático de las funciones.....	71
6.2.6 Cambios en las clases de proteínas	74
6.2.7 Variabilidad en la abundancia de proteínas	75
6.2.7.1 Lisozima	75
6.2.7.2 Resto de proteínas.....	76
6.2.7.3 Secreción Z.....	79
7. DISCUSIÓN.....	82
8. CONCLUSIONES.....	94
9. LÍNEAS DE FUTURO.....	96

10. BIBLIOGRAFÍA.....	98
------------------------------	-----------

RESUMEN ESTRUCTURADO

RESUMEN ESTRUCTURADO.

Motivo.

En los últimos años, se ha producido un notable incremento del interés de las mujeres y de las parejas en la identificación de la ventana fértil con el propósito de concebir.

La determinación de un parámetro bioquímico preovulatorio que permita identificar de forma precisa y anticipada el momento en el que se produce la ovulación, posibilitaría la identificación de la ventana de fertilidad combinada de un modo más preciso.

Hipótesis de trabajo.

La enzima lisozima, un agente perteneciente a la inmunidad general del organismo, junto a otros enzimas que están presentes en el Moco Cervical (MC), se comportan como parámetros bioquímicos preovulatorios que pueden identificar de forma precisa y anticipada el momento en el que se produce la ovulación.

Objetivos.

Objetivo Principal

- Analizar las variaciones de la enzima lisozima en MC durante los primeros días del ciclo menstrual.

Objetivos Secundarios

- (1) Analizar las variaciones de las proteínas presentes en el MC durante los primeros días del ciclo menstrual.
- (2) Identificar posibles biomarcadores de la ovulación.
- (3) Detectar la presencia de células precursoras de Z en las muestras de MC observadas al microscopio óptico y analizar posibles diferencias en la composición proteica de las muestras en las que está presente.

Material y métodos

Se recogen muestras de MC, procedentes de la luz del canal cervical, de mujeres en edad reproductiva, en tres días diferentes del mismo ciclo.

Las muestras han sido analizadas y clasificadas en primer lugar por microscopía óptica. Posteriormente, se realizó el análisis por espectrometría de masas de alta resolución y el análisis bioinformático para determinar los cambios in vivo de la composición proteica del MC.

Resultados principales.

El MC experimentó cambios cíclicos en su composición biofísica que se evidenciaron con cambios en los patrones cristalográficos observados al microscopio óptico.

Así mismo, el análisis proteómico reveló cambios en la composición proteica del MC durante el ciclo. Las variaciones en la composición proteica de las proteínas del MC en la fase ovulatoria, incluyeron un descenso significativo en la abundancia de inmunoglobulinas y otras proteínas implicadas en la defensa.

El análisis proteómico de las muestras del presente estudio ha permitido la identificación de 48 proteínas. De las cuales 26 serían susceptibles de convertirse en parámetros preovulatorios, en biomarcadores de la ovulación.

El estudio microscópico permitió la identificación de células precursoras Z producidas por las glándulas del istmo uterino.

Conclusiones.

- La enzima lisozima experimentó un descenso significativo en su abundancia en MC durante los primeros días del ciclo menstrual.
- El análisis de las variaciones de la abundancia de las proteínas cervicales durante los primeros días del ciclo menstrual, evidenció un descenso significativo en la abundancia de dieciocho proteínas y un incremento significativo en ocho proteínas.
- La lisozima, un agente perteneciente a la inmunidad general del cuerpo, presente en el MC, podría considerarse, junto con otros, un posible biomarcador de la ovulación.
- Se detecta la presencia de células precursoras de Z en una de las muestras de MC observadas al microscopio óptico. Se identificaron diferencias en la composición de las muestras. En el grupo de las muestras en las que estaban presentes las células precursoras de Z se evidenció la presencia de proteínas cuya abundancia estaba significativamente elevada.

STRUCTURED SUMMARY

STRUCTURED SUMMARY.

Rationale.

In recent years, there has been a notable increase in the interest of women and couples in identifying the fertile window for the purpose of conceiving.

The determination of a pre-ovulatory biochemical parameter that allows the precise and anticipated identification of the moment in which ovulation occurs would allow the identification of the combined fertility window to be more precise.

Hypothesis.

The enzyme lysozyme, an agent belonging to the general immunity of the body, together with other enzymes that are present in the Cervical Mucus (MC), behave as pre-ovulatory biochemical parameters that can identify precisely and in advance the moment in which the ovulation occurs.

Objectives.

Main objective

- Analyze the variations in the abundance of the lysozyme enzyme in MC during the first days of the menstrual cycle.

Secondary Objectives

- (1) Analyze the variations of the proteins present in the MC during the first days of the menstrual cycle.
- (2) Identify possible biomarkers of ovulation.
- (3) Detect the presence of Z precursor cells in MC samples observed under the light microscope and analyze possible differences in the protein composition of the samples in which it is present.

Material and Methods.

MC samples are collected from the lumen of the cervical canal from women of reproductive age, on three different days of the same cycle.

The samples have been analyzed and classified first by light microscopy.

Subsequently, high resolution mass spectrometry analysis and bioinformatic analysis were performed to determine the in vivo changes of MC protein composition.

Main results.

The MC underwent cyclical changes in its biophysical composition that were evidenced by changes in the crystallographic patterns observed under the light microscope.

Additionally, the proteomic analysis revealed changes in the protein composition of MC during the cycle. Variations in the protein composition of MC proteins in the ovulatory phase included a significant decrease in the abundance of immunoglobulins and other proteins involved in defense.

The proteomic analysis of the samples of the present study has allowed the identification of 48 proteins. Of which 26 may be capable of becoming pre-ovulatory parameters, biomarkers of ovulation.

The microscopic study allowed the identification of precursor Z cells produced by the glands of the uterine isthmus.

Conclusions.

- The enzyme lysozyme experienced a significant decrease in its MC's abundance during the first days of the menstrual cycle.

- The analysis of the variations in the abundance of cervical proteins during the first days of the menstrual cycle, showed a significant decrease in the abundance of eighteen proteins and a significant increase in eight proteins.

- Lysozyme, an agent belonging to the general immunity of the body, present in CM, could be considered, along with others, a possible biomarker of ovulation.

- The presence of Z precursor cells is detected in one of the MC samples observed under the light microscope. Differences in the composition of the samples were identified. In the group of samples in which the Z precursor cells were present, the presence of proteins whose abundance was significantly high was evidenced.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Interés por determinar fertilidad.

Desde la Edad Antigua, el hombre siempre ha tenido una gran inquietud por el conocimiento de la fertilidad, por saber cómo nacemos y de dónde venimos. Tanto es así, que desde que se tiene documentación escrita, hay referencia de que las fases de fertilidad e infertilidad están relacionadas, de una forma directa o indirecta con la menstruación.

En el s. XVII se hacen dos descubrimientos fundamentales en el conocimiento de la fertilidad humana; en 1672 Reigner de Graaf descubre el folículo que lleva su nombre. Y en 1677 Antoni van Leeuwenhoek, los espermatozoides. Desde entonces, y durante más de dos siglos, los descubrimientos científicos se suceden con rapidez, siendo uno de los objetos fundamentales de los investigadores encontrar la fecha precisa de la ovulación.

El cuerpo amarillo o cuerpo lúteo se descubrió en 1766, pero no fue hasta 1872 cuando Claude Bernard, padre de la endocrinología, comenzó a relacionar su funcionamiento con la ovulación.

Hasta comienzos del s. XX la ciencia no estuvo en condiciones de empezar a responder a la pregunta de cuándo se producía la ovulación.

Uno de los indicadores de fertilidad que hoy día se utilizan para identificar la misma es el cambio en la temperatura corporal basal, como consecuencia de las propiedades termogénicas de las hormonas que dominan la segunda fase del ciclo ovárico. El primer observador de dichas variaciones fue Van de Velde, quien en 1904 las describe por primera vez y las relaciona con la ovulación.

Fue también a comienzos del s. XX (1900) cuando Fraenkel determinó que la ovulación no se realiza ni antes ni después de la menstruación, sino en el intervalo. Admitía como fecha de la ovulación el día 18 ó 19 a partir del comienzo del ciclo.

En los años veinte del siglo pasado, dos científicos, de países tan alejados como Austria y Japón, llegaban a conclusiones muy parecidas, por métodos de investigación completamente distintos:

- Ogino, en 1924, publicó en Japón los nuevos datos que había obtenido sobre el período fértil y la ovulación, estudiando la misma por medio de operaciones quirúrgicas.
- Knaus, sin conocer estos datos, describió sus observaciones por primera vez en la XXI sesión de la sociedad alemana de Ginecología en mayo de 1929. Había investigado los ovarios con rayos X. Y, aunque por caminos distintos, los dos llegaron a conclusiones similares.

El interés por determinar la fertilidad, también existe entre la población general.

En los Estados Unidos de América, se ha estimado que más de 7 millones de mujeres han buscado tratamiento de fertilidad profesional, y casi 450.000 de esas mujeres buscaron atención médica para obtener consejos sobre temas como la detección de la ventana fértil y optimizar el tiempo de las relaciones sexuales [1,2].

En la actualidad, existen más de 100 aplicaciones para móvil basadas en métodos de conocimiento de la fertilidad con más de 200 millones de descargas [3] que son cada vez más populares para posponer el embarazo [4-7] y para lograr el embarazo [8,9].

1.2 Ciclo menstrual y Ventana de Fertilidad.

El ciclo menstrual empieza con el primer día de la menstruación, y acaba el último día antes de la siguiente menstruación. El ciclo menstrual, atendiendo a su regulación neuroendocrina se divide en 2 fases: La primera fase denominada folicular, proliferativa, preovulatoria o estrogénica y la segunda fase lútea, secretora, posovulatoria o gestagénica. Ambas fases separadas por el fenómeno de la ovulación. La ovulación se produce generalmente una sola vez en cada ciclo. El óvulo muere en 10-24h sino es fecundado [2].

En cada ciclo menstrual hay un periodo limitado de tiempo, durante el cual la mujer puede concebir. Este periodo es conocido como “Ventana de Fertilidad” y comprende los días que preceden a la ovulación y el día de la ovulación, incluido [10-12].

Los estudios realizados, sugieren que la Ventana de Fertilidad, empieza 5-6 días antes de la ovulación y acaba el día de la ovulación [13].

Se estima que la tasa de embarazo alcanza su punto máximo 2 días antes de la ovulación para ser casi nula 2-3 días después de la ovulación [2,10].

Las guías clínicas establecen una duración media del ciclo menstrual de 28 días, no obstante, existe una gran variabilidad en la duración del ciclo entre mujeres y dentro de una misma mujer [14-18]. Un estudio realizado en 612.613 ciclos, reveló que sólo el 13% de los ciclos menstruales fueron de 28 días [19].

En alrededor del 30% de las mujeres, la ventana fértil está completamente dentro de los días del ciclo menstrual identificados por las pautas clínicas, es decir, entre los días 10 y 17 [14]. Así mismo, la variabilidad intraciclos de más de 7 días se observó en el 42,5% de las mujeres [15].

Esta variabilidad en la duración del ciclo, se atribuye principalmente a la Fase Folicular:

La Fase Lútea, que suele tener una duración media de 13 días (rango 9-17 días), suele mantenerse constante en una misma mujer [20] y no varía con la edad [19], sin embargo, la Fase Folicular es altamente variable en duración [18].

La ventana de fertilidad es altamente imprevisible aun cuando los ciclos son regulares [14].

La ovulación sucede en torno al día 18 del ciclo. La media de la fase folicular de 612.613 ciclos analizados fue de 17 días [19].

De lo publicado hasta ahora puede concluirse que faltarían métodos fiables para predecir la ovulación, y por ende para predecir la ventana fértil [14].

La evidencia actualmente disponible sugiere que los métodos que identifican prospectivamente la ventana de fertilidad, probablemente, son más efectivos que los cálculos de calendario o la temperatura corporal basal. Existen varios métodos prometedores con buenas bases científicas para identificar prospectivamente la ventana fértil. Estos incluyen gráficos de fertilidad del flujo vaginal. Estos métodos identifican clínicamente la ocurrencia de ovulación y también identifican una ventana de fertilidad más prolongada que los kits de hormona luteinizante urinaria [2].

El inicio del intervalo fértil, generalmente corresponde a un incremento significativo en los niveles de estrógenos, lo que resulta en la secreción de MC estrogénico y cambios característicos en el flujo vaginal [21-23].

1.3 Moco Cervical: Introducción.

El MC es un fluido viscoso producido por las células secretoras de las criptas cervicales del útero. El MC sufre modificaciones a lo largo del ciclo menstrual que le hacen tener diferentes características bioquímicas y biofísicas, convirtiéndose en un elemento crucial para la identificación de la ovulación. Así mismo, desempeña un rol fundamental en el transporte y la capacitación de los espermatozoides a través del tracto genital femenino.

1.4 Moco Cervical: Propiedades físico-químicas.

El MC es un hidrogel producido por las células secretoras de las criptas cervicales [24,25]. Asimismo, el MC es una entidad heterogénea que contiene diferentes tipos de fluidos o secreciones. Estas secreciones varían en proporción a lo largo del ciclo menstrual [26-28]. Además, las propiedades fisicoquímicas del MC cambian a lo largo del ciclo menstrual [29,30].

1.4.1 Biofísica del Moco Cervical.

En 1966, el Profesor E. Odeblad, que ha realizado una extraordinaria contribución en el conocimiento del MC durante los últimos 50 años, describió por primera vez dos tipos de MC: estrogénico (**E**) y gestagénico (**G**). En 1977, Odeblad evidenció que el MC estrogénico tenía dos componentes: **S** (String, Sperm conducting) y **L** (Loaf, Locking in low-quality spermatozoa, esto es, bloqueante de espermatozoides de baja calidad). Continuando con su investigación, en 1992, Odeblad describió un tipo adicional de Moco estrogénico, secretado en menor cantidad, llamado **P** (Peak) porque tiene su máxima secreción en el día pico [31]. Pronto dividió el Moco P en 2 subtipos: **P6** con capacidad para conducir a los espermatozoides desde las criptas S a la cavidad uterina y **P2** con actividad mucolítica.

A mediados de la década de 1990, se definió un componente no mucoso ('Z') con funciones interesantes e inesperadas. Este componente se encuentra actualmente en estudio con microscopía óptica y espectrofotometría.

Al final de 1993 otro Moco, el Moco **F** (Fundamental), fue identificado. Este Moco no se produce en las criptas sino en el epitelio que cubre la pared endocervical entre las aperturas de las criptas. Las células que cubren las paredes del canal son probablemente más originales o fundamentales que las células en las que se diferencian las criptas y de ahí el nombre de Fundamental.

La diferente viscosidad y morfología que tiene cada tipo de Moco en los cristales de las muestras secadas al aire se ha observado mediante estudios de resonancia magnética [28]. En 1983, Odeblad describió la técnica del "spread it out" que consiste en extender el Moco en un portaobjetos extendiéndolo en todas direcciones. Esta técnica hace posible separar los tipos de Moco para que puedan ser estudiados morfológicamente con el microscopio. Así mismo, también pueden ser semicuantificados. Es decir, esta técnica permite la observación y clasificación de los diferentes tipos de MC, a través de su diferente morfología cristalográfica, el fenómeno 'ferning' [26]. Este también permitió observar la variación cíclica de los porcentajes de las unidades **G**, **L** y **S** basado en 1124 muestras. En cuanto a la cuantificación, diseñó una metodología en la cual la observación de diez campos en una misma muestra, haciendo uso de una cuadrícula en el ocular del microscopio de luz que permite y facilita el cálculo de los porcentajes de cada tipo de Moco en cada campo. Con la suma de los mismos, se obtienen el porcentaje final que hay de cada tipo de Moco en una muestra.

El profesor E. Odeblad observó por primera vez que el tipo **L** tenía una morfología muy similar a un hermoso helecho, con cristales formando un eje central, del cual salían largas ramas en ángulo recto con el mismo. El Moco tipo **S** cristaliza en delgadas filas paralelas,

mientras que el tipo **P** presenta una morfología cristalina constituida por un eje central, y ramas que forman ángulos de 60° con este eje [32]. Es interesante destacar que, como indica Odeblad, el muestreo del MC, y su posterior extensión y secado en un portaobjetos, nos brinda información muy precisa sobre el día del ciclo al que pertenece la muestra.

El Moco **L**, que se segrega desde varios días antes de la ovulación hasta la ovulación, tiene la función de filtrar los espermatozoides, constituyendo una selección natural muy precisa. El diámetro de los poros dificulta el avance de los espermatozoides, aunque no del todo, de modo que solo los mejores espermatozoides pueden pasar este filtro. Su producción se estimula ante niveles moderados de estrógenos. Puede representar un 60-80% en el periodo periovulatorio.

El Moco **S** se secreta alrededor de la ovulación. Constituye las grandes autopistas a través de las cuales pueden nadar los espermatozoides, una vez que han sido debidamente filtrados por el tipo **L**. Requiere de concentraciones elevadas de estrógenos para ser secretado. La norepinefrina parece ser también un estímulo biológico para el Moco **S**.

El Moco **P**, tiene una densidad intermedia, y un diámetro de poro intermedio entre el Moco **S** y el **L**. El Moco **P** tendría la función de filtración y suministro final de azúcar [33]. Su secreción parece estar vinculada al descenso de los niveles de estrógeno, pero también hay evidencia de que la norepinefrina actúa como estímulo. El Moco **P** se presenta en pequeñas concentraciones, a menudo menos del 5% del total.

Desde el punto de vista morfológico el Moco de tipo **P** se clasifica según lo ya descrito en los subtipos **P6** y **P2**. La denominación **Pa** hace referencia a la actividad mucolítica desarrollada por la variedad **P2** y que se efectúa por la acción de un enzima, que se secreta en el istmo del cérvix y al que denominó Enzima Z.

Esta enzima se asocia en gránulos (esferas) de aproximadamente 1 µm de tamaño y se adhiere al Moco de tipo **P**. Aún se desconoce la naturaleza exacta de este proceso mucolítico y las propiedades bioquímicas de este enzima.

En líneas generales, las glándulas del istmo liberan un enzima, que probablemente se asocia a una proteína visible como gránulos. Estos gránulos serían absorbidos por el Moco de tipo **P** para formar **Pa**= Moco **P** mucolíticamente activo. Algún Moco **P** sin embargo se agrega para formar Moco **P6**. **Pa** entra en contacto con el Moco **L** y **S**, liquidifica este tipo de Moco de modo que los espermatozoides pueden proceder hacia arriba guiados por el Moco **P6**. Los gránulos podrían también contener un factor activador de la motilidad de los espermatozoides.

El Moco **G**, está presente en las fases de la infertilidad. Contiene un elevado número de células: células epiteliales del cérvix, leucocitos y linfocitos. Así como altas concentraciones de Inmunoglobulinas.

Odeblad describe dos variantes de Moco **G** a las que dio el nombre de **G+** y **G-**. Las dos variantes de Moco son producidas por las mismas criptas. La progesterona es el estímulo habitual para su producción. Es importante reconocer 3 tipos de células que acompañan al Moco **G**: células epiteliales, leucocitos y linfocitos. Sus proporciones son variables, por norma general 50% células epiteliales, 25% leucocitos y 25% linfocitos.

El Moco de tipo **G** forma un tapón en el cuello uterino que lo cierra, haciéndolo impenetrable para los espermatozoides y defendiendo el tracto genital de infecciones.

El Moco **F**. Un análisis detallado de 600 gráficas seguidas durante un total de 2-4 años (en total más de 12000 ciclos) mostró la existencia de un Moco durante la fase infértil que si bien se parecía al Moco **G-** o **G+**, los leucocitos y linfocitos eran poco habituales. Una precisa aspiración del Moco, mostró que no se producía en las criptas sino en el epitelio que cubría la pared endocervical entre las aperturas hacia las criptas. Las células que recubren las paredes del canal son probablemente más originales o fundamentales que las células que se diferencian en las criptas. A este tipo de secreción la denominó Moco **F** (Fundamental) y a las células como Células F. Los mecanismos por los cuales las células F se transforman en células G, L, S, P son todavía desconocidos.

En mujeres en edad reproductiva, el porcentaje de Moco **F** representa el 1-4% del total de MC. El Moco **F** está probablemente compuesto por un gran exceso de glicoproteínas membranosas de células F que se exfolian y son visibles en el Moco. En el Moco **F** los leucocitos y linfocitos son infrecuentes. Los cristales de la secreción F son escasos o incluso ausentes.

La Figura 1 muestra los patrones de secreción habituales de los diferentes tipos de MC a lo largo del ciclo menstrual

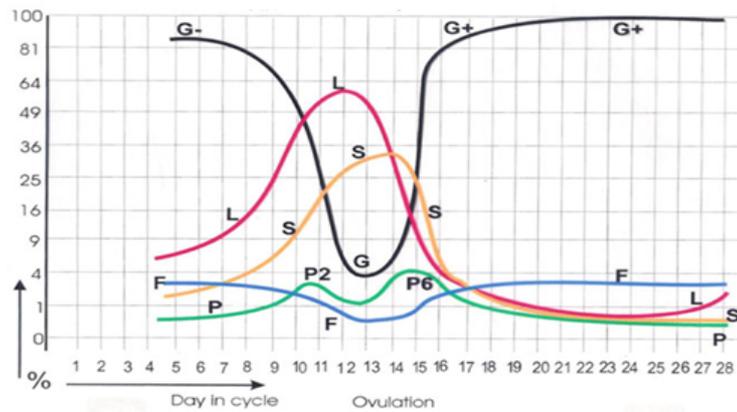


Figura 1. Patrones de secreción de los diferentes tipos de Moco a lo largo del ciclo menstrual.

La microscopía electrónica de barrido ha permitido comparar las mallas creadas por los diferentes tipos de MC: Moco **L**: 0,4-3 μm ; Moco **S**: 1,5-7 μm ; Moco **P**: 0,4-2 μm ; Moco **G**: 0,1-0,5 μm [33]. El tamaño de la cabeza de los espermatozoides es de 5 μm , por lo que para comprender las funciones del Moco en la migración de los espermatozoides es muy importante tener en cuenta los diferentes tamaños de los poros de la red.

Cuando comenzaron los estudios sobre el cuello uterino, se pensaba que todas las criptas actuaban produciendo secreciones al mismo tiempo.

En 1966, Odeblad demostró que algunas de las criptas eran responsables de la mucosidad fina, que se segregaba en los días posteriores a la ovulación, produciendo cristales, y otras del Moco que no cristalizaba, en las fases infértiles del ciclo.

Otros estudios confirmaron que cada tipo de Moco se produce en criptas específicas en diferentes áreas del cuello uterino [28,34,35].

Las estructuras anatómicas del cuello uterino, que indican la ubicación de cada tipo de Moco, también se han estudiado en detalle. Así, Odeblad describe que las criptas productoras de Moco tipo **G** se ubican al inicio del cuello uterino, cerca de su unión con la vagina, lugar lógico para producir este tapón protector característico de las fases de infertilidad. Las criptas productoras de los tipos de MC **L** y **S** se localizan en la mitad del cérvix, y las de Moco **P**, predominantemente en la parte superior de este, cerca del cuerpo uterino [28]. Figura 2.

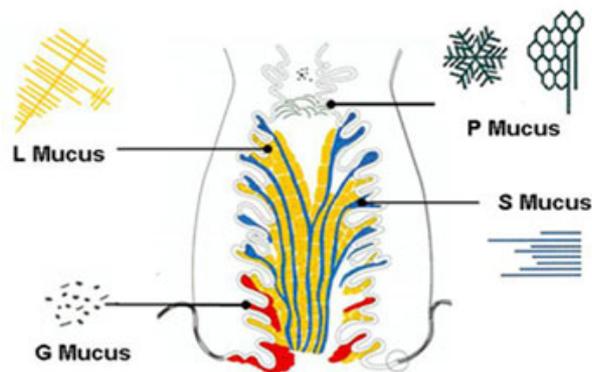


Figura 2. Representación de la ubicación en el cérvix de las criptas productoras de los diferentes tipos de Moco.

Estos tipos de MC se han estudiado utilizando técnicas de microscopía óptica y resonancia magnética nuclear [26]. Las propiedades reológicas del MC indican viscoelasticidad y variación cíclica [3-7].

1.4.2 Bioquímica del Moco cervical.

Desde el punto de vista bioquímico, el MC consta de 2 fracciones principales: una matriz viscoelástica en fase gel compuesta por un polímero de glicoproteína de alto peso molecular (mucina) y el plasma cervical: una fase acuosa de bajo peso molecular [8].

En cuanto a la **mucina**, esta es la sustancia esencial que confiere al Moco las propiedades mucosas que le caracterizan. La mucina es responsable de las diferencias entre los cuatro tipos de Moco. Constituye un 1-2% del total los componentes del MC.

La molécula de mucina está constituida por un segmento desnudo o no glicosilado y otro glicosilado, con carbohidratos.

Esta estructura en dos segmentos es responsable de la variación en la disposición de las moléculas, que forman la red glucoproteica.

La caracterización de las mucinas es difícil debido a su heterogénea glicosilación, naturaleza polimérica y gran tamaño. Los enlaces disulfuro unen los monómeros de mucina excediendo los 500 kDa. Una extensa glicosilación, que excede el 80% de carbohidratos, aumenta las masas a más de 2 MDa. MUC5B es la principal mucina formadora de gel del epitelio endocervical [36]. La cantidad de MUC5B pudiera ser un factor importante que influye en el tránsito de los espermatozoides hacia el útero, ya que su concentración varía durante el ciclo menstrual y presenta los niveles más altos en la ovulación [37].

La composición y/o estructura de carbohidratos del MC determina sus propiedades viscoelásticas variables. Las variaciones en el entorno hormonal afectan la concentración de mucina [38]. La conversión del Moco de fibroso preovulatorio a globular ovulatorio se ha demostrado en estudios previos mediante microscopía de fuerza atómica que mostró las características de los agregados de mucina [39].

La naturaleza y composición de las moléculas de mucina de los cuatro tipos de MC resulta similar, pero distinta, debido a que la configuración de las redes que forman las mallas vista la ultraestructura con microscopía electrónica de barrido, es también distinta. Se puede afirmar, por lo tanto, que diferentes moléculas de mucina originan diferentes estructuras de red, variabilidad que da lugar a los cuatro tipos de MC.

La **fase acuosa** está compuesta principalmente por agua (90-98%). La fase acuosa contiene además electrolitos (principalmente Na⁺ y Cl⁻) y otros componentes solubles como enzimas, trazas de metales, proteínas séricas e inmunoglobulinas de origen local [40,41].

A mitad del ciclo, disminuye la concentración de componentes solubles, debido a un aumento en la cantidad de agua [8]. Así mismo, tanto la concentración de azúcares, como la de proteínas, sufre una disminución en la fase ovulatoria.

La variabilidad en la arquitectura molecular de las mucinas es la responsable de las distintas agregaciones de los iones Na⁺ y Cl⁻, en el Moco desecado, que dan lugar a los distintos patrones de cristalización. Es muy importante entender que los cristales que se pueden ver en el microscopio óptico, son sólo el “reflejo” de una disposición molecular, que subyace debajo.

Lo que se observa en las imágenes de Moco desecado al aire, son cristales, principalmente de ClNa. Los diferentes patrones de cristalización correspondientes a los diversos tipos de MC se deben a complicadas interacciones moleculares entre la mucina (y otro material orgánico), y los iones de Cl⁻ y Na⁺. La fase acuosa contiene, además, otros componentes solubles como trazas de metales, proteínas séricas, enzimas e inmunoglobulinas de origen local.

La composición química del MC tiene un papel fundamental en la fertilidad [42].

La adición de agentes que aumentan la viscosidad de las secreciones y la presencia de anticuerpos antiespermáticos en MC en la mitad del ciclo puede transformar el MC de un elemento receptor de espermatozoides a un elemento hostil.

1.5 Moco Cervical: Funciones.

El MC es responsable de la maduración y migración de los espermatozoides a través del tracto genital femenino. El MC producido durante la ovulación proporciona una defensa para los espermatozoides contra las secreciones vaginales ácidas hostiles, filtra los espermatozoides dismótilos y morfológicamente anormales, proporciona condiciones para la capacitación de los espermatozoides y satisface sus demandas de energía [43].

Durante las fases no ovulatorias del ciclo, el MC crea un microambiente que inhibe la propagación de los espermatozoides [21].

El MC muestra actividad antimicrobiana [44] y también participa en el sistema inmune cervical [45]. El MC proporciona una barrera que evita que los patógenos entren en el endometrio.

El MC proporciona información sobre el estado de fertilidad de las mujeres a lo largo del ciclo [21,46].

Existen numerosos indicios de que el MC es utilizado como un elemento indirecto para la estimación del momento de la ovulación, tanto para los médicos como para las mujeres que utilizan métodos naturales de planificación familiar [27,47,48].

1.6 Moco Cervical y fertilidad.

Existe evidencia de que el MC puede servir de identificador para estimar el momento de la ovulación [49-51].

La mucosidad durante la primera mitad del ciclo forma una barrera física que restringe el acceso de los espermatozoides al tracto genital superior. Entre cinco y seis días antes de la ovulación, el folículo dominante produce estrógenos produciéndose un incremento progresivo de su concentración. El aumento de estrógenos estimula la secreción de Moco estrogénico (Moco **E**).

Este aumento de volumen puede ser observado y monitorizado desde el exterior por las mujeres basándose en diferentes características ya que se correlaciona con cambios en el flujo vaginal [52]. Inmediatamente después de la ovulación, la síntesis de progesterona comienza en el cuerpo lúteo del ovario. El tipo de MC secretado bajo la acción de la progesterona, conocido como Moco **G**, bloquea el acceso de los espermatozoides e inhibe su motilidad y capacitación. Este tipo de MC se considera infértil debido a sus características [2, 53].

Hay un intervalo fértil durante el ciclo menstrual de la mujer durante el cual, si tiene lugar la relación sexual la concepción es más probable [54]. De hecho, solo hay un período de

tiempo durante el cual la fecundación puede ocurrir debido a la duración limitada de la viabilidad del espermatozoides y del óvulo [55]. Esta ventana fértil es el día de la ovulación y los días anteriores a la ovulación. El óvulo perderá su potencial para ser fecundado después de 10 a 24 horas después de la ovulación [2]. La longevidad de los espermatozoides dentro del sistema reproductor femenino es más variable: en ausencia de MC, los espermatozoides tienen una vida útil de 24 a 48 horas. Sin embargo, pueden sobrevivir de 3 a 5 días en el período periovulatorio en presencia de MC estrogénico adecuado [14]. Debido al hecho de que la duración de la fase lútea es casi constante, [20] los días de la ventana fértil pueden ser estimados sobre la base de la duración del ciclo histórico [56]. La ovulación ocurre aproximadamente 14 días antes del comienzo del próximo ciclo menstrual [14]. El último día de cualquier observación externa de Moco que tiene características de tipo E se puede identificar como el día Pico [2].

Los métodos basados en el conocimiento de la fertilidad (FABM = Fertility Awareness Based Methods) permiten a la mujer monitorizar y predecir los días fértiles e infértiles de su ciclo menstrual. La identificación de la ventana de fertilidad es posible mediante el reconocimiento de síntomas y signos físicos que las mujeres pueden observar por sí mismas, tales como la observación y monitorización del MC, el ritmo de sangrado, la auto palpación del cuello uterino, la medición basal de la temperatura corporal, etc. [57, 58]. La efectividad de estos métodos depende de la identificación precisa de la ventana fértil y la adaptación consecuente del comportamiento sexual [59]. MC es un predictor confiable de fertilidad. Un buen número de trabajos publicados han confirmado que la monitorización del MC puede identificar los días con mayor probabilidad de embarazo [46,60].

1.7 Lisozima.

La lisozima (CE: 3.2.1.17) fue descubierta por Alexander Fleming en 1922. Fue la primera proteína que fue secuenciada y cuya estructura tridimensional fue completamente analizada.

Su nombre está formado por la parte "liso" debido a su capacidad para lisar las bacterias y "zima" ya que era una enzima. Su estructura fue descrita por David Chilton Phillips en 1965, cuando consiguió una imagen con una resolución de 2 angstrom (200 pm). Se codifica por un gen localizado en el cromosoma 12 y organizado en 4 exones y 3 intrones [61]. La lisozima que tiene un peso molecular de 15000 se compone de 129 aminoácidos reticulados por 4 puentes disulfuro [62].

La lisozima tiene dos dominios principales. El dominio alfa de la molécula está constituido principalmente de hélices alfa, mientras que el dominio beta contiene láminas beta y hélices

[63]. El sitio activo se encuentra en una hendidura que se forma entre estos dos dominios [64].

La lisozima está ampliamente distribuida en una variedad de tejidos y fluidos corporales, incluyendo el hígado, el cartílago articular, plasma, saliva, lágrimas, leche y MC [65].

La concentración de lisozima en el líquido vaginal es relativamente baja (~ 13 µg ml⁻¹; [66]; sin embargo, es una proteína particularmente abundante en los tapones de MC, alcanzando aproximadamente 1 mg lisozima / g de tapón [67].

La lisozima se expresa considerablemente en las células hematopoyéticas en el que se encuentra en los granulocitos, monocitos y macrófagos, así como en sus precursores de la médula ósea [65].

La lisozima actúa como una proteína catiónica que induce la lisis celular como consecuencia de la perforación de la membrana celular a través de un mecanismo de interacción proteína fosfolípido [68].

La lisozima se clasifica como ovo-antimicrobiana debido a su actividad bactericida.

La lisozima ha representado desde su descubrimiento una molécula prototipo para la comprensión de la complejidad de la estructura y función de proteínas en la fisiología y la enfermedad. Representó una molécula modelo para la investigación de la catálisis enzimática, que fue una de las primeras proteínas utilizadas como marcador de enfermedad [65]. Se convirtió en un modelo para las teorías de la cinética de plegamiento [66], y finalmente, es probable que haya representado el modelo por el cual se ha logrado la mayor parte del conocimiento real de la conversión fibrilar de proteínas globulares [67].

1.7.1 Factores que afectan a la actividad de la lisozima.

La velocidad de catálisis de la lisozima depende del pH del medio ambiente. La actividad de la lisozima de clara de huevo es máxima en pH alrededor de 5. La actividad de la lisozima se ve afectada por la concentración de sal y esto afecta el espectro de pH. Concentraciones de NaCl de 0,05 M proporcionaron una actividad de lisozima superior en un intervalo más amplio de valores de pH (pH 5-9) que una concentración de sal de 0,1M [69]. La lisozima es estable al calor en soluciones ácidas (pH 5,29, 100°C y 30 min) [70].

Dado que la actividad catalítica de la lisozima depende de pH, fuerza iónica, concentración de sustrato, y de las concentraciones de sodio y potasio de la mezcla de reacción, estos factores deben ser considerados en el análisis de la lisozima. Cada microorganismo tiene diferente susceptibilidad a la lisozima. Por otra parte, los ensayos de lisozima también

pueden verse afectados por el medio de muestra. Por ejemplo, los fluidos biológicos tales como la saliva, pueden incluir arginina, lo que aumenta la actividad de la lisozima [71].

1.8 Cambios en las propiedades antimicrobianas del Moco Cervical a lo largo del ciclo.

Desde el descubrimiento de la lisozima, se han identificado varios péptidos antimicrobianos en los tejidos reproductivos incluyendo, beta defensina humana (HBD) 1-4 [72,73], defensina humana (HD) 5 [74] e inhibidor secretorio de proteasa leucocítica (SLPI) [26,75,76]; HBD 1 y HBD2 se encuentran en el tracto genital de la mujer y en los tejidos relacionados con el embarazo [77].

La lisozima se encuentra entre las proteínas solubles disueltas en la fase líquida del MC, junto a otras enzimas como la alfa-amilasa, DNasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina [78].

La actividad específica de estas enzimas, expresada en μ /mg de MC, muestra un descenso a mitad del ciclo, que coincide con el aumento en su producción de MC, así como en un incremento del contenido de agua [79].

Las proteínas totales del MC disminuyen en el momento de la ovulación [80].

Los niveles de albúmina alcanzan los valores más bajos en el momento de la ovulación, y las globulinas también disminuyen en ese momento y aumentan antes y después de la menstruación [80].

La mayoría de las enzimas descritas en MC, muestran un patrón cíclico [81], que implica un descenso de 3 a 5 días previos a la ovulación. Las modificaciones químicas del MC durante la ovulación incluyen la disminución de ciertas proteínas solubles y la aparición de otras, una disminución de la lisozima [82].

La muramidasa o lisozima, en concreto, muestra un descenso preovulatorio seguido de un ascenso postovulatorio [78].

Diversos estudios sobre fosfatasa alcalina, amino peptidasa, esterasa, lactato deshidrogenasa y guaiacol peroxidasa han demostrado que la concentración de todos estos enzimas es alta durante la fase folicular, y desciende precipitadamente tres o cuatro días antes del pico de la LH [82].

El nivel más bajo de enzimas se alcanza normalmente el día de la subida de la LH. Al día siguiente, hay un significativo y brusco aumento en la concentración de éstas, que se mantiene durante la fase lútea.

Posteriormente, diversos autores han corroborado el efecto antimicrobiano del MC, con especial atención en el efecto de la lisozima [83].

Odeblad, en sus estudios sobre el MC, ha descrito que el mayor contenido de inmunoglobinas y defensas contra infecciones, en general, se encuentra en el Moco G, presente en un porcentaje prácticamente absoluto en las fases infértiles del ciclo.

1.9 Proteómica.

Proteomics: “-Omics” se refiere al estudio de sistemas biológicos a gran escala. El término “proteómica” se ha utilizado desde 1995 para definir la identificación a gran escala de los componentes proteicos de un tipo de célula, tejido o fluido biológico [84]. La proteómica captura el perfil de proteínas general en lugar de la expresión de genes individuales. La genómica por sí sola no puede proporcionar información completa sobre las diferentes proteínas codificadas. Aunque se ha obtenido un número estimado de proteínas codificadas por el genoma humano a partir de los datos recopilados en el proyecto del genoma, es difícil proporcionar el número real de proteínas codificadas sobre la base de datos genómicos [85]. El ensamblaje alternativo de una transcripción, por ejemplo, puede producir diferentes isoformas de proteínas de un gen [86]. Además, se puede obtener la misma proteína con diferentes propiedades y funciones como resultado de la partición y la translocación [87]. Por último, las proteínas pueden sufrir más de 200 modificaciones postraduccionales diferentes [88]. Estas complejidades solo pueden resolverse mediante análisis proteómico, proporcionando así información útil a través de la correcta integración de datos genómicos y proteómicos. Sólo mediante el estudio de las proteínas mismas es posible estudiar sus características y funciones.

Como campo, la proteómica ha avanzado rápidamente [89]. En la era posterior al genoma, por ejemplo, los estudios se han centrado en la identificación de nuevos biomarcadores de proteínas en sistemas biológicos complejos. De hecho, la proteómica se ha empleado ampliamente en diferentes campos de la ciencia, desde el descifrado de la patogénesis molecular de las enfermedades hasta la caracterización de nuevas dianas farmacológicas y la identificación de biomarcadores de diagnóstico y pronóstico. La tecnología proteómica es capaz de identificar y cuantificar proteínas asociadas al inicio de una patología específica mediante sus niveles alterados de expresión [90]. La espectrometría de masas (EM) ha mejorado enormemente la capacidad de caracterizar una gran cantidad de proteínas y sus cambios postraduccionales. Con tal metodología, el

análisis proteómico puede diferenciar el estado sano del estado patológico, identificando así los biomarcadores relacionados con la enfermedad.

1.10 Proteómica del MC en mujeres fértiles.

La investigación de la fisiología humana, en particular en fluidos biológicos, se ha beneficiado del rápido desarrollo de la tecnología proteómica. Gracias a esta eficaz herramienta ahora es posible la identificación de nuevos potenciales biomarcadores para el pronóstico, terapia y diagnóstico, así como la caracterización integral de la composición proteómica en diferentes aspectos clínicos, incluida la reproducción [91]. La composición proteómica del MC se ha investigado en pocos estudios. Probablemente sea menos complejo que la orina y el plasma, pero cómo el proteoma del MC sufre cambios cíclicos y cuántas proteínas contiene el MC, es aún incierto [30].

Para estudiar la composición de MC, se ha utilizado un enfoque para el descubrimiento de biomarcadores con el uso de tecnologías proteómicas de alto rendimiento como la espectrometría de masas de tiempo de vuelo y la desorción/ ionización por láser mejorada en superficie (SELDI-TOF MS) [92,93]. Sin embargo, debido a la dificultad de generar espectros de calidad adecuada con alta reproducibilidad, este enfoque tiene un éxito limitado. Este problema ha sido abordado por estudios previos utilizando tipos de muestras diversificadas tanto desde un punto de vista sistemático como biológico [93].

Se reportaron los análisis glucómicos y proteómicos del MC recopilados de 12 mujeres no embarazadas utilizando LC-FT-ICR y MS/MS [94]. Para la separación de mucinas y proteínas se realizó un pre-fraccionamiento de las muestras mediante electroforesis en gel compuesto unidimensional SDS-PAGE y SDS-agarosa con análisis tríplico posterior. Los principales resultados se relacionaron con interesantes alteraciones en los glucanos de mucina [30]. La mucina MUC5B se describió como el componente principal y su O-glicosilación reveló diferencias consistentes en la ovulación. Además, se han identificado cinco mucinas diferentes: dos mucinas unidas a membrana (MUC1 y MUC16) y tres formadoras de gel (MUC5B, MUC5AC y MUC6). El análisis transcripcional de la expresión génica de la mucina en el epitelio reproductor femenino se ha descrito previamente para todas estas mucinas, excepto para MUC16 [94,95]. Se ha encontrado mucina MUC5B en el cuello uterino a lo largo del ciclo menstrual según lo determinado por los anticuerpos dirigidos contra la estructura proteica de la columna vertebral [38,94], tanto MUC5AC como MUC5B están presentes en el tapón de MC de mujeres embarazadas [94]. Los resultados confirman los hallazgos previos: la principal mucina del MC es MUC5B [94].

Cerca de la ovulación, las mucinas son las proteínas principales, mientras que, en la fase lútea, aumenta la abundancia de otras proteínas [96].

Más de 50 oligosacáridos sulfatados, neutros y sialilados diferentes fueron revelados por los O-glicanos de las mucinas cervicales. Las más importantes variaciones observadas durante el ciclo menstrual fueron en la O-glicosilación de la mucina. Los O-glicanos son prácticamente idénticos en las mucinas antes y después de la ovulación, pero son considerablemente diferentes en la ovulación. Durante la ovulación, la relativa abundancia de oligosacáridos neutros frente a los ácidos incrementa [94].

La variación cíclica de la glicosilación durante el período de ovulación también ha sido sugerida por estudios previos haciendo uso de métodos bioquímicos e histoquímicos más simples [97-100].

Las modificaciones en el proteoma del MC durante las diferentes fases del ciclo menstrual fueron analizadas por primera vez en 2015 por Grande et al. [30], utilizando espectrometría de masas de alta resolución, implementada mediante herramientas cuantitativas. El enfoque proteómico reveló diferencias en la expresión de varias proteínas del MC durante el ciclo menstrual, que están involucradas en la inflamación, la actividad estructural y el sistema de defensa [30].

En detalle, la identificación de proteínas permitió la caracterización de una media de 59 proteínas en las muestras preovulatorias, 81 proteínas en las muestras ovulatorias y 43 proteínas en las muestras post ovulatorias [30].

Se identificaron 38 proteínas en las 3 fases del ciclo menstrual. Entre ellas, la presencia de lactotransferrina, cadenas de inmunoglobulina, defensina de neutrófilos 1 y Proteína 2 de Dominio del Núcleo de Cuatro Disulfuros WAP (WFDC) que sugiere la relevancia del papel defensivo del MC [30].

El análisis comparativo para la identificación de proteínas específicas de cada fase dio como resultado la identificación de 42 proteínas específicas en la fase preovulatoria, 38 proteínas específicas en la fase ovulatoria y 17 proteínas específicas en la fase post ovulatoria [30].

En el MC preovulatorio, se identificaron 42 proteínas específicas, incluidas la cistatina C, la clusterina, la glicodelina y el inhibidor de metaloproteinasa 1.

Las cistatinas son inhibidores de cisteína proteasa, que se encuentran en una amplia gama de organismos [101]. La cistatina-C se identificó por primera vez en el MC como un marcador de la fase preovulatoria.

La clusterina es una proteína previamente identificada en diferentes secreciones, incluida la leche [102] y el plasma seminal [104]. Se relaciona con las reacciones oxidativas dañinas [104] y la precipitación de proteínas [105]. Desempeña un papel clave en la reproducción al controlar la aglutinación de los espermatozoides anormales [106].

Se informó que la glicodelina está implicada en la inhibición de la capacitación y función de los espermatozoides [107]. Algunos informes de la literatura describen cómo los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP) en la reproducción, vinculan la expresión de los sistemas metaloproteinasas-TIMP en el tapón de MC durante el embarazo con la actividad proteolítica en relación con el parto a término y prematuro [108]. La importancia de la presencia exclusiva en el MC preovulatoria de TIMP-1 podría estar asociada con la inhibición de la actividad proteolítica, que conduce a la licuefacción del MC en la fase ovulatoria [30].

Se identificaron 17 proteínas específicas en la fase posovulatoria, incluyendo enzimas glucolíticas como la triosafosfato isomerasa (TPI) y proteínas estructurales como la dineína, queratinas I y II y espectrina que juegan un papel clave en la organización y mantenimiento de la red de filamentos intermedios [30].

Finalmente, se informó que la E3 ubiquitina-proteína ligasa E3 SH3RF2 estaba presente en el MC ovulatorio y la E3 ubiquitina-proteína ligasa E3 Topors en la fase posovulatoria. La ubiquitina es una proteína de 76 residuos, implicada en la degradación de proteínas por el sistema ubiquitina-proteasoma. La ubiquitinilación es importante en procesos como la apoptosis y la presentación del antígeno, y representa un proceso central en la oncogénesis, incluyendo el desarrollo de neoplasia cervical [109]. Ésta es la primera identificación de enzimas implicadas en la ubiquitinilación en MC que pueden asociarse con la selección de los espermatozoides [30].

El análisis bioinformático de las funciones moleculares de las proteínas comunes reveló que la mayor parte de los constituyentes de MC tiene una actividad catalítica (36%), que está relacionada principalmente con la actividad de la hidrolasa (60% del grupo catalítico).

El MC tiene un número notable de enzimas involucradas en la degradación de la mucina como sialidasas, otras glicosidasas, proteasas y sulfatasas. Sus actividades transforman la estructura de la mucina y, por tanto, sus propiedades físicas. Estas enzimas pueden influir en la barrera física frente a patógenos y espermatozoides o pueden mejorar la adhesión bacteriana y, por tanto, la colonización [110]. Además, podrían estar implicados en procesos enzimáticos relacionados con la capacitación de los espermatozoides.

Las proteínas de unión representan el segundo grupo en la clasificación de la actividad molecular (31%) y participan principalmente en las interacciones proteína-proteína (50% de las proteínas de unión).

El análisis comparativo de las anotaciones de Genome Ontology (GO) para la función molecular de las proteínas exclusivas identificadas en el MC preovulatorio y ovulatorio reveló diferencias significativas como un aumento de las proteínas de defensa/inmunidad en la fase ovulatoria. El análisis de comparación de las anotaciones GO para las funciones moleculares de las proteínas exclusivas identificadas en el MC ovulatorio y post ovulatorio reveló un aumento significativo después de la ovulación en algunas clases de proteínas como: proteínas de unión a calcio, receptores acoplados a proteína G, proteína quinasas, hidrolasas y metiltransferasa [30].

El análisis cuantitativo de las proteínas comunes reportó un pico de haptoglobina en el momento de la ovulación, que se reduce en el MC preovulatorio y post ovulatorio y también una disminución en el índice de abundancia de proteínas Antileucoproteínasa (ALP) después de la ovulación. Esto apoya observaciones previas donde evidencian que la concentración de ALP es significativamente más alta en la fase ovulatoria que en las foliculares y lúteas [111]. ALP, también conocido como inhibidor de proteasa de leucocitos secretores (SLPI), es una proteína secretada por la mucosa de bajo peso molecular, que inhibe las actividades de la catepsina-G, elastasa y las proteinasas lisosomales de serina neutra, lo que contribuye a proteger localmente contra la destrucción de las células epiteliales [112]. Los reguladores potenciales de la expresión del gen SLPI en el endometrio porcino incluyen la progesterona (P4), las hormonas esteroideas y el estrógeno (E) [113]. Es interesante mencionar que la regulación de E y P4 de la síntesis de SLPI parece ser específica del endometrio. En humanos, se evidenció que SLPI está presente en el MC durante todos los ciclos menstruales, con un pico en la ovulación, como lo confirma el análisis proteómico cuantitativo [30].

Además del análisis proteómico del MC, se han realizado otros estudios proteómicos en Fluido cervicouterino-vaginal (FCV), líquido endometrial y tapones de MC (MCP).

El FCV está compuesto por secreciones que se originan en la vagina y otras secreciones que fluyen hacia la vagina, como el MC, y secreciones del oviducto y el endometrio. El FCV juega un papel clave en la defensa innata. Hasta la fecha, se han realizado pocos estudios para caracterizar el proteoma del FCV [114-120]. Cuatro de ellos incluían sólo mujeres embarazadas [114-117]. Estos estudios revelaron la presencia de 15 a 685 proteínas: Usando separación en gel / MALDI-TOF MS (15 y 59 proteínas respectivamente) [114,118], LC-MS / MS (39 proteínas) [117], separación en gel y LC -

MS / MS (685 proteínas) [118], separación en gel y LC-LC-MS / MS (150 y 205 proteínas respectivamente) [114, 116], electroforesis en gel unidimensional y bidimensional y cromatografía líquida acoplada con MS (GeLC-MS / MS) (107 proteínas) [120].

De manera consistente, se ha informado que muchas proteínas del FCV tienen un origen plasmático, lo que sugiere que el FCV podría ser en gran parte trasudado de plasma.

La combinación de diferentes técnicas permitió un análisis más completo de la composición y función del FCV. En 2009, se describió por primera vez un catálogo completo de proteínas de fluido endometrial durante la fase secretora del ciclo menstrual. Se utilizaron tres estrategias diferentes pero complementarias: separación de proteínas mediante electroforesis unidimensional desnaturizante (SDS-PAGE) seguida de análisis HPLC-MS / MS; electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) seguida de análisis MALDI-TOF / TOF y digestión en solución seguida de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa junto con espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS / MS). La combinación de las tres estrategias permitió la identificación exitosa de 803 proteínas diferentes [121].

El MCP es una estructura compleja dentro del canal cervical que se diferencia de las secreciones cervicales de las mujeres no embarazadas. El MCP es el sellador final de la cavidad uterina durante el embarazo. Aún no se dispone de información completa sobre su composición proteica a pesar de que varios estudios han analizado las propiedades bioquímicas de las glicoproteínas grandes en el MCP [39,122].

La presencia de péptidos antimicrobianos y mucinas se ha informado en el MCP durante el embarazo en pocos estudios [30,72]. En 2011, se informó por primera vez sobre el proteoma del MCP de mujeres embarazadas a término. Se analizaron muestras de cinco MCP obtenidos de mujeres en trabajo de parto a término mediante LC-MS / MS. Se identificaron 291 proteínas: 137 de ellas estaban presentes en dos o más muestras, incluidas las proteínas del complemento (C3, C4a, C4b, C6 y C8g) y S100A8, S100A9. Se identificaron varias proteínas como la proteína de la zona de gestación y el antígeno CD81 que no habían sido descritas en la MC de mujeres no gestantes o en FCV. El análisis de Ontología Génica (GO) de proteínas identificadas evidenció una mejora relevante de 28 procesos biológicos como la 'regulación positiva de la esterificación del colesterol' y la 'activación de proteínas plasmáticas implicadas en la respuesta inflamatoria aguda'. Estos hallazgos sugieren firmemente el papel relevante del MCP en el mantenimiento del parto y el embarazo [122].

2. JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

La fertilidad humana depende de procesos biológicos complejos. El conocimiento de la fertilidad siempre ha despertado gran interés en el mundo científico, en las mujeres y en las parejas alrededor del mundo.

Durante varios años, el objeto de investigación ha sido encontrar un parámetro preovulatorio, bioquímico, que permita identificar la ovulación, con suficiente antelación y así definir, con mayor exactitud, la ventana de fertilidad combinada, teniendo en cuenta para ello la supervivencia espermática.

El Profesor Erik Odeblad, sugirió que enzimas como la lisozima, un agente perteneciente a la inmunidad general del cuerpo, presente en el MC, podría considerarse, junto con otros, uno de los parámetros bioquímicos preovulatorios como elemento clave en la fertilidad.

El MC es un fluido viscoso producido por las células secretoras de las criptas cervicales. Este sufre modificaciones a lo largo del ciclo que le hacen tener diferentes características bioquímicas y biofísicas, convirtiéndose en un elemento crucial para la identificación de la ovulación. Así mismo, desempeña un rol fundamental en el transporte y la capacitación de los espermatozoides a través del tracto genital femenino.

La variabilidad cíclica del MC tiene un impacto muy importante sobre fertilidad y la salud reproductiva [30]. A lo largo del ciclo menstrual, el MC cambia cíclicamente su composición química, características físicas y el volumen de secreción. La mucosidad durante la primera mitad del ciclo es espesa, viscosa y escasa. Forma una barrera física que restringe el acceso de los espermatozoides al tracto genital superior. De cinco a seis días antes de la ovulación, el folículo dominante produce estrógenos produciéndose un incremento progresivo de su concentración. El aumento de estrógenos estimula la secreción de Moco estrogénico (Moco E). El Moco estrogénico, desde el exterior aparece como resbaladizo, mojado, claro y elástico. Esta característica convierte a este tipo de MC óptimo para facilitar la supervivencia y el transporte del espermatozoide en el cuello uterino. El potencial de fecundación del óvulo aumenta debido a que el Moco E conduce a la capacitación o maduración funcional de los espermatozoides. El tipo de MC fértil asegura el transporte de espermatozoides a través de las trompas de Falopio al ovario [21,43]. La viscosidad del MC en este período disminuye, pero su volumen aumenta de 10 a 20 veces.

El presente trabajo pretende contribuir en el conocimiento de las propiedades y funciones fisicoquímicas del MC, incluyendo su importante potencial en el rol como marcador clínico

de fertilidad femenina. Así mismo tratará de contribuir en la identificación del MC como una fuente de nuevos biomarcadores proteicos en la fertilidad femenina.

3. HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS.

La enzima lisozima, un agente perteneciente a la inmunidad general del organismo, junto a otros enzimas que están presentes en el MC, se comportan como parámetros bioquímicos preovulatorios que pueden identificar de forma precisa y anticipada el momento en el que se produce la ovulación.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS.

Objetivo Principal

- Analizar las variaciones de la abundancia de la enzima lisozima en MC durante los primeros días del ciclo menstrual.

Objetivos Secundarios

- (1) Analizar las variaciones de las proteínas presentes en el MC durante los primeros días del ciclo menstrual.
- (2) Identificar posibles biomarcadores de la ovulación.
- (3) Detectar la presencia de células precursoras de Z en las muestras de MC observadas al microscopio óptico y analizar posibles diferencias en la composición proteica de las muestras en las que está presente.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Muestra.

Tamaño de la muestra.

Para la determinación del número de muestras, se tomó como referencia el número de muestras analizadas en el estudio que describe por primera vez una técnica de análisis proteómico de alta resolución para la identificación de constituyentes proteicos del MC [30]. El número de muestras analizadas fue de 18, correspondientes a 3 muestras de un mismo ciclo de 6 voluntarias.

Tipo de muestreo.

Muestreo de conveniencia. Mujeres Voluntarias interesadas en contribuir al estudio del MC y la fertilidad.

Selección de los días de toma de muestras.

Para la selección de los días de toma de muestras se tuvo en consideración que, de acuerdo con estudios recientes, la fase estrogénica tenía una duración media de 17 días [19]. Los días seleccionados para el estudio fueron los días 7, 12 y 18 de un mismo ciclo menstrual.

Criterios de inclusión.

Mujeres en edad fértil sin antecedentes de problemas de fertilidad y con historia de ciclos menstruales regulares.

Adoptaron el compromiso de colaborar en la recogida de muestras seriadas en tres días diferentes de un mismo ciclo.

Así mismo se comprometieron a mantener abstinencia sexual durante el estudio.

Criterios de exclusión.

Se excluyeron del estudio proteómico las muestras que estaban en Fase Gestagénica.

Delimitación de la muestra.

Se inscribieron seis mujeres voluntarias, de edad comprendida entre los 25 y los 30 años, de raza caucásica, cuya provincia de residencia era Barcelona.

Las voluntarias no tenían antecedentes de problemas de fertilidad, 5 de ellas tuvieron un parto a término dentro del año anterior al estudio.

Las muestras de MC (n = 3 por paciente) se recogieron en el Departamento de Ginecología del Hospital Universitario Valle Hebrón de Barcelona, de forma seriada, durante los primeros 18 días de un mismo ciclo menstrual, en los días 7, 12 y 18 del ciclo.

5.2 Metodología de obtención de las muestras.

Las muestras de MC fueron obtenidas por un ginecólogo experimentado, mediante una suave aspiración de la luz del canal cervical por medio de un catéter para inseminación intrauterina (Gynetics Medical Products, Achel, Bélgica).

La metodología empleada fue la siguiente: Con la voluntaria en posición de litotomía, se hizo visible el cérvix mediante un espéculo ginecológico, haciendo posible la observación del orificio cervical externo. Se limpió el cérvix con una torunda de gasa seca, colocando entonces el catéter para inseminación intrauterina en el orificio cervical externo y realizando una aspiración suave de la luz del canal cervical.

5.3 Preparación de las muestras.

5.3.1 Desecado al aire.

Extensión: Una parte de la muestra se depositó en un portaobjetos, utilizando una aguja para su extensión en todas direcciones, según la técnica “**spread it out**” descrita por Odeblad en 1995.

La técnica consiste en depositar la muestra de MC sobre un porta y con la ayuda de una aguja, extenderla radialmente sobre la superficie del porta en todas las direcciones. La operación se realizó inmediatamente después de la extracción, ya que la difusión iónica cambia las propiedades del MC en breve espacio de tiempo.

El tiempo aproximado de secado fue de 10 minutos, sin exponer la muestra al sol ni acercarla a ningún foco de calor. La técnica se recoge en la Figura 3. Las muestras así obtenidas pueden permanecer durante mucho tiempo sin alterarse, para su estudio, siempre que estén guardadas en un ambiente seco y exento de polvo.

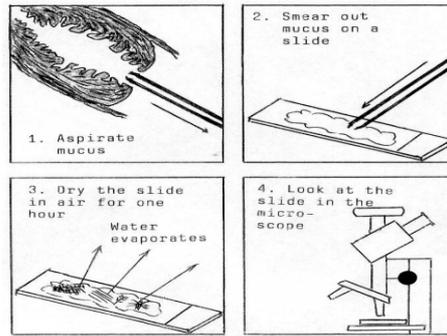


Figura 3. Esquema de la técnica “*spread it out*” desarrollada por el Profesor Odeblad para la observación de las muestras de Moco Cervical en microscopio óptico.

5.3.2 Proteómica.

El resto de la muestra de MC se recogió en Tubos Eppendorf de microcentrífuga (marca PPX). En el departamento de Microbiología del Hospital Universitario de Valle Hebron se mezcló 1: 1 (v / v) con una solución acuosa de ácido trifluoroacético (0,2% v / v). A continuación, se procedió al centrifugado de la muestra a 9000 xg durante 10 minutos con una centrífuga Hermle Labortechnik GmbH-Z 233 M-2 microlitros. La muestra se almacenó a -80 °C hasta el análisis en un congelador de laboratorio del Hospital Universitario de Valle Hebron.

5.4 Análisis de las muestras.

5.4.1 Microscopía óptica.

La observación de las muestras en el microscopio óptico permitió:

- Identificar los diversos tipos de MC según su cristalización
- Clasificar las muestras atendiendo a la fase del ciclo menstrual a la que pertenecen
- Identificar células Z.

5.4.1.1 Observación de las muestras.

Las 18 muestras de MC desecado y cristalizado de los portas fueron estudiadas y fotografiadas.

El estudio de las muestras con microscopía óptica se realizó en un microscopio Olympus BH-2 de la Unidad de Hematimetría del Servicio de Hematología Clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

Las muestras fueron fotografiadas en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Teresa Herrera de A Coruña.

5.4.1.2 Clasificación de las muestras.

Las muestras recogidas en los portas, se analizaron para identificar la fase del ciclo menstrual de la muestra.

Para la clasificación de las muestras atendiendo a la fase del ciclo al que pertenecen, se siguió el protocolo diseñado por el Profesor Odeblad [26], según se describe a continuación:

Cada muestra se analizó y clasificó de forma individual con microscopía óptica de luz.

De cada muestra, se analizaron 10 campos al azar de la muestra mediante una lente reticulada en cuadrícula de 10*10 (Modelo AMCKLRC) inscrita en el ocular.

Se anotó qué tipo de MC aparecía en cada cuadro.

A continuación, se hizo la suma de cuadros en los 10 campos para cada tipo de Moco y se dividió por el total de cuadros, calculándose el porcentaje de cada tipo.

De esta forma se calculó en cada muestra el porcentaje de los diversos tipos de Moco.

Finalmente, con la ayuda de la Fecha de la Última Regla (FUR), se realizó la extrapolación sobre la gráfica patrón (Figura 4) determinando así el día del ciclo en el que se encontraba la mujer.

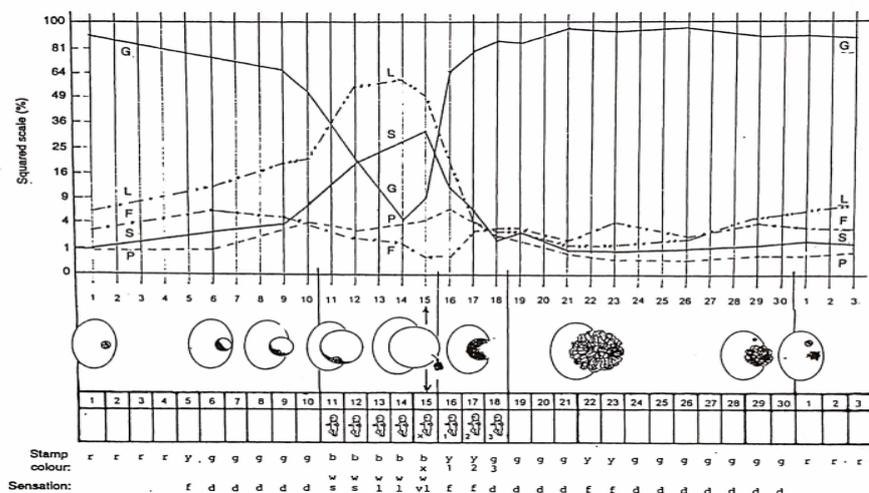


Figura 4. Gráfica patrón para el estudio de los porcentajes de Moco en cada momento del ciclo descrita por el Profesor Odeblad.

Las muestras se identificaron teniendo en cuenta la siguiente clasificación:

Fase Estrogénica temprana (del día 12 al día -6), Estrogénica tardía (del día -5 al -3), fase ovulatoria temprana (del día -2 al día 0) Ovulatoria tardía (del día +1 a +2) considerando el día 0 como el día de la ovulación [35].

5.4.2 Proteómica.

El proceso de análisis proteómico se recoge de forma simplificada en la Figura 5. Se utilizaron metodologías modernas y específicas de espectrometría de masas de alta resolución y análisis bioinformático. Esto permitió determinar los cambios de la composición proteica del MC durante el ciclo menstrual en el organismo vivo.

El análisis bioquímico del MC intacto es difícil debido a su viscosidad extremadamente alta. Para resolver esta dificultad, las muestras fueron derivadas a un laboratorio especializado y el análisis se realizó en el Laboratorio del Instituto Científico Internacional Pablo VI del Hospital del Sacro Cuore de Roma, Italia.

Para ello, las muestras fueron trasladadas a Roma, por medio de transporte aéreo a temperatura controlada con hielo seco y embalaje aislante para garantizar la preservación de la cadena de frío.

Las muestras se dividieron en 3 grupos para su análisis. El criterio de agrupación fue el día del ciclo menstrual en el que habían sido obtenidas.

De ese modo, las 6 muestras obtenidas en el día 7 del ciclo fueron analizadas de forma conjunta en grupo, las 6 muestras del día 12 en otro grupo y las 5 muestras del día 18 en un tercer grupo.

Primero se realizó el análisis proteómico de los tres grupos y posteriormente el análisis de datos.

El protocolo utilizado para el análisis fue el siguiente:

Un alícuota de cada una de las muestras de MC, correspondiente a 0,5mg del total de proteína (según medición realizada por el Método de Bradford), se mezcló con bicarbonato de amonio 1M pH 8,0 y fue reducido con 200mM ditioneitol (DTT 10mM final, Sigma) durante 5 minutos a 100° y 15 minutos a 50°C por último, fue alcalinizado con 200mM iodoacetamida (IAA 55mM final, Sigma) en el cuarto oscuro a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Las muestras se dejaron “digiriendo” durante la noche a 37°C añadiendo 100mM

bicarbonato de amonio (pH 8) con grado de secuenciación modificado de tripsina porcina (1:50, tripsina: concentración de proteína, Pierce Biotechnology).

Para detener la “digestión”, las muestras fueron acidificadas con solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) (0.2% v/v) e inmediatamente congeladas y liofilizadas. El tratamiento con TFA facilitó la solubilización de pequeños péptidos que de otro modo podrían coprecipitar con proteínas de alto peso molecular, como mucinas, que fueron excluidas por este procedimiento del análisis.

La Espectrometría de masas es una técnica analítica que permite estudiar compuestos de naturaleza diversa: orgánica, inorgánica o biológica (incluyendo biopolímeros y macromoléculas naturales o artificiales) y obtener información cualitativa o cuantitativa. Para ello es necesario ionizar las moléculas, utilizando si fuera preciso una separación cromatográfica previa, y obtener los iones formados en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en la fuente de ionización. Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina Espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados.

Mediante el análisis por Espectrometría de masas es posible obtener información estructural del MC, obtener información de las masas moleculares de las diferentes proteínas presentes, así como, cuantificar las diferentes concentraciones.

Las muestras fueron resuspendidas en 40 μ l de solución acuosa de ácido fórmico (0,1% v/v) y analizadas utilizando un aparato Ultimate 3000 Nano/Micro-HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) equipado con un módulo FLM-3000-Flow Manager y emparejadas utilizando un Espectrómetro de Masas híbrido LQT Orbitrap XL (ThermoFisher, San Jose, CA).



Figura 5. Representación gráfica del proceso realizado para el análisis proteómico de las muestras.

Los experimentos de separación se realizaron utilizando una columna de Zorbax 300SB-C18 (3,5 mm diámetro de partícula; dimensión de la columna 1 mm i.d. x 15 cm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) utilizando los siguientes eluyentes: (A) solución acuosa de ácido fórmico 0.05% (v/v) y (B) acetonitrilo: agua 80: 20 con 0,05% (v/v) solución acuosa de ácido fórmico. El gradiente aplicado fue lineal de 0 a 55% de solvente B en 40 minutos con una ratio de flujo de 80 mL min⁻¹.

El espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap fue operado en modo datos-dependiente en el cual cada escaneado completo MS del espectrómetro de masas (60000 poder de resolución) fue seguido de 3 MS/MS escaneados en los cuales los 3 iones de carga múltiple más intensos fueron dinámicamente seleccionados y fragmentados por disociación inducida por colisión (CID) a una energía de colisión normalizada del 35%. La espectrometría de masa en tandem fue analizado utilizando el software Thermo Proteome Discoverer 1.4, y el SEQUEST cluster (University of Washington, Seattle, WA, licensed by Thermo Electron Corp) como herramienta de búsqueda contra UniProtKb/Swiss-Prot Base de conocimiento de liberación de proteínas 2013-02: 20247 base de datos de proteínas Homo Sapiens.

Para obtener una identificación fiable de los péptidos, se utilizaron rigurosos filtros detallados a continuación: XCorr versus carga, 1,8 y 2,5 para iones cargados doble y triplemente respectivamente, confianza en péptidos de alto valor y tasa de descubrimiento falsa <5%.

Se buscaron datos en busca de tres escisiones perdidas, carbamidometilación fija de cisteínas y oxidación de metioninas como modificación variable. Con el objeto de identificar un patrón proteico para el MC, para este estudio se consideró el panel de proteínas identificadas en al menos una de las muestras con una X score asignada por el software 41.5.

Las proteínas identificadas por SEQUEST fueron analizadas utilizando el software PANTHER (Protein Annotation Through Evolutionary Relationship) (<http://www.pantherdb.org/>).

Para el objeto de este estudio, las anotaciones de Ontología Génica (GO) fueron evaluadas por función molecular en las proteínas comunes.

En líneas generales la GO proporciona una representación informática de nuestro conocimiento científico actual sobre las funciones de los genes (o, más propiamente, las proteínas y moléculas de ARN no codificantes producidas por genes) de muchos organismos diferentes, desde humanos hasta bacterias.

Una anotación de GO es una declaración sobre la función de un gen en particular. Las anotaciones GO se crean asociando un gen o producto génico con un término GO. Juntas, estas declaraciones comprenden una "instantánea" del conocimiento biológico actual. Por lo tanto, las anotaciones GO capturan declaraciones sobre cómo funciona un gen a nivel molecular, en qué parte de la célula funciona y qué procesos biológicos (vías, programas) ayuda a llevar a cabo.

Hay cuatro piezas de información que identifican de forma única una anotación GO. Aunque hay componentes adicionales, como mínimo una anotación consta de: Producto génico (puede ser una proteína, ARN, etc.), Término GO, Referencia, Evidencia.

Las asociaciones de productos genéticos con términos GO son declaraciones que describen:

-La Función molecular, esto es, las actividades moleculares de productos genéticos individuales.

-Los Componentes celulares: donde los productos génicos están activos.

- Los Procesos biológicos: las vías y procesos más amplios a los que contribuye la actividad de ese producto génico.

Las diferencias entre proteínas en cada momento del ciclo fueron también analizadas de acuerdo con las clases de GO por función molecular.

La cuantificación sin etiquetas de proteínas comunes se realizó mediante la cuantificación del cálculo del área de pico durante el análisis bioinformático utilizando el software Proteome Discoverer. Este método de cuantificación se utilizó para obtener una idea de las cantidades relativas de todos los péptidos en una muestra. La aplicación Proteome Discoverer calcula las áreas de péptidos durante el procesado, usándolas para calcular automáticamente las áreas de proteínas en el informe. El cálculo del área de una proteína dada se realiza con el promedio de los tres péptidos distintos más abundantes identificados para la proteína.

Datos analizados:

- ✓ Relación de proteínas
- ✓ Identificación de Proteínas Pico y procesos en los que participan
- ✓ Evolución de las Proteínas Pico
- ✓ Análisis de las proteínas más abundantes
- ✓ Análisis bioinformático de las funciones

- ✓ Cambios en las clases de proteínas
- ✓ Variabilidad en la abundancia de proteínas

Niveles de significación estadística:

Según descrito previamente, se consideró significativo el punto de corte para las proteínas reguladas al alza $\geq 1,5$ y para las proteínas reguladas a la baja $\leq 0,667$ [123].

5.5 Consideraciones éticas.

El diseño del estudio fue aprobado por la Comisión Ética en Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la Universidad Autónoma de Barcelona, Código CEEAH: 3250.

Las participantes dieron su consentimiento informado para la realización del estudio.

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki (última enmienda, 64^a Asamblea General Fortaleza, Brasil, octubre 2013) y a la legislación española vigente (Orden Ministerial SAS/3470/2009, relativa a la realización de estudios observacionales y Ley 14/2007, de investigación biomédica).

El protocolo y el desarrollo del estudio ha seguido las normas del derecho de las participantes que establece el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento y del Consejo, de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas sobre el tratamiento de datos y la libre circulación de estos datos y la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de derechos digitales.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS.

6.1 Identificación y descripción de los tipos de Moco procedentes de la luz del canal cervical desecados al aire.

El patrón cristalográfico propio de cada tipo de secreción permitió identificar los siguientes tipos de Moco: **L**, **S**, **P** y **G** con sus diferentes subtipos como se describe a continuación:

6.1.1 Identificación de Moco L.

En las muestras en las que se ha localizado Moco **L**, siguiendo el criterio de clasificación de Odeblad, se observa una estructura formada por dos elementos: a) Un eje central recto o curvo, y b) Estructuras perpendiculares al eje central (90°) que a su vez pueden presentar una o varias generaciones de brazos más pequeños, perpendiculares entre sí. La variación resultó importante tanto en longitud como en anchura de los ejes y de los brazos. El aspecto global de este Moco es el que generalmente se ha definido como “morfología en helechos” Figura 6.

En ocasiones, algunos de los haces se convierten en ejes de otros helechos. A más aumento se aprecian depósitos de cristales sobre los ejes de los helechos y los brazos. Los helechos se forman a partir de Moco extendido, que se levanta del resto constituyendo esta morfología característica. Sobre los montículos de Moco se van depositando los cristales.

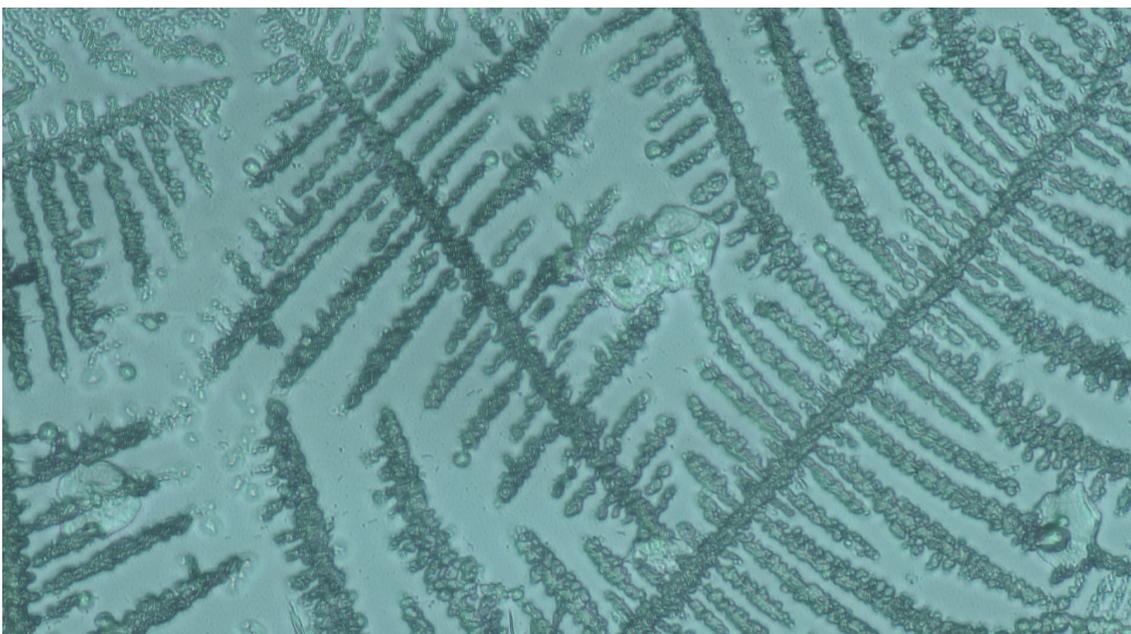


Figura 6. Moco L. Todo el campo está ocupado por figuras semejantes a helechos. Presentan un eje central recto o de morfología curva. De los ejes primarios, nacen otros ejes secundarios también a 90°. Muestra 3.4 ML x 10.

6.1.2 Identificación de Moco S.

Se observaron 3 subtipos de Moco S:

- Moco **S1** fue el tipo más sencillo de Moco S que se observó. Consiste en cristales más o menos poligonales que se disponen en hilera. Los cristales no se encuentran unidos entre sí, pero por su disposición se intuye una linealidad entre ellos. Tanto en este caso como en los siguientes se aprecian zonas amplias donde sólo aparece este tipo de Moco. Con más aumentos se aprecia mejor la disposición de los cristales sueltos, su morfología variable y la presencia, al microscopio de luz de un substrato de Moco abundante sobre el cual se produce la cristalización.
- Moco **S2** presenta una mayor aproximación entre los cristales que se sitúan formando hileras, no existiendo ninguna ramificación. Suelen disponerse estas formando conjuntos de hileras paralelas entre sí y con más aumento se detecta que la hilera de cristales presenta pocas discontinuidades como se aprecia en la Figura 7.
- Moco **S3**, los cristales se observan en hileras de las cuales salen ramificaciones que tienen poca longitud. Estas ramificaciones pueden no presentar otras ramas o tener unas segundas ramas. La longitud del eje de las ramas no supera la longitud del eje central. Es característico que, en todos estos tipos de **S**, no se aprecien los típicos montículos o masas de Moco que sobresalen de la superficie.

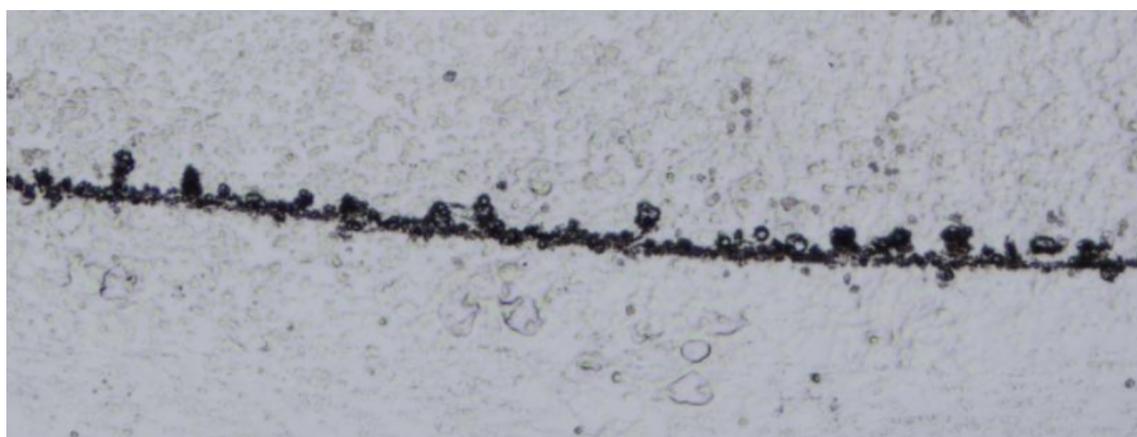


Figura 7. Moco **S2**. Los cristales más o menos circulares, próximos entre si, se disponen en hilera. No aparecen ramificaciones del eje principal. Muestra 3.6 ML x 4.

6.1.3 Identificación de Moco P.

De los cuatro tipos de Moco, el **P** es el que representa una mayor variabilidad en cuanto a subtipos.

Se observaron 5 subtipos de Moco **P**:

- Moco **P6B**. Presenta una simetría hexagonal, con seis ejes bien definidos. La morfología es estrellada, pero los ejes son muy nítidos y las unidades que constituyen son grandes. De los ejes parten ramas con un ángulo de unos 60° . Se observa poca cristalización y el grosor de ramas es variado.
- Moco **P2**. Consiste en un eje central del que salen ramas con un ángulo de 60° a ambos lados de dicho eje. Es una formación bastante frecuente. A veces, ese eje principal se divide a su vez en dos, y así sucesivamente, aunque siempre se mantiene el ángulo de 60° en todas las ramificaciones. Se aprecia perfectamente la elevación sobre el fondo, con pocos cristales. Se puede ver asociado al **L** o al **S**.
- Moco **Pa**. Este Moco presenta también, una simetría radial, pero no tiene ejes bien definidos, de manera que la morfología es estrellada, aun cuando los ejes estén sin definir. Se observa que las ramificaciones que parten del centro tienen todas 60° aproximadamente. Las unidades que forman pueden ser grandes, como en el caso del **P6B**, o mucho más pequeñas. Hay pocos cristales y se observa una mayor ramificación de los haces.
- Moco **P4**. La cristalización presenta dos ejes fundamentales y claramente definidos, cruzados entre sí con un ángulo de 90° . De ellos salen ramificaciones en forma de helecho, con un ángulo de 60° respecto a los ejes centrales. A veces, de estos mismos ejes parten subdivisiones, siendo frecuente encontrar este tipo de Moco junto con los tipos **L** y **Pa**. Los haces presentan diámetro variable y se aprecian cristales en los ejes.
- Moco **Pt**. La forma de las ramificaciones que parten del eje central es triangular. Suele haber un eje central que se va ramificando; tanto el eje como las ramas parecen estar constituidos principalmente por cristales con cierta discontinuidad entre ellos.

En las Figuras 8 y 9 se muestran ejemplos del Moco **P**.

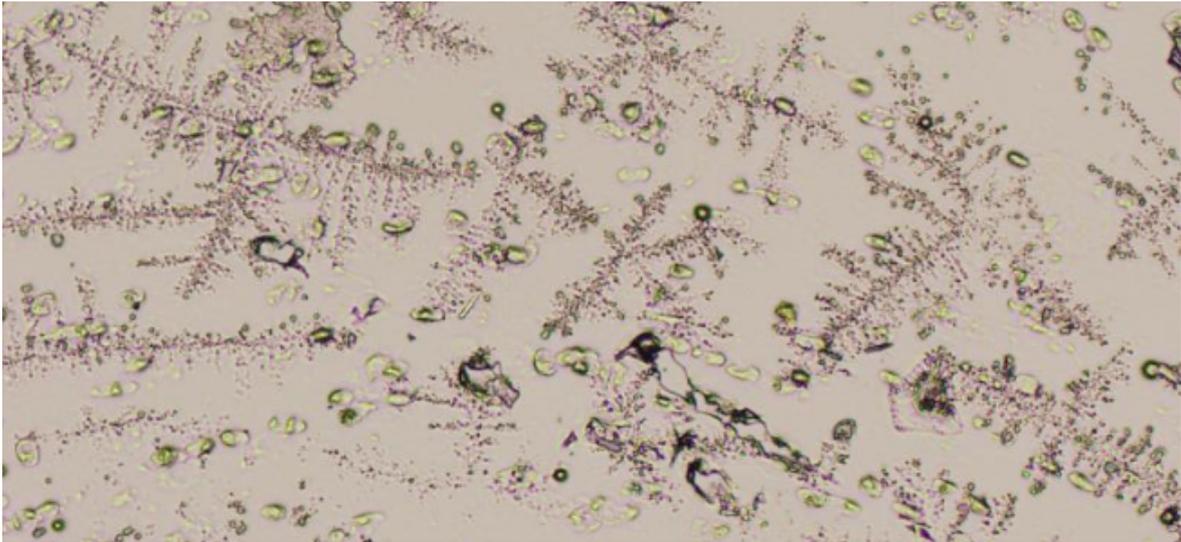


Figura 8. Moco **P6B**. En la parte central de la imagen, un ejemplo de Moco **P6B**, de simetría hexagonal, con 6 ejes asimétricos. De los ejes parten ramas con un ángulo de 60°. Muestra 3.4 ML x 10.

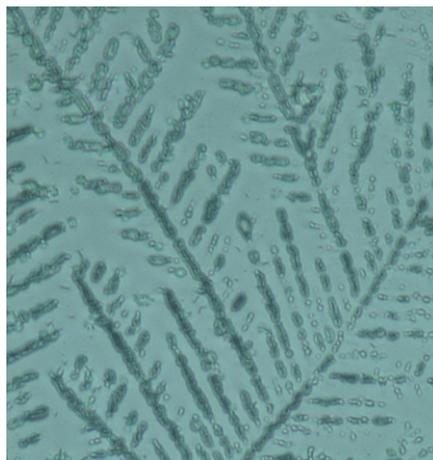


Figura 9. Moco **P**. Detalle de los ejes centrales de los cuales se originan ejes secundarios con un ángulo de 60°. De estos ejes secundarios parten a su vez ramas con ángulo de 60° también. Muestra 3.2 ML x 10.

6.1.4 Identificación de Moco **G**.

El Moco **G** se caracteriza por presentar una alta densidad de cristales, sueltos o en agrupaciones amorfas. En algunos casos, las preparaciones con Moco **G** presentan un elevado contenido celular. Otras veces son simplemente cristales sueltos como se aprecia en las Figuras 10 y 11.

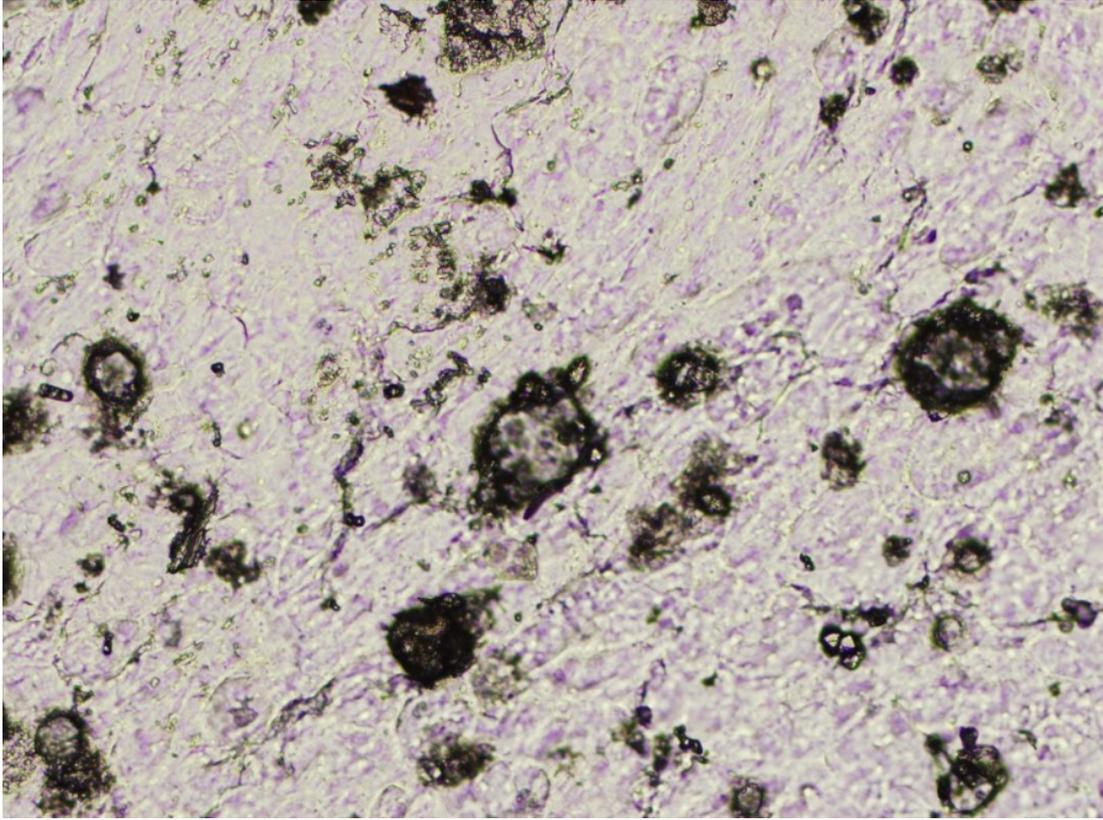


Figura 10. Moco **G**. Se presenta en forma de cristales sueltos, de morfología diversa. Muestra 1.5
ML x 10.

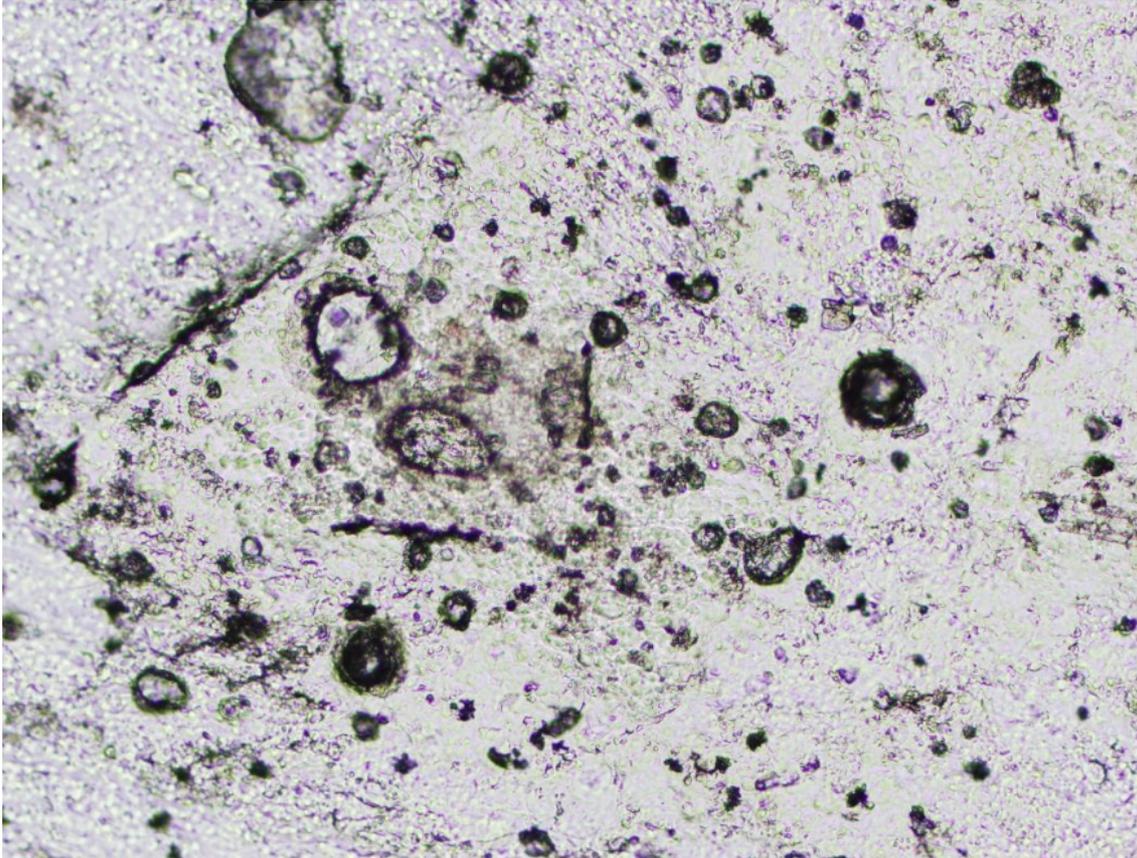


Figura 11. Moco **G**. En las agrupaciones cristalinas no se aprecia morfología concreta.

Muestra 1.5 ML x 10.

6.1.5 Clasificación de las muestras según la fase del ciclo.

Se realizó la clasificación de las muestras atendiendo a la fase del ciclo con la que se correlacionaban, siguiendo el protocolo diseñado por el Profesor Odeblad.

La Tabla 1 recoge los datos más relevantes de las muestras analizadas:

- La edad de las voluntarias
- El número de identificación de la muestra
El número de identificación consta de dos números separados por un punto.
El primer número corresponde al día de la toma de la muestra (1= Día 7, 2= Día 14, 3= Día 18 del ciclo), el segundo, al número de voluntaria (del 1 al 6)
- Los porcentajes de cada tipo de Moco en cada una de las muestras analizadas
- La fase del ciclo a la que pertenece la muestra: Estrogénica (Temprana / Tardía), Ovulatoria (Temprana/ Tardía)

Edad	N° de identificación de la muestra (Día de la toma. N° de voluntaria)	Porcentaje de los diferentes tipos de moco en cada muestra				Fase del ciclo
		G	L	S	P	
28	1.1	100% G				Estrogénico Temprano
	2.1	100% G				Estrogénico Temprano
	3.1	100% G+				Gestagénico
25	1.2	100% G				Estrogénico Temprano
	2.2	50% G	50% L			Estrogénico Tardío
	3.2	85% G	10% L		5% P	Ovulatorio Tardío
27	1.3	100% G				Estrogénico Temprano
	2.3	100% G				Estrogénico Temprano
	3.3	100% G				Estrogénico Temprano
30	1.4	100% G				Estrogénico Temprano
	2.4	100% G				Estrogénico Temprano
	3.4		80% L	16% S	4% P	Ovulatorio Temprano
29	1.5	100% G				Estrogénico Temprano
	2.5	90% G	10% L			Estrogénico Temprano
	3.5	23% G	50% L	15% S	2% P	Ovulatorio Temprano
28	1.6	100% G				Estrogénico Temprano
	2.6	100% G				Estrogénico Temprano
	3.6		80% L	17% S	3% P	Ovulatorio Temprano

Tabla 1. Datos más relevantes de las muestras analizadas con microscopía óptica.

La muestra 3.1 corresponde a fase gestagénica, y según descrito previamente fue descartada para el estudio proteómico.

6.1.6 Identificación de células precursoras Z.

En la observación de las muestras con el microscopio óptico, se hallaron unas células de morfología redondeada, que se mostraban sueltas o en agrupaciones en forma de anillo. Estas células se corresponden con las descritas previamente por el Profesor Odeblad como células precursoras Z [35].

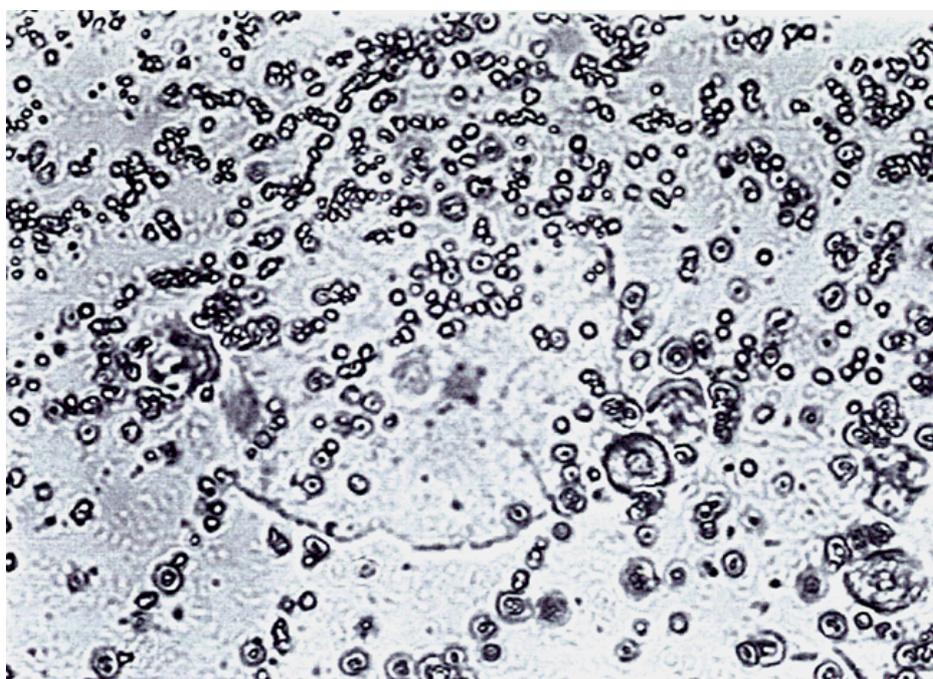


Figura 12. Imagen de la secreción Z incluida en la comunicación del Profesor Odeblad en el III Congreso Internacional en Reconocimiento de la Fertilidad en 2012, en Perú.

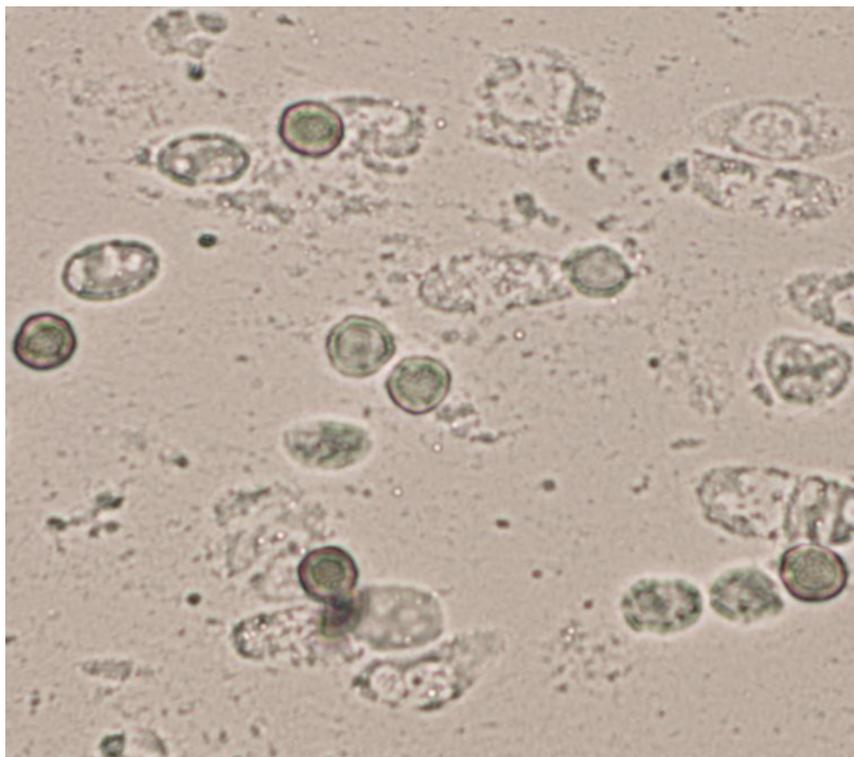


Figura 13. Células precursoras Z de morfología redondeada. Muestra 3.2. ML x 40.

6.2 Análisis proteómico.

De las 18 muestras iniciales, se excluyó del estudio proteómico la muestra que se encontraba en fase gestagénica.

Se realizó el análisis proteómico de las 17 muestras dividiéndolas en tres grupos atendiendo al día en el que fue recogida la muestra:

- ✓ Muestras tomadas el día 7 del ciclo menstrual. Incluye 6 muestras. La totalidad de estas muestras se encuentra en fase estrogénica temprana.
- ✓ Muestras tomadas el día 12. Incluye 6 muestras. La mayoría de estas muestras se encuentra en fase estrogénica temprana.
- ✓ Muestras tomadas el día 18. Incluye 5 muestras. La mayoría de estas muestras se encuentra en fase ovulatoria.

6.2.1 Relación de Proteínas.

La aplicación Proteome Discoverer permite la identificación y cuantificación proteínas a partir de los espectros de masas de péptidos fragmentados digeridos.

El análisis proteómico de todas las muestras de los tres grupos conjuntamente permitió la identificación de un total de 48 proteínas.

El listado completo de las proteínas se informa en la Tabla 2.

Para cada proteína se reporta la siguiente información: Código UniPROT, nombre del Gen, Peso Molecular en kDa, Punto Isoeléctrico y Descripción.

UniPROT	Nombre del Gen	Peso Molecular [kDa]	Punto Isoeléctrico	Descripción
P04217	A1BG	13,2	6,13	Alpha-1B-glycoprotein
P01859	IGHG2	69,3	6,28	Immunoglobulin heavy constant gamma 2
P01860	IGHG3	18,1	8,57	Immunoglobulin heavy constant gamma 3
P01857	IGHG1	14,3	8,75	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
P08311	CTSG	37,6	6,51	Cathepsin G
P02533	KRT14	11,0	5,50	Keratin, type I cytoskeletal 14
P05109	S100A8	16,5	9,16	Protein S100-A8
P01834	IGKC	15,2	8,68	Immunoglobulin kappa constant
P22528	SPRR1B	15,2	7,01	Cornifin-B
P01591	JCHAIN	22,8	6,40	Immunoglobulin J chain
P01876	IGHA1	16,0	7,28	Immunoglobulin heavy constant alpha 1
P02787	TF	53,5	6,10	Serotransferrin
B3EWG3	FAM25A	8,6	5,92	Protein FAM25A
P00751	CFB	13,9	10,32	Complement factor B
P61626	LYZ	11,1	7,56	Lysozyme C
P02511	CRYAB	9,9	8,48	Alpha-crystallin B chain
P35321	SPRR1A	9,9	8,48	Cornifin-A
P04792	HSPB1	11,8	6,52	Heat shock protein beta-1
Q96KK5	HIST1H2AH	10,2	6,99	Histone H2A type 1-H
P13646	KRT13	10,8	7,03	Keratin, type I cytoskeletal 13
P32926	DSG3	11,3	7,87	Desmoglein-3
P04080	CSTB	78,1	8,12	Cystatin-B

P01040	CSTA	13,0	4,84	Cystatin-A
P60709	ACTB	9,3	6,15	Actin, cytoplasmic 1
P06702	S100A9	12,3	8,82	Protein S100-A9
Q07654	TFF3	77,0	7,12	Trefoil factor 3
P02765	AHSG	41,3	7,90	Alpha-2-HS-glycoprotein
P04083	ANXA1	66,0	8,12	Annexin A1
P02788	LTF	60,0	8,00	Lactotransferrin
P05164	MPO	36,1	8,19	Myeloperoxidase
P04264	KRT1	41,7	5,48	Keratin, type II cytoskeletal 1
Q14508	WFDC2	28,8	11,19	WAP four-disulfide core domain protein 2
P19957	PI3	62,3	7,74	Elafin
Q01469	FABP5	35,9	7,59	Fatty acid-binding protein, epidermal
P13647	KRT5	20,1	7,33	Keratin, type II cytoskeletal 5
P01833	PIGR	83,8	8,97	Polymeric immunoglobulin receptor
P19013	KRT4	39,3	5,72	Keratin, type II cytoskeletal 4
P69905	HBA1	51,5	5,16	Hemoglobin subunit alpha
P0CG04	IGLC1	18,1	5,24	Immunoglobulin lambda constant 1
Q9UBG3	CRNN	49,6	4,96	Cornulin
Q9NQ38	SPINK5	13,9	10,89	Serine protease inhibitor Kazal-type 5
P03973	SLPI	57,2	6,61	Antileukoproteinase
P68871	HBB	54,2	5,86	Hemoglobin subunit beta
P23527	HIST1H2BO	120,6	8,06	Histone H2B type 1-O
P02768	ALB	83,2	5,74	Serum albumin
P02538	KRT6A	38,7	7,02	Keratin, type II cytoskeletal 6A
Q9UBC9	SPRR3	85,5	7,06	Small proline-rich protein 3
P59665	DEFA1	107,5	5,00	Neutrophil defensin 1

Tabla 2. Listado de las 48 proteínas identificadas en el análisis proteómico de todas las muestras conjuntamente.

De entre las 48 proteínas identificadas, recogidas en la Tabla 2, se encuentran: cadenas de inmunoglobulina (IGHA1, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGKC, JCHAIN, IGLC1), Neutrophil defensin 1 (DEFA1), WAP four-disulfide core domain protein 2 (WFDC2), Serine protease inhibitor Kazal-type 5 (SPINK5) y Lactotransferrin (LTF) todas ellas implicadas en la inmunidad.

6.2.2. Identificación de las Proteínas Pico (“*Peaking Proteins*”) y procesos biológicos en los que participan.

El algoritmo de búsqueda de picos permitió identificar los datos de espectrometría de masas sin procesar y generar una lista de picos y abundancias relativas.

Los picos representan los fragmentos de péptidos para una masa y carga determinadas. La Tabla 3 recoge el listado de las 11 Proteínas Pico que reveló el análisis conjunto de todas las muestras de los tres grupos.

UniPROT	Nombre del Gen	Descripción
Q9UBC9	SPRR3	Small proline-rich protein 3
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1
P04080	CSTB	Cystatin-B
P22528	SPRR1B	Cornifin-B
P01834	IGKC	Immunoglobulin kappa constant
P05109	S100A8	Protein S100-A8
P02787	TF	Serotransferrin
P02538	KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A
P01857	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
Q9NQ38	SPINK5	Serine protease inhibitor Kazal-type 5
P01833	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor

Tabla 3. Relación de las 11 Proteínas Pico identificadas en el análisis de todas las muestras conjuntamente.

Los procesos biológicos en los que participan las proteínas pico halladas son los siguientes:

- Small proline-rich protein 3 (SPRR3), Cornifin-B (SPRR1B) y Keratin, type II cytoskeletal 6A (KRT6A) están implicadas en la queratinización.
- Cystatin-B (CSTB) y Serine protease inhibitor Kazal-type 5 (SPINK5) son inhibidores de proteasa.
- Heat shock protein beta-1 (HSPB1) participa en el proceso biológico de interacción huésped-virus.
- Immunoglobulin kappa constant (IGKC), Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (IGHG1), Polymeric immunoglobulin receptor (PIGR) y Protein S100-A8 (S100A8) participan de la inmunidad.
- Serotransferrin (TF) que participa en el transporte.

6.2.3 Evolución de las Proteínas Pico.

Para estudiar la evolución de las Proteínas Pico, se analizaron las muestras agrupadas por días de obtención.

La Figura 14 recoge gráficamente la evolución de las 11 Proteínas Pico en los 3 días del ciclo analizados.

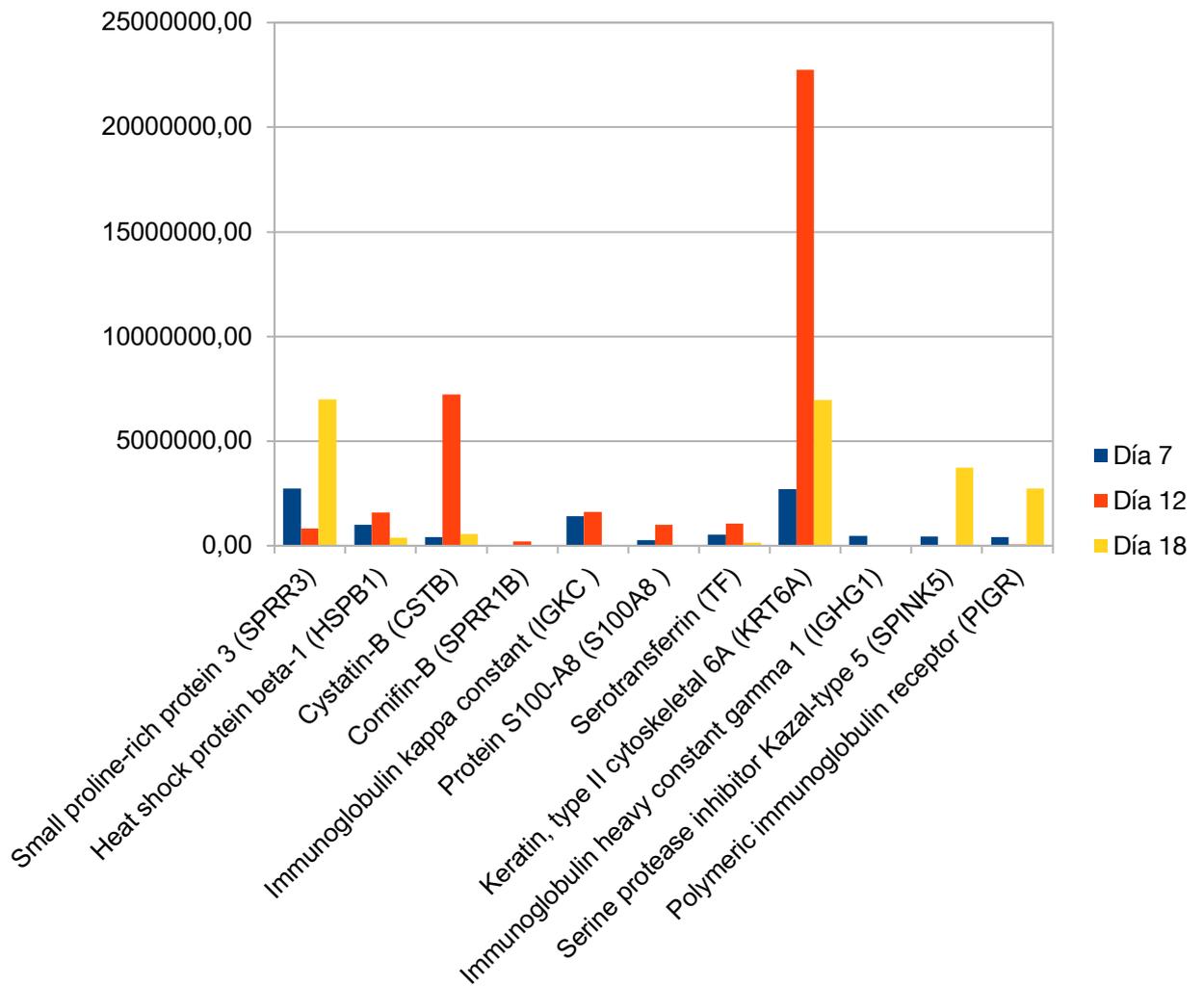


Figura 14. Evolución de las 11 Proteínas Pico a medida que avanza el ciclo.

En proteómica, de acuerdo con lo descrito previamente, una expresión se considera significativamente modificada cuando se produce cambio de $\geq 1,5$ o $\leq 0,667$.

Small proline-rich protein 3 (SPRR3), Serine protease inhibitor Kazal-type 5 (SPINK5) y Polymeric immunoglobulin receptor (PIGR) aumentaron significativamente en las muestras del día 18 del ciclo respecto a las del día 7 y 12. Figura 15.

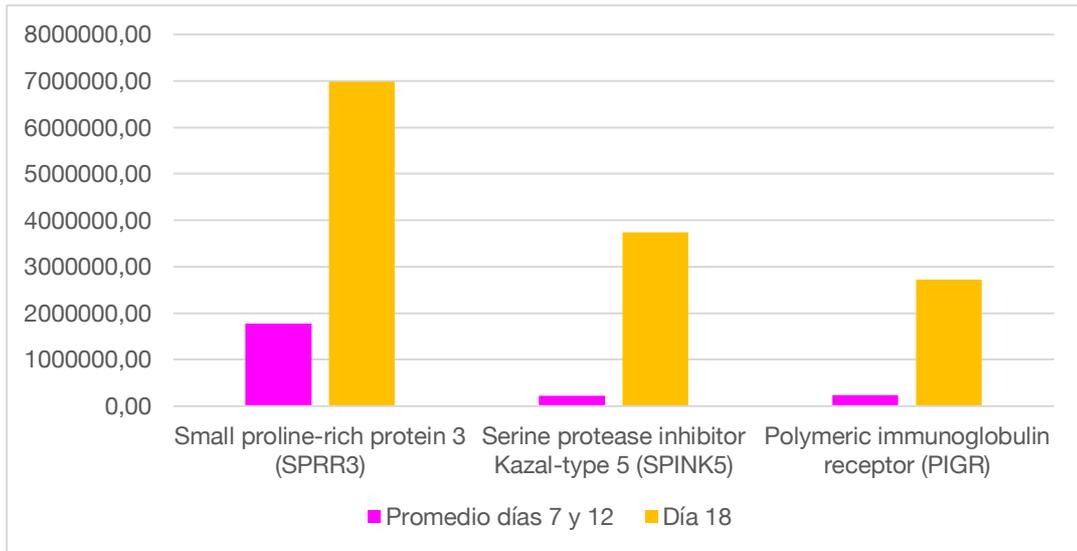


Figura 15 Proteínas Pico que incrementan su abundancia en el día 18 respecto a la abundancia promedio de los días 7 y 12.

Las proteínas pico recogidas en la Figura 16 sin embargo, disminuyeron significativamente el día 18 respecto a los días 7 y 12.

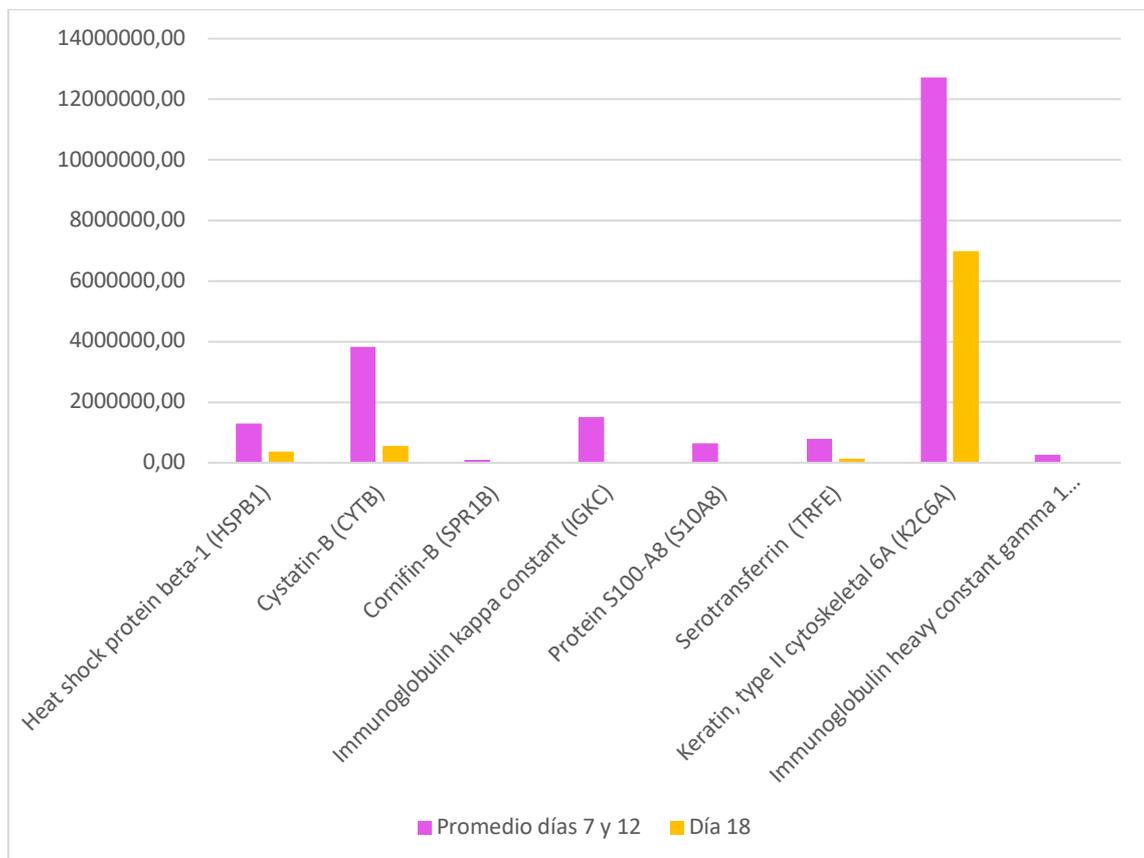


Figura 16. Proteínas Pico que disminuyen su abundancia en el día 18 respecto a la abundancia promedio de los días 7 y 12.

6.2.4 Análisis de las proteínas más abundantes.

Es posible determinar el área de cualquier péptido, realizando la cuantificación del cálculo del área de pico. Este método de cuantificación resulta de utilidad para conocer las cantidades relativas de todos los péptidos en una muestra.

Las 10 proteínas más abundantes halladas en las muestras del día 7 del ciclo, cuando todas las muestras se encontraban en fase estrogénica temprana, se reflejan en la Tabla 4.

UniPROT	Nombre del Gen	Descripción
P19957	PI3	Elafin
P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1
Q9UBG3	CRNN	Cornulin
P69905	HBA1	Hemoglobin subunit alpha
P68871	HBB	Hemoglobin subunit beta
P03973	SLPI	Antileukoproteínase
P23527	HIST1H2BO	Histone H2B type 1-O
P0CG04	IGLC1	Immunoglobulin lambda constant 1
P59665	DEFA1	Neutrophil defensin 1
P02768	ALB	Serum albumin

Tabla 4. Listado de las 10 proteínas más abundantes el día 7 del ciclo.

El día 7 del ciclo no estaban presentes las proteínas que se recogen en la Tabla 5.

UniPROT	Nombre del Gen	Descripción
P22528	SPRR1B	Cornifin-B
P02511	CRYAB	Alpha-crystallin B chain
P02533	KRT14	Keratin, type I cytoskeletal

Tabla 5. Proteínas ausentes el día 7 del ciclo.

Las 10 proteínas más abundantes halladas en el día 12 del ciclo, en el que la mayor parte de las muestras estaban en fase estrogénica temprana se reflejan en la Tabla 6.

UniPROT	Nombre del Gen	Descripción
---------	----------------	-------------

P05164	MPO	Myeloperoxidase
P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1
P0CG04	IGLC1	Immunoglobulin lambda constant 1
Q01469	FABP5	Fatty acid-binding protein, epidermal
Q9UBG3	CRNN	Cornulin
P04080	CSTB	Cystatin-B
P23527	HIST1H2BO	Histone H2B type 1-O
P02768	ALB	Serum albumin
P02538	KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A
P59665	DEFA1	Neutrophil defensin 1

Tabla 6. Listado de las 10 proteínas más abundantes el día 12 del ciclo.

El día 12 del ciclo no estaban presentes las proteínas recogidas en la Tabla 7.

UniPROT	Nombre del Gen	Descripción
P01859	IGHG2	Immunoglobulin heavy constant gamma 2
P04217	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein
Q9NQ38	SPINK5	Serine protease inhibitor Kazal-type 5

Tabla 7. Proteínas ausentes el día 12 del ciclo.

Las 10 proteínas más abundantes halladas en el día 18 del ciclo, cuando la mayoría de las muestras se encontraban en fase ovulatoria, se recogen en la Tabla 8.

UniPROT	Nombre del Gen	Descripción
P0CG04	IGLC1	Immunoglobulin lambda constant 1
Q9UBG3	CRNN	Cornulin
Q9NQ38	SPINK5	Serine protease inhibitor Kazal-type 5
P03973	SLPI	Antileukoproteinase
P68871	HBB	Hemoglobin subunit beta
P23527	HIST1H2BO	Histone H2B type 1-O
P02768	ALB	Serum albumin
P02538	KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A
Q9UBC9	SPRR3	Small proline-rich protein 3
P59665	DEFA1	Neutrophil defensin 1

Tabla 8. Listado de las 10 proteínas más abundantes el día 18 del ciclo.

El día 18 del ciclo no se hallaron trazas de las siguientes proteínas:

UniPROT	Nombre del Gen	Descripción
P01834	IGKC	Immunoglobulin kappa constant
P01857	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
P01859	IGHG2	Immunoglobulin heavy constant gamma 2
P01860	IGHG3	Immunoglobulin heavy constant gamma 3
P08311	CTSG	Cathepsin G
P05109	S100A8	Protein S100-A8
P04217	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein

Tabla 9. Listado de proteínas ausentes el día 18 del ciclo.

Todas las proteínas ausentes el día 18 del ciclo, cuando la mayoría de las muestras estaban en fase ovulatoria, están implicadas en la respuesta inmune.

6.2.5 Análisis bioinformático de las funciones moleculares.

El análisis bioinformático de las funciones moleculares de las proteínas reveló que la mayor parte de los constituyentes del MC el día 7, cuando la totalidad de las muestras se encontraban en fase estrogénica temprana eran proteínas de unión.

El segundo grupo mayoritario eran proteínas que tienen actividad catalítica.

Seguidas de proteínas reguladoras de la función molecular, actividad transportadora y estructural, tal y como recoge la Figura 17.

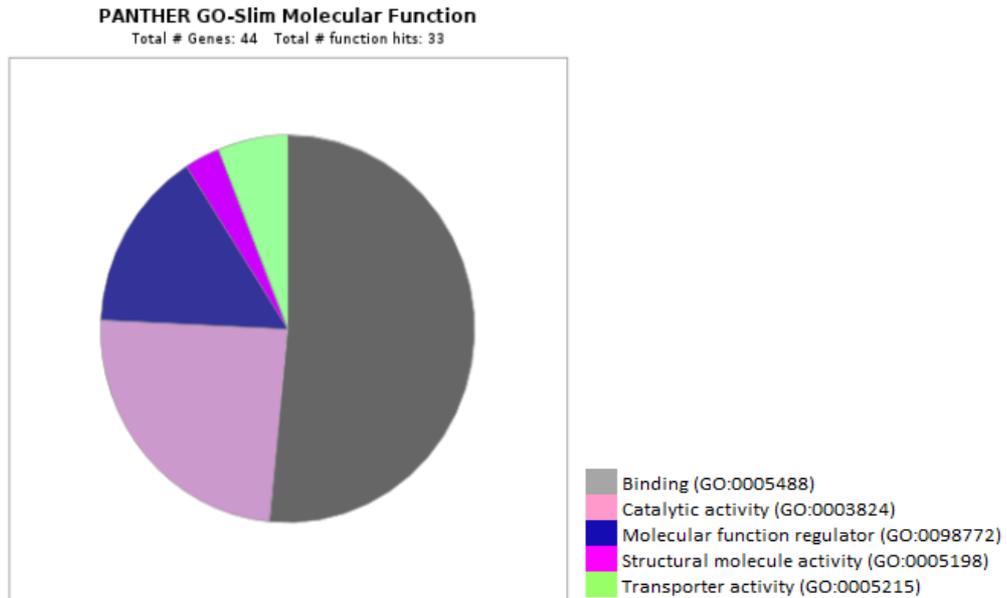


Figura 17. Funciones moleculares de las proteínas presentes el día 7 del ciclo.

El análisis bioinformático de las funciones moleculares de las proteínas, de las muestras del día 12, reflejó también como grupo mayoritario el de las proteínas de unión siendo el segundo grupo mayoritario el de proteínas con actividad catalítica. Los porcentajes, como se refleja en la Figura 18, fueron prácticamente idénticos a los del día 7.

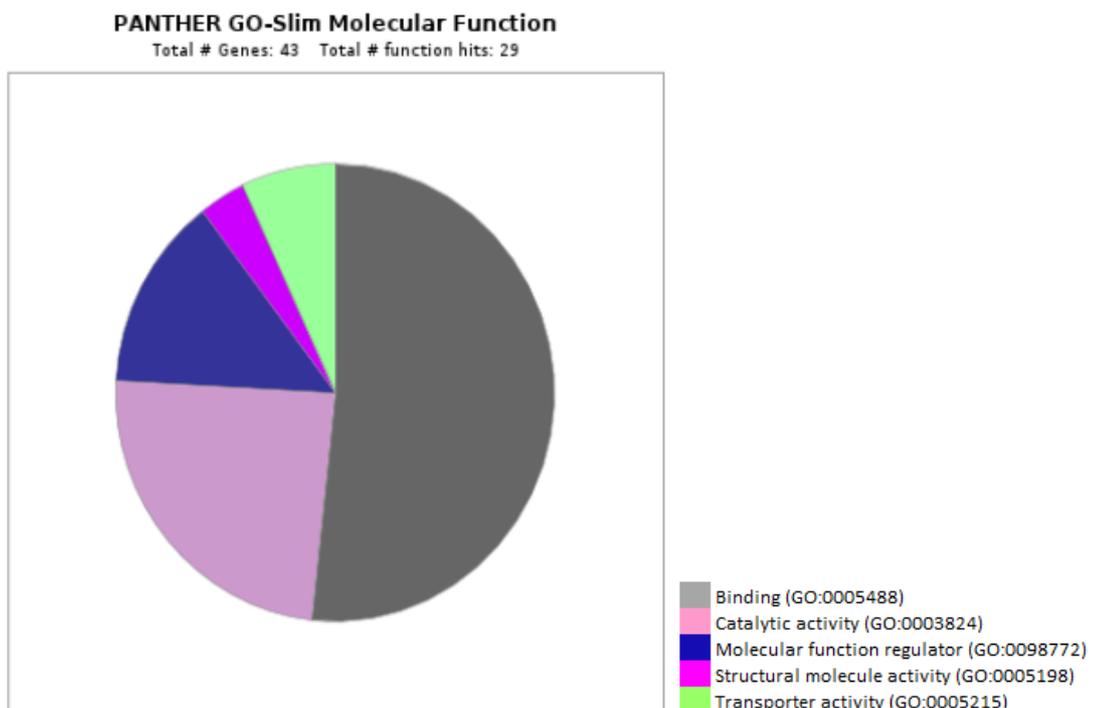


Figura 18. Funciones moleculares de las proteínas presentes el día 12 del ciclo.

El análisis comparativo de las anotaciones GO para la función molecular de las 10 proteínas más abundantes identificadas en el día 18, cuando la mayoría de las muestras se encontraban en fase ovulatoria, reveló un incremento en la actividad catalítica respecto a las fases previas, si bien la actividad de unión seguía siendo la predominante.

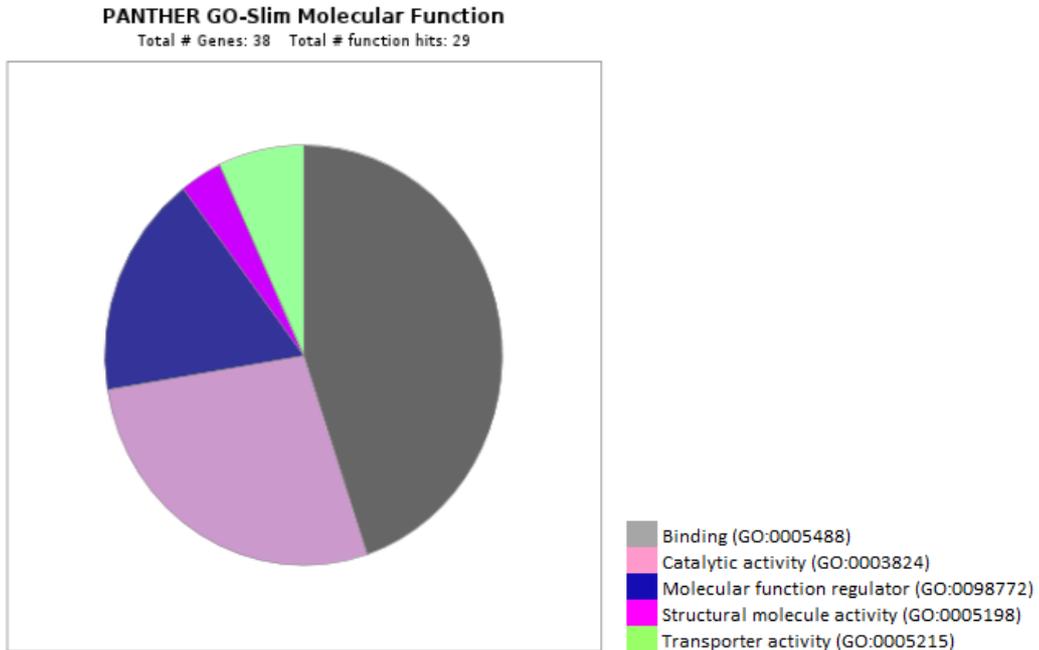


Figura 19. Funciones moleculares de las proteínas presentes el día 18 del ciclo.

La actividad catalítica estaba principalmente relacionada con actividad hidrolítica:

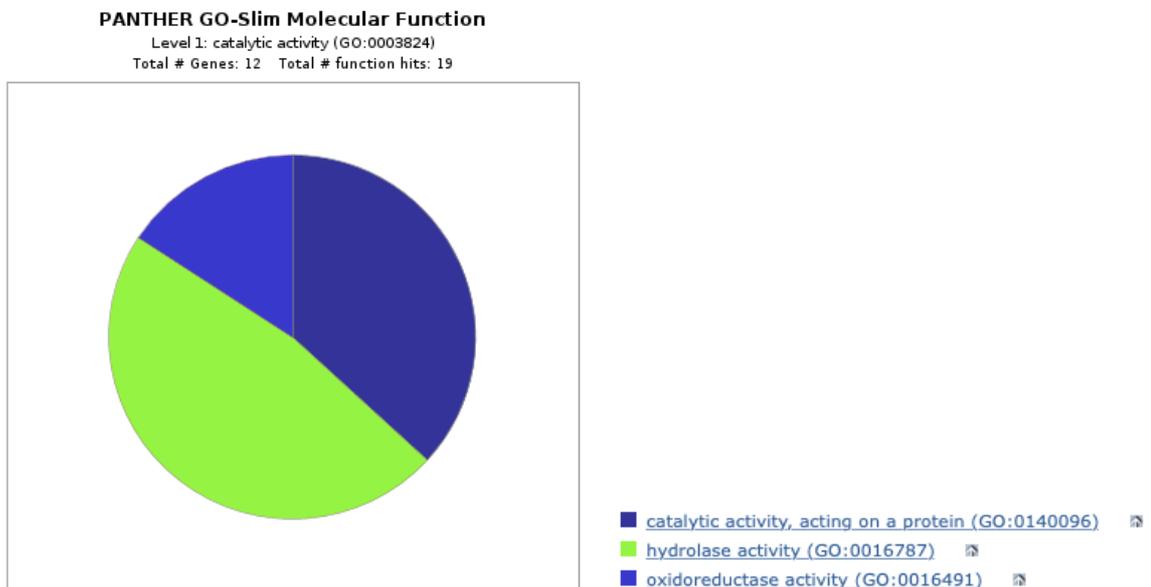


Figura 20. Funciones moleculares de las proteínas con actividad catalítica

6.2.6 Cambios en las clases de proteínas.

El análisis de los cambios producidos en las clases de proteínas, de los días 7,12 y 18, se recogen en la Figura 21.

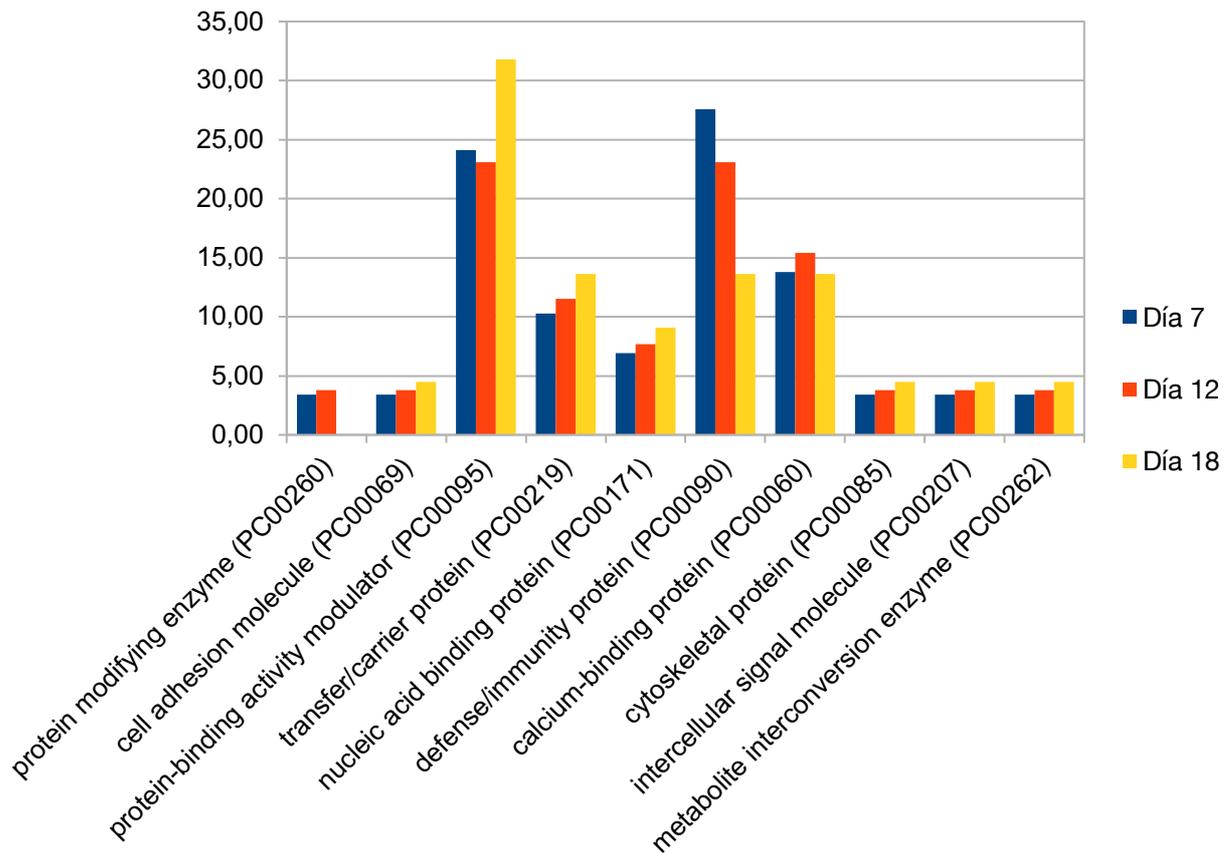


Figura 21. Cambios en las funciones moleculares de las proteínas los 3 días del ciclo analizados.

Las moléculas de adhesión celular (PC00069), las moduladoras de la actividad de unión a proteínas (PC00095), las proteínas de transferencia / portadoras (PC00219), las proteínas citoesqueléticas (PC00085), las moléculas de señal intercelular (PC00207) y la enzima de interconversión de metabolitos (PC00262), presentan un incremento significativo en la fase ovulatoria respecto a la fase estrogénica.

Las enzimas modificadoras de proteínas (PC00260) y las proteínas implicadas en defensa e inmunidad descienden significativamente en la fase ovulatoria respecto a la fase estrogénica.

6.2.7 Variabilidad en la abundancia de proteínas.

Finalmente, se realizó un estudio detallado de cada una de las 48 proteínas totales para analizar posibles cambios significativos en la abundancia de las proteínas.

6.2.7.1 Lisozima.

Los resultados del análisis detallado de la abundancia de Lisozima a medida que avanzaba el ciclo se recogen en la Tabla 10.

UniPROT	Proteína	AUC		
		Día 7	Día 12	Día 18
P61626	Lysozyme C	1.918.232,94	1.482.160,03	302.209,27

Tabla 10. Abundancia de Lisozima en los días 7, 12 y 18 del ciclo. (AUC=Area Under Curve).

Las diferencias en la abundancia de Lisozima de los días 7 y 12 respecto a las muestras del día 18 muestra un descenso significativo.

Esto es, la abundancia de Lisozima cuando la mayor parte de las muestras se encontraban en fase estrogénica temprana fue 5,62 veces superior a la abundancia de Lisozima cuando la mayor parte de las muestras estaban en fase ovulatoria.

La Figura 22 muestra de forma gráfica la abundancia de Lisozima en los 3 días del ciclo analizados.

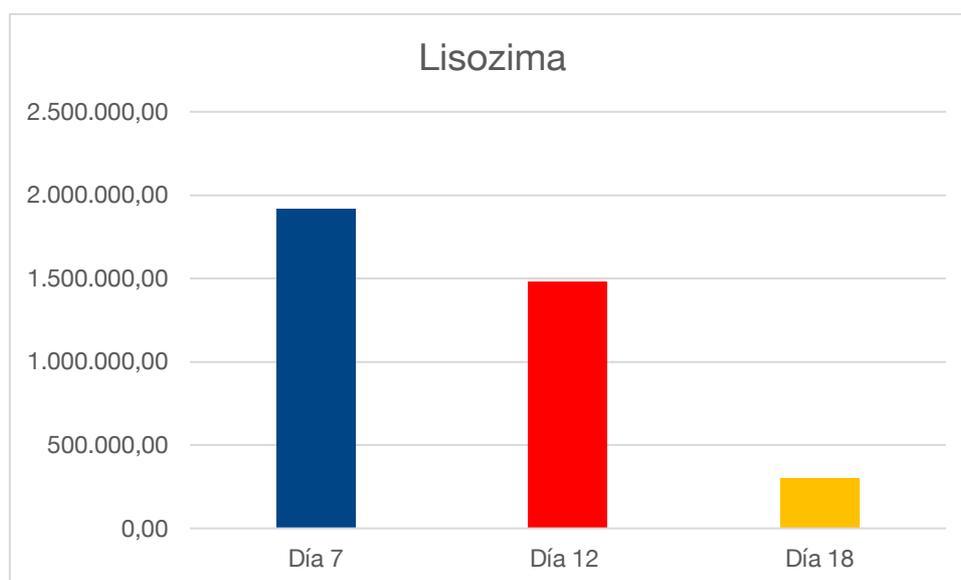


Figura 22. Evolución de la abundancia de lisozima en los diferentes días del ciclo.

6.2.7.2 Resto de proteínas.

Además de la lisozima, otras 17 proteínas disminuyeron también significativamente su abundancia en el día 18 del ciclo respecto a los días 7 y 12, tal y como se recoge en la Tabla 11.

Proteína (Gen)	AUC promedio Días 7 y 12	AUC Día 18	Relación 7-12/18
Ig heavy constant alpha 1 (IGHA1)	1.977.008,21	127.019,13	15,56
Ig J chain (JCHAIN)	1.208.264,13	84.843,26	14,24
Cystatin-B (CSTB)	3.823.259,71	552.580,13	6,92
Serotransferrin (TF)	794.686,08	142.980,29	5,56
Serum albumin (ALB)	25.925.543,74	5.372.608,03	4,83
Actin, cytoplasmic 1 (ACTB)	3.436.615,36	751.360,94	4,57
Cystatin-A (CSTA)	2.358.739,82	560.057,95	4,21
Cornifin-B (SPRR1B)	100.470,65	25.250,47	3,98
Heat shock protein beta-1 (HSPB1)	1.287.808,52	368.725,83	3,49
Protein S100-A9 (S100A9)	2.583.828,17	818.992,75	3,15
Complement factor B (CFB)	727.429,31	247.698,68	2,94
Histone H2A type 1-H (HIST1H2AH)	981.164,83	418.577,76	2,34
Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG)	2.555.222,69	1.161.073,57	2,20
Fatty acid-binding prot, epidermal (FABP5)	4.053.371,09	1.984.479,62	2,04
Myeloperoxidase (MPO)	2.946.378,10	1.505.198,52	1,96
Keratin, type II cytoskeletal 6A (KRT1)	12.724.701,36	6.977.146,99	1,82
Ig lambda constant 1 (IGLC1)	6.078.655,12	3.591.492,56	1,69

Tabla 11. Relación de proteínas que mostraron un descenso significativo en su abundancia en el día 18 del ciclo.

El detalle gráfico de la diferencia en la abundancia de estas 17 proteínas, el día 18 respecto al promedio de los días 7 y 12 se recoge en Figura 23.

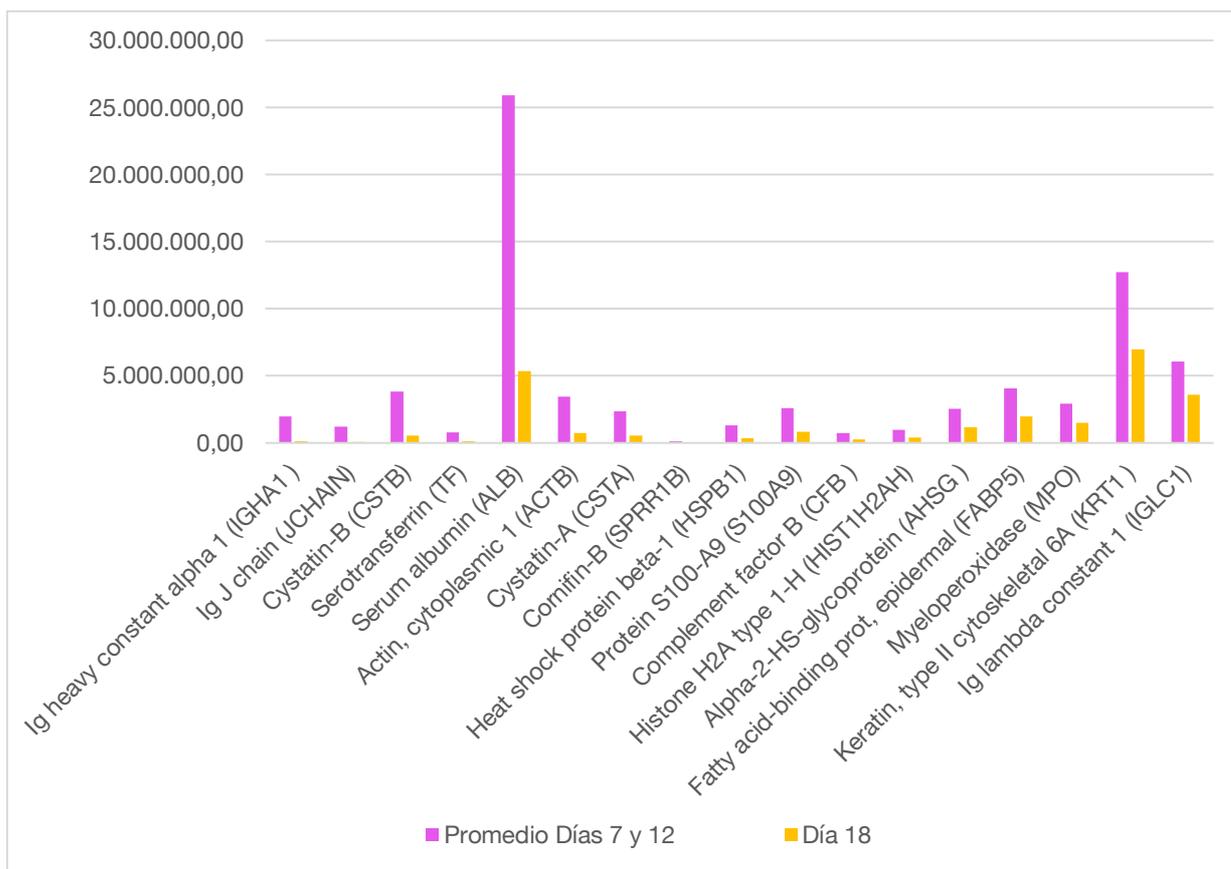


Figura 23. Evolución de las proteínas cuya abundancia disminuyó significativamente en el día 18 respecto a los días 7 y 12 del ciclo.

Ocho proteínas, sin embargo, incrementaron su presencia de una forma significativa en el día 18 del ciclo, tal y como se recoge en la Tabla 12.

Proteína (Gen)	AUC Promedio Días 7 y 12	AUC Día 18	Relación 18/7-12
Serine protease inhibitor Kazal-type 5 (SPINK5)	227.333,17	3.745.483,49	16,48
Polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)	233.878,24	2.720.885,28	11,63
Small proline-rich protein 3 (SPRR3)	1.781.574,34	6.990.860,73	3,92
WAP four-disulfide core domain protein 2 (WFDC2)	810.920,11	1.697.755,30	2,09
Keratin, type II cytoskeletal 4 (KRT6A)	1.517.929,78	3.070.179,83	2,02
Desmoglein-3 (DSG3)	249.307,42	479.092,26	1,92
Trefoil factor 3 (TFF3)	509.799,40	871.692,61	1,71

Keratin, type II cytoskeletal 5 (KRT5)	1.298.095,91	2.202.364,14	1,70
--	--------------	--------------	------

Tabla 12. Relación de proteínas que mostraron un incremento significativo en su abundancia en el día 18 del ciclo.

El detalle gráfico de la evolución de estas 8 proteínas los tres días del ciclo analizados se recoge en Figura 24.

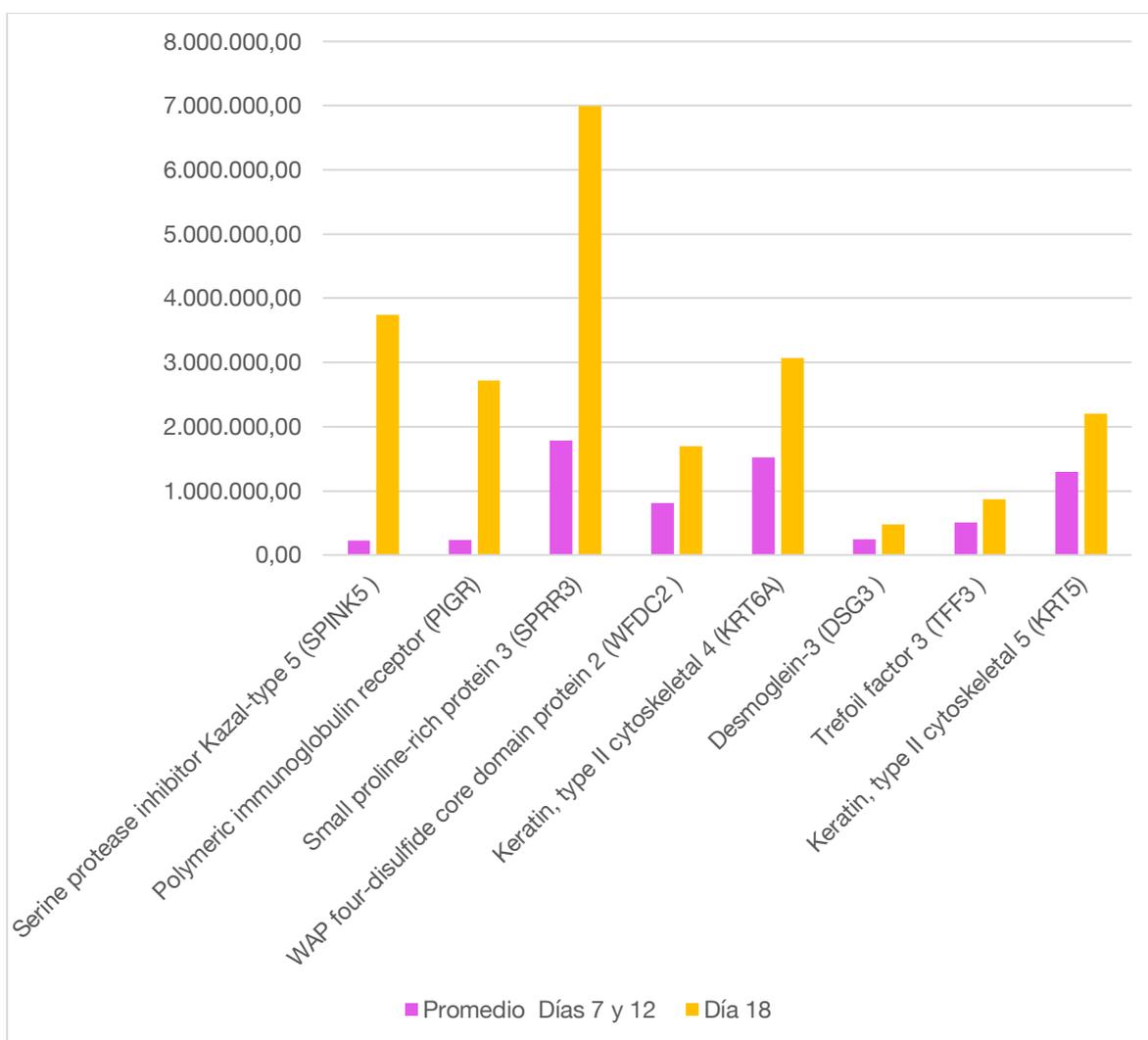


Figura 24. Proteínas cuya abundancia aumentó significativamente en el día 18 respecto a los días 7 y 12 del ciclo.

6.2.7.3 Secreción Z.

Finalmente, se realizó el análisis de la diferencia en la abundancia de proteínas del día 12, día en el que se hallaron muestras de la secreción Z, respecto a los días 7 y 18.

Se hallaron 9 proteínas cuya abundancia era significativamente superior en el día 12, respecto a los días 7 y 18.

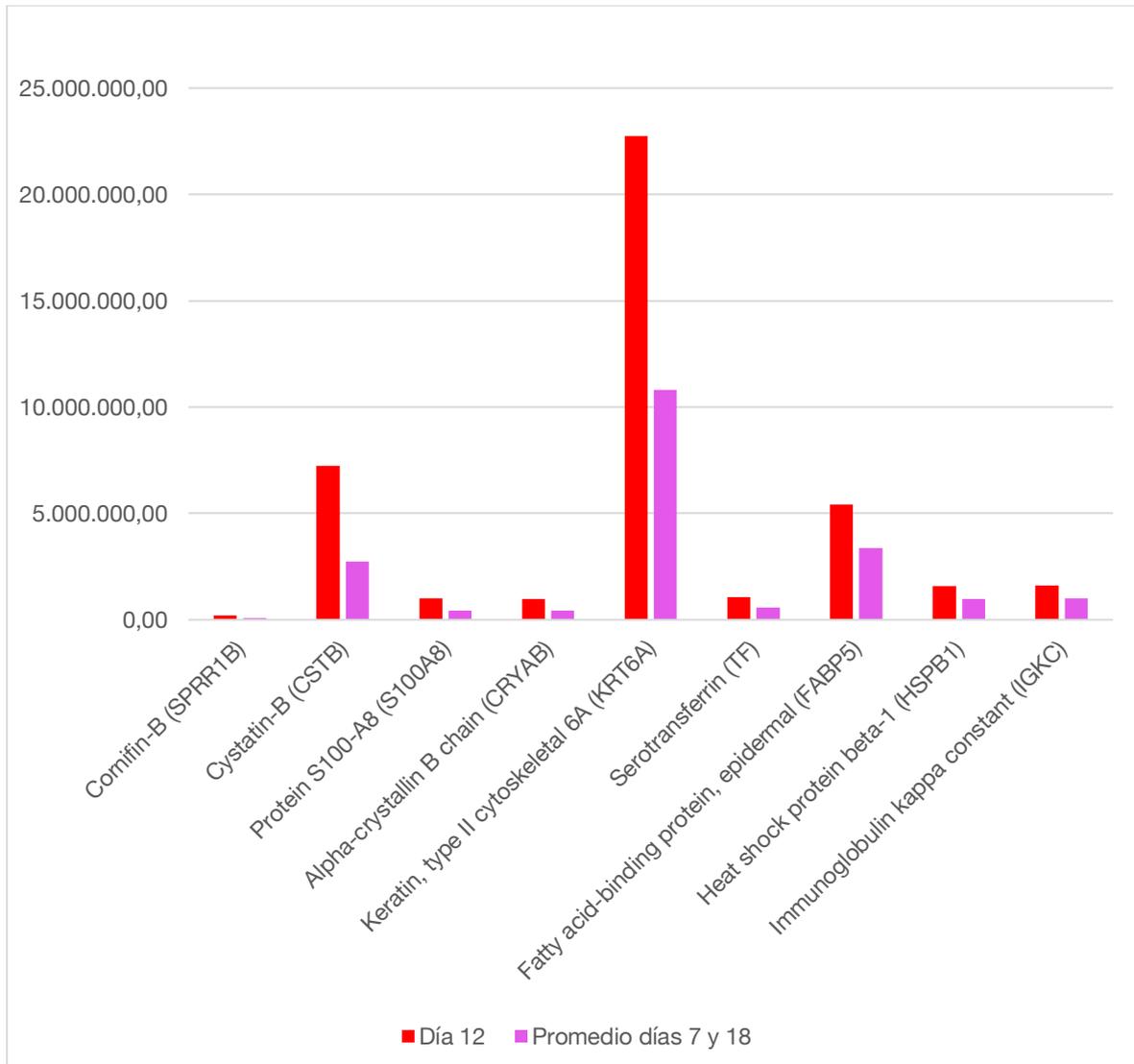


Figura 25. Proteínas cuya abundancia estaba significativamente elevada en el día 12 del ciclo.

A modo de resumen, la Tabla 13, recoge algunos de los resultados más relevantes:

Proteínas más abundantes					
Día 7		Día 12		Día 18	
PI3	Elafin	MPO	Myeloperoxidase	IGLC1	Immunoglobulin lambda constant 1

ACTB	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	CRNN	Cornulin
CRNN	Cornulin	IGLC1	Immunoglobulin lambda constant 1	SPINK5	Serine protease inhibitor Kazal-type 5
HBA1	Hemoglobin subunit alpha	FABP5	Fatty acid-binding protein, epidermal	SLPI	Antileukoproteinase
HBB	Hemoglobin subunit beta	CRNN	Cornulin	HBB	Hemoglobin subunit beta
SLPI	Antileukoproteinase	CSTB	Cystatin-B	HIST1H2BO	Histone H2B type 1-O
HIST1H2BO	Histone H2B type 1-O	HIST1H2BO	Histone H2B type 1-O	ALB	Serum albumin
IGLC1	Immunoglobulin lambda constant 1	ALB	Serum albumin	KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A
DEFA1	Neutrophil defensin 1	KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A	SPRR3	Small proline-rich protein 3
ALB	Serum albumin	DEFA1	Neutrophil defensin 1	DEFA1	Neutrophil defensin 1

Proteínas ausentes

Día 7		Día 12		Día 18	
SPRR1B	Cornifin-B	IGHG2	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	IGKC	Immunoglobulin kappa constant
CRYAB	Alpha-crystallin B chain	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
KRT14	Keratin, type I cytoskeletal	SPINK5	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	IGHG2	Immunoglobulin heavy constant gamma 2
				IGHG3	Immunoglobulin heavy constant gamma 3
				CTSG	Cathepsin G
				S100A8	Protein S100-A8
				A1BG	Alpha-1B-glycoprotein

Proteínas con cambios significativos en su abundancia

Día 7		Día 12		Día 18	
		Incremento significativo		Incremento significativo	
		SPRR1B	Cornifin-B	SPINK5	Serine protease inhibitor Kazal-type 5
		CSTB	Cystatin-B	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor
		S100A8	Protein S100-A8	SPRR3	Small proline-rich protein 3
		CRYAB	Alpha-crystallin B chain	WFDC2	WAP four-disulfide core domain protein 2

		KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A	KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 4
		TF	Serotransferrin	DSG3	Desmoglein-3
		FABP5	Fatty acid-binding protein, epidermal	TFF3	Trefoil factor 3
		HSPB1	Heat shock protein beta-1	KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5
		IGKC	Immunoglobulin kappa constant		
				Descenso significativo	
				LYZ	Lysozyme C
				IGHA1	Ig heavy constant alpha 1
				JCHAIN	Ig J chain
				CSTB	Cystatin-B
				TF	Serotransferrin
				ALB	Serum albumin
				ACTB	Actin, cytoplasmic 1
				CSTA	Cystatin-A
				SPRR1B	Cornifin-B
				HSPB1	Heat shock protein beta-1
				S100A9	Protein S100-A9
				CFB	Complement factor B
				HIST1H2AH	Histone H2A type 1-H
				AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein
				FABP5	Fatty acid-binding prot, epidermal
				MPO	Myeloperoxidase
				KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 6A
				IGLC1	Ig lambda constant 1

Tabla 13. Resumen de algunos de los resultados más relevantes.

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN.

Numerosas investigaciones se han centrado en la búsqueda de un parámetro bioquímico, preovulatorio, que permita identificar la ovulación, con suficiente antelación y así definir, con mayor exactitud, la ventana de fertilidad combinada.

Se ha sugerido que enzimas como la lisozima, un agente perteneciente a la inmunidad general del cuerpo y presente en el MC, podría considerarse, entre otros, uno de los parámetros bioquímicos preovulatorios como elemento clave en la fertilidad.

En el presente estudio se ha analizado la evolución del MC durante los días 7,12 y 18 de un mismo ciclo.

El análisis con microscopía de luz de las muestras de MC cuidadosamente distribuidas en portaobjetos y secadas (sin fijación, sin tinción), ha permitido identificar los patrones cristalográficos de los principales tipos de MC denominados L, S, P y G que han coincidido con los ya descritos previamente en la literatura [28,33].

Con la finalidad de determinar la fase del ciclo en el que se encontraba cada muestra, se aplicó la metodología definida por el profesor Odeblad [26]. Se calculó en cada muestra, el porcentaje de los diversos tipos de MC, haciendo una extrapolación sobre la gráfica patrón. Los porcentajes obtenidos de los diferentes tipos de moco han sido similares a los hallados en estudios previos [33].

La totalidad de las muestras tomadas el día 7 del ciclo menstrual y la mayoría de las muestras tomadas el día 12 se correspondieron con la fase estrogénica temprana.

La mayoría de las muestras tomadas el día 18 se correspondieron con la fase ovulatoria. Estos resultados coinciden con los hallazgos de estudios recientes según los cuales la ovulación sucedió en torno al día 18 del ciclo [19].

Las observaciones realizadas confirmarían que existen cambios cíclicos en la cristalización del moco, en función del día del ciclo al cual pertenece la muestra.

El estudio microscópico permitió así mismo, la identificación de una secreción llamada Z producida por las glándulas del istmo uterino y cuyo conocimiento hasta el momento es limitado [35].

La investigación de la fisiología humana, en particular en fluidos biológicos, se ha beneficiado del rápido desarrollo de la tecnología proteómica. Gracias a esta eficaz herramienta ahora es posible la identificación de nuevos potenciales biomarcadores para el pronóstico, terapia y diagnóstico, así como la caracterización integral de la composición proteómica en diferentes aspectos clínicos, incluida la reproducción [91].

La composición proteómica del MC se ha investigado en pocos estudios. Probablemente sea menos compleja que la de la orina y la del plasma, sin embargo, aún se desconoce con exactitud cómo el proteoma del MC sufre cambios cíclicos y el número de proteínas que contiene [30].

Las modificaciones en el proteoma del MC durante las diferentes fases del ciclo menstrual fueron analizadas por primera vez en 2015 por Grande et al., utilizando espectrometría de masas de alta resolución, implementada mediante herramientas cuantitativas. El enfoque proteómico reveló diferencias en la expresión de varias proteínas del MC durante el ciclo menstrual, que están involucradas en la inflamación, la actividad estructural y el sistema de defensa [30].

El análisis proteómico de las muestras del presente estudio ha permitido la identificación de 48 proteínas. 21 de las 48 proteínas identificadas en esta investigación coinciden con las 38 descritas como proteínas constitutivas del MC en el estudio realizado por Grande et al. Esta variabilidad puede deberse a la normal variabilidad inter e intraindividual que puede existir en mujeres sanas [30].

De entre las 48 proteínas identificadas, cabe destacar, la presencia de cadenas de Inmunoglobulinas (IGHA1, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGKC, JCHAIN, IGLC1), Neutrophil defensin 1 (DEFA1), WAP four-disulfide core domain protein 2 (WFDC2), Serine protease inhibitor Kazal-type 5 (SPINK5) y Lactotransferrin (LTF), que sugieren la importancia del papel defensivo del MC, hallazgo que coincide con los estudios previos [30,72,75,76,83].

El estudio permitió la identificación de 11 Proteínas Pico. Del análisis de las mismas, destaca que Small proline-rich protein 3 (SPRR3), Serine protease inhibitor Kazal-type 5 (SPINK5) y Polymeric immunoglobulin receptor (PIGR) aumentaron significativamente en las muestras del día 18 del ciclo respecto a los días 7 y 12. El resto disminuyeron significativamente en el día 18 respecto a los días 7 y 12.

Small proline-rich protein 3 (SPRR3) que está implicada en el proceso de queratinización, estaba presente entre las proteínas constitutivas del MC descritas por Grande et al. [30].

El análisis de las proteínas más abundantes y ausentes cada día del ciclo reforzaría los hallazgos previos sobre los cambios que experimenta el MC en su composición bioquímica durante el ciclo.

El análisis bioinformático de las funciones moleculares de las proteínas reveló que la mayor parte de los constituyentes del MC los días 7 y 12 del ciclo cuando la mayor parte de las muestras se correspondían con la fase estrogénica, eran proteínas de unión (53%). El segundo grupo mayoritario fueron proteínas que tienen actividad catalítica

(23%). En el día 18 del ciclo, cuando la mayoría de las muestras se encontraban en fase ovulatoria, las proteínas de unión representaron un 45% y las proteínas con actividad catalítica un 28%.

El análisis bioinformático de las funciones moleculares de las proteínas comunes presentes durante todo el ciclo realizado por Grande et al., reveló que el 67% de los constituyentes del MC tiene una actividad catalítica y unión, si bien al mirar la globalidad del ciclo el grupo mayoritario era el de las proteínas de unión [30].

El día 18 del ciclo, cuando la mayoría de las muestras estaban en fase ovulatoria se produjeron una serie de cambios en la composición proteica del MC:

1- Referentes a su abundancia:

18 proteínas disminuyeron significativamente su abundancia en el día 18 del ciclo respecto a los días 7 y 12.

Son las siguientes: Ig heavy constant alpha 1 (IGHA1), Ig J chain (JCHAIN), Cystatin-B (CSTB), Serotransferrin (TF), Serum albumin (ALB), Actin cytoplasmic 1 (ACTB), Cystatin-A (CSTA), Cornifin-B (SPRR1B), Heat shock protein beta-1 (HSPB1), Protein S100-A9 (S100A9), Complement factor B (CFB), Histone H2A type 1-H (HIST1H2AH), Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG), Fatty acid-binding prot, epidermal (FABP5), Myeloperoxidase (MPO), Keratin, type II cytoskeletal 6A (KRT1), Ig lambda constant 1 (IGLC1).

Ocho proteínas incrementaron su presencia de una forma muy significativa en el día 18 del ciclo: Serine protease inhibitor Kazal-type 5 (SPINK5), Polymeric immunoglobulin receptor (PIGR), Small proline-rich protein 3 (SPRR3), WAP four-disulfide core domain protein 2 (WFDC2), Keratin type II cytoskeletal 4 (KRT6A), Desmoglein-3 (DSG3), Trefoil factor 3 (TFF3), Keratin type II cytoskeletal 5 (KRT5).

Estos hallazgos resultan de gran interés dado que han permitido identificar 26 proteínas susceptibles de convertirse en parámetros preovulatorios, en biomarcadores de la ovulación.

2- Referentes a las clases de proteínas:

Las moléculas de adhesión celular (PC00069), las moduladoras de la actividad de unión a proteínas (PC00095), las proteínas de transferencia / portadoras (PC00219), las proteínas citoesqueléticas (PC00085), las moléculas de señal intercelular (PC00207) y la

enzima de interconversión de metabolitos (PC00262), presentan un incremento en el día 18 respecto a los días 7 y 12 del ciclo.

Sin embargo, las enzimas modificadoras de proteínas (PC00260) y las proteínas implicadas en defensa e inmunidad (PC00090) descienden significativamente en el día 18 del ciclo respecto a los días 7 y 12.

3- Referentes al número de proteínas halladas:

Del total de las 48 proteínas halladas, sólo 40 estaban presentes el día 18 del ciclo.

Estos resultados confirman los resultados de estudios previos donde la mayoría de las enzimas descritas en el MC muestran un patrón cíclico, con un descenso en el número de proteínas de 3 a 5 días previos a la ovulación [81]. Las modificaciones químicas del MC durante la ovulación incluyen la disminución de ciertas proteínas solubles [82].

Resulta además muy destacable el hecho de que, 7 de las 8 proteínas ausentes el día 18 del ciclo están implicadas en la respuesta inmune. Esto es, el día 18 del ciclo cuando la mayoría de las muestras estaban en fase ovulatoria, la abundancia de inmunoglobulinas y otros elementos implicados en la defensa del organismo resulta ser inferior al de los días 7 y 12. En este sentido, Odeblad afirmaba que el mayor contenido de inmunoglobulinas y defensas, en general, contra las infecciones se encuentra en el Moco G, presente en un porcentaje casi absoluto en las fases de infertilidad del ciclo [124].

Estos hallazgos pueden dar respuesta a la pregunta de por qué el sistema inmunitario no reacciona destruyendo los espermatozoides, siendo como son extraños al organismo femenino.

Es decir, los cambios coordinados que se producen en la composición bioquímica del MC, permiten específicamente la entrada a un cuerpo extraño como es el espermatozoide.

El MC bloquea la entrada al útero de organismos extraños. Sin embargo, este bloqueo es selectivo, y permite el acceso a los espermatozoides en determinadas fases del ciclo.

Es más, los espermatozoides que por sí solos morirían en horas, gracias a los cambios en la composición proteica del MC propio de la fase ovulatoria sobreviven acantonados en las criptas cervicales hasta 5 días, preparados para dirigirse hacia la parte más distal de la trompa de Falopio en caso de producirse la ovulación [14].

Gracias al análisis proteómico se ha podido observar la evolución de la lisozima a medida que avanzaba el ciclo, durante los días 7,12 y 18 del mismo.

El carácter básico de la lisozima, y las fuertes interacciones que genera, han dificultado su determinación especialmente en matrices biológicas complejas como el MC, en el que sólo pequeñas cantidades de muestras están disponibles.

Los resultados ponen en evidencia que la lisozima desciende de forma significativa el día 18 del ciclo, en el que la mayoría de las muestras estaban en fase ovulatoria, respecto a los días 7 y 12.

Estos hallazgos constatan los hallazgos de estudios previos, en los que la lisozima, mostraba un descenso preovulatorio seguido de un ascenso posovulatorio [82].

Esta situación lleva a plantear 4 preguntas y que pueden orientar futuras investigaciones.

1. ¿Cuál puede ser la causa del descenso de la lisozima?

Sin duda, este descenso se debería al efecto que producen las hormonas en las concentraciones de las proteínas del MC tal y como se recoge en estudios previos.

El estrógeno reduce los niveles de proteína y lisozima, mientras que la progesterona los eleva [80].

Las proteínas totales disminuyen en el momento de la ovulación y aumentan, antes y especialmente después de la menstruación, probablemente como resultado de la acción de los estrógenos sobre las glándulas cervicales [80].

En un ciclo menstrual, los folículos ováricos seleccionados producen niveles crecientes de estradiol. Los niveles de estradiol, producidos por el folículo dominante, se elevan a niveles máximos. Coincidiendo con el momento del ciclo en el que se produce el rápido aumento y la disminución de los estrógenos y el comienzo del aumento de la progesterona, se muestra un mínimo pronunciado de inmunoglobulinas, complemento C'3, inhibidores de proteinasas, albúmina y lisozima en el MC, que es más receptivo a la penetración de los espermatozoides en este momento [125]. Los niveles de albúmina alcanzan los valores más bajos en el momento de la ovulación, y las globulinas también disminuyen en ese momento y aumentan antes y después de la menstruación [80].

Diversos estudios sobre fosfatasa alcalina, amino peptidasa, esterasa, lactato deshidrogenasa y guaiacol peroxidasa han demostrado que la concentración de todos estos enzimas es alta durante la fase folicular, y desciende precipitadamente tres o cuatro días antes del pico de la LH [82].

El nivel más bajo de enzimas se alcanza normalmente el día de la subida de la LH. Al día siguiente, hay un significativo y brusco aumento en la concentración de éstas, que se mantiene durante la fase lútea.

2. ¿Por qué la lisozima? ¿Por qué no la lactoferrina, por ejemplo, con la que tiene una capacidad sinérgica?

Hay evidencias de que la lactoferrina tienen una actividad antimicrobiana significativa cuando la lisozima está presente [126,127].

Cuando la lactoferrina y la lisozima están juntas tienen propiedades antimicrobianas sinérgicas. La lactoferrina tiene un dominio catiónico que permite aumentar la capacidad de la lisozima para matar las bacterias. La lactoferrina se une a los lipopolisacáridos de la membrana externa colaborando en la disrupción de la membrana y permitiendo a la lisozima un mejor acceso a la capa de peptidoglicano de las bacterias Gram-positivas [128], y a la matriz de proteoglicano de las bacterias Gram-negativas [126]. En conjunto lactoferrina y lisozima demuestran una capacidad sinérgica para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como efectos aditivos contra amebas [129]. Sin embargo, las variaciones de lactoferrina en los tres días del ciclo analizados no son significativas. En este punto, es interesante destacar que la lactoferrina ha sido descrita como una de las 83 proteínas identificadas en el análisis proteómico de plasma seminal de hombres fértiles [130]. La lactoferrina, que se identificó por primera vez en el plasma seminal humano en 1966 [131], tiene un papel antibacteriano, antioxidante y modulador inmunológico en el plasma seminal. También participa en el mantenimiento de la estructura y la motilidad normales de los espermatozoides y en la modulación de la composición y calidad del semen durante la maduración y migración de los espermatozoides a través del tracto genital masculino [132,133]. Se ha demostrado que el aumento de la concentración de lactoferrina en situaciones de leucocitospermia, oligospermia y astenospermia es beneficioso para reducir la concentración de leucocitos, aumentar la motilidad de los espermatozoides y mejorar la calidad del semen [132-134]. Un estudio reciente in vitro demostró que la presencia de lactoferrina no afectó negativamente la viabilidad o la motilidad de los espermatozoides, al contrario, promovió la capacitación espermática in vitro [135].

Las combinaciones pareadas de lisozima-lactoferrina, inhibidor de la proteasa leucocitaria secretor de lisozima (SLPI) y lactoferrina-SLPI fueron sinérgicas. La triple combinación de lisozima, lactoferrina y SLPI mostró una sinergia aún mayor. En este estudio SLPI también estuvo presente en los 3 días del ciclo analizados sin diferencias significativas en su concentración entre los diferentes días analizados. SLPI también se ha descrito como proteína presente en el plasma seminal [136].

De acuerdo con estudios previos, la lisozima podría trabajar de forma sinérgica con la lactoferrina y las inmunoglobulinas en la actividad antimicrobiana [137].

Las 4 inmunoglobulinas IGHHG1, IGHHG2, IGHHG3, IGKC que están presentes en nuestras muestras en el día 7 y que, sin embargo, desaparecen en el día 18, curiosamente no están en el estudio en el que se listan 923 proteínas del plasma seminal. Sin embargo, IGHA1, JCHAUN y ANXA1 que están presentes en el día 7 y persisten en el 18, si están presentes en dicho análisis proteómico [136].

Esto es, las variaciones en la composición proteica de las proteínas del MC en la fase ovulatoria podrían producirse específicamente para permitir la permeabilidad espermática y de acuerdo con la composición del plasma seminal. Permaneciendo sólo los elementos de defensa que no producen efectos negativos sobre el plasma seminal y los espermatozoides.

Las interacciones del MC y los espermatozoides, especialmente con respecto a la penetración de los espermatozoides, son de especial relevancia para la Salud Reproductiva [138].

3. ¿Quién sería el responsable de estos cambios en la inmunidad?

De nuevo encontramos la respuesta en las variaciones hormonales.

Las proteínas del MC, cuya secreción se ve afectada por la acción de las hormonas en el receptor cervical, juegan un papel en la determinación de la permeabilidad del MC a los espermatozoides.

En el caso de los peces, por ejemplo, está bien documentado que los estrógenos, los xenoestrógenos y otras hormonas esteroideas podrían alterar varios aspectos de la respuesta inmune, como la fagocitosis, los niveles de inmunoglobulinas, la actividad bactericida y la producción de óxido nítrico [139-142].

4. ¿Pueden tener estos hallazgos alguna aplicación en nuestra práctica clínica?

Los estudios realizados muestran que existen cambios a nivel bioquímico en el MC y que pueden ser medidos. De acuerdo con los resultados de este estudio y otros previos, la lisozima puede ser un excelente parámetro bioquímico preovulatorio.

La lisozima, ha sido ampliamente estudiada en diferentes ámbitos, y teniendo en cuenta que la ovulación ocurre generalmente en las siguientes veinticuatro a treinta y seis horas tras el pico de estrógenos [143], parece plausible encontrar una aplicación clínica que provea de un método de predicción de la ovulación fiable y permita medir con la mayor exactitud posible la ventana de fertilidad combinada.

Finalmente, el estudio centró su atención en las muestras del día 12.

De entre las observaciones al microscopio óptico de una de las muestras del día 12 destacó la aparición de unos gránulos de morfología redondeada que aparecían sueltos. Esta secreción granular había sido descrita por Odeblad como células precursoras Z (z de enZyme) [35].

El análisis global de las muestras del día 12, en el que estaban presentes las células precursoras de Z, reveló la presencia de 9 proteínas significativamente elevadas respecto a los días 7 y 18: Cornifin-B (SPRR1B), Cystatin-B (CSTB), Protein S100-A8 (S100A8), Alpha-crystallin B chain (CRYAB), Keratin, type II cytoskeletal 6A (KRT6A), Serotransferrin (TF), Fatty acid-binding protein, epidermal (FABP5), Heat shock protein beta-1 (HSPB1), Immunoglobulin kappa constant (IGKC).

De entre ellas, cabe destacar, Heat shock protein beta-1 (HSPB1) y Serotransferrin (TF) que funcionan como chaperonas moleculares, probablemente manteniendo las proteínas desnaturalizadas en un estado de plegamiento competente. A través de su actividad de chaperonas moleculares pueden regular numerosos procesos biológicos. Heat shock protein beta-1 (HSPB1) desempeña un papel en la resistencia al estrés y la organización de la actina. Serotransferrin (TF) está implicada en la regulación positiva de la motilidad y la proliferación celular. Los estudios muestran que la concentración de Serotransferrin (TF) en plasma seminal se correlaciona con el recuento de espermatozoides y con el porcentaje de espermatozoides móviles. Tanto es así que, en los individuos infértiles estudiados los niveles de Serotransferrin (TF) fueron significativamente inferiores [144-145].

Según los estudios realizados por el Profesor Odeblad, esta secreción Z que es producida por las glándulas (o criptas) del istmo uterino, probablemente no responda a estímulos hormonales, y seguramente pueda contener otras enzimas o sustancias bioquímicas [31]. Su implicación en varias actividades enzimáticas hace que esta secreción resulte de suma importancia.

En 1994 Odeblad describe que la actividad mucolítica del Moco P está afectada por estos pequeños gránulos de aproximadamente 1 μm de diámetro que se adhieren al Moco P. Los gránulos probablemente contienen varios enzimas, uno de los cuales tiene actividad mucolítica [35].

El profesor Odeblad sostenía que los gránulos producto de esta secreción, se unen al moco P, con una función enzimática mucolítica, dando origen al Moco Pa (a de actividad).

La actividad enzimática mucolítica, de dichos gránulos, podría descomponer lentamente todos los tipos de moco y pudieran tener así una función reguladora de la actividad del moco, quizás importante en la migración y la selección de los espermatozoides [28].

Aunque se desconoce la naturaleza exacta de este proceso mucolítico y las propiedades bioquímicas de este enzima, en líneas generales, los gránulos enzimáticos producidos por las células Z maduras, serían absorbidos por el MC de tipo **P** para formar **Pa**= Moco P mucolíticamente activo para facilitar el ascenso espermático [31].

Pa entraría en contacto con el Moco **L** y **S**, liquidificando este tipo de Moco, de modo que los espermatozoides pueden ascender guiados por el Moco **P6**. Los gránulos podrían también contener un factor activador de la motilidad de los espermatozoides. Este factor activador pudiera ser la Serotransferrin (TF).

En el presente estudio, se han evidenciado los cambios cíclicos que sufre el MC, tanto a nivel biofísico como bioquímico.

El MC es una excelente fuente de biomarcadores proteicos. Las variaciones cíclicas de las enzimas cérvico vaginales, debidas a las variaciones hormonales, las convierten en parámetros que pueden permitir anticipar la ovulación de forma fiable. En el presente estudio se identificaron 26 proteínas susceptibles de convertirse en parámetros preovulatorios, de entre los cuales cabría destacar la lisozima.

También se ha constatado que la abundancia de inmunoglobulinas y otras proteínas implicadas en la defensa, disminuye significativamente en el momento de la ovulación.

Las variaciones en la composición proteica de las proteínas del MC en la fase ovulatoria podrían producirse específicamente para permitir la permeabilidad espermática y de acuerdo con la composición del plasma seminal. Esto explicaría además que, en presencia de MC propio de la fase ovulatoria, el espermatozoide que por sí sólo moriría en horas, pueda sobrevivir hasta 3 o incluso 5 días [14].

El análisis bioinformático de las funciones moleculares de las proteínas reveló que la mayor parte de los constituyentes del MC eran proteínas de unión y proteínas con actividad catalítica.

El estudio microscópico permitió la identificación de células precursoras Z producidas por las glándulas del istmo uterino. El estudio proteómico de las muestras entre las que se encontraban las muestras de células precursoras Z ha revelado un aumento significativo en la abundancia de 9 proteínas, entre ellas Heat shock protein beta-1 (HSPB1).

Limitaciones

La presente investigación presenta algunas limitaciones. Aparentemente podría considerarse una limitación el número de muestras realizadas, no obstante, en la mayor parte de estudios realizados en este campo se ha utilizado un número similar de muestra poblacional. Hay que resaltar que la muestra coincide con el primer estudio de proteómica realizado en MC [30].

La agrupación de las muestras según el día de toma de la muestra para el estudio proteómico, no ha permitido definir con exactitud la posible composición proteica de las células precursoras de Z.

Fortalezas

Hasta dónde llega nuestro conocimiento, no consta en la literatura un estudio previo que correlacione el análisis con microscopio óptico y proteómico en muestras de MC. Esta correlación ha permitido identificar y analizar las células precursoras de Z.

El presente estudio es uno de los pocos estudios proteómicos realizados en MC.

Aportaciones de esta tesis al conocimiento científico

Los resultados del presente estudio reforzarían los hallazgos previos en los que se evidenciaban cambios cíclicos del MC:

- A nivel biofísico, los cambios producidos en su cristalización, han permitido identificar los patrones cristalográficos de los principales tipos de MC, y con ello la fase del ciclo al que pertenecía cada muestra.
- A nivel bioquímico, se han evidenciado cambios en su composición proteica.

En este estudio, en el que la ovulación se produjo en torno al día 18 del ciclo, se identificaron 26 proteínas susceptibles de convertirse en parámetros preovulatorios, en biomarcadores de la ovulación, de entre los cuales cabría destacar la lisozima.

Las variaciones cíclicas en la composición proteica del MC podrían estar determinadas por las variaciones hormonales que se producen durante el ciclo.

Teniendo en consideración que la ovulación ocurre generalmente en las siguientes veinticuatro a treinta y seis horas tras el pico de estrógenos, parece plausible encontrar una aplicación clínica que provea de un método de predicción de la ovulación fiable y permita medir con la mayor exactitud posible la ventana de fertilidad combinada.

También se ha constatado que la abundancia de inmunoglobulinas y otras proteínas implicadas en la defensa, disminuye significativamente en el momento de la ovulación. Hecho que permitiría explicar por qué el sistema inmunitario no reacciona destruyendo los espermatozoides, siendo como son extraños al organismo femenino.

Las variaciones en la composición proteica de las proteínas del MC en la fase ovulatoria podrían producirse específicamente para permitir la permeabilidad espermática y de acuerdo con la composición del plasma seminal. Permaneciendo sólo los elementos de defensa que no producen efectos negativos sobre el plasma seminal y los espermatozoides. Es más, los cambios en la composición del MC en esta fase serían los responsables de permitir que los espermatozoides -que por sí solos morirían en unas pocas horas- puedan sobrevivir acantonados en las criptas hasta 5 días.

El análisis bioinformático de las funciones moleculares de las proteínas reveló que la mayor parte de los constituyentes del MC eran proteínas de unión y proteínas con actividad catalítica.

El estudio microscópico permitió la identificación de células precursoras Z producidas por las glándulas del istmo uterino. El estudio proteómico de las muestras entre las que se encontraban las muestras de células precursoras Z ha revelado un aumento significativo en la abundancia de 9 proteínas, entre ellas Heat shock protein beta-1 (HSPB1) que desempeña un papel en la resistencia al estrés y Serotransferrin (TF) que está implicada en la regulación positiva de la motilidad y proliferación celular. La concentración de Serotransferrin (TF) se correlaciona con el porcentaje de espermatozoides móviles.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES.

1. La enzima lisozima experimentó un descenso significativo en su abundancia durante los primeros días del ciclo menstrual.
2. El análisis de las variaciones de la abundancia de las proteínas cervicales durante los primeros días del ciclo menstrual, evidenció un descenso significativo en la abundancia de dieciocho proteínas y un incremento significativo en ocho proteínas.
3. La lisozima, un agente perteneciente a la inmunidad general del cuerpo, presente en el MC, podría considerarse, junto con otros, un posible biomarcador de la ovulación.
4. Se detecta la presencia de células precursoras de Z en una de las muestras de MC observadas al microscopio óptico. Se identificaron diferencias en la composición de las muestras. En la muestra en la que estaban presentes las células precursoras de Z se evidenciaba la presencia de proteínas cuya abundancia estaba significativamente elevada.

9. LÍNEAS DE FUTURO

9. LÍNEAS DE FUTURO.

Los resultados de la búsqueda sistemática de la evidencia científica que ha resultado de la presente investigación, junto con los resultados del profundo análisis cristalográfico, y proteómico, permiten sugerir nuevos campos de estudio tales como:

- Seguir profundizando en el conocimiento del MC, para definir con exactitud su composición proteica, sus variaciones a lo largo del ciclo y la variabilidad entre mujeres sanas y con diferentes patologías ginecológicas, será un factor clave en el ámbito de la salud reproductiva y ginecológica.
- El estudio combinado del MC con el plasma seminal, sería de especial relevancia en el ámbito de la fertilidad. La proteómica es una herramienta clave para seguir progresando en su conocimiento.
- El estudio de las células Z, su composición proteica y su mecanismo de acción, será sin duda de enorme interés en el ámbito de la fertilidad.

Como en el resto de los ámbitos de la medicina, descubrir el funcionamiento natural de los procesos biológicos es esencial para detectar, diagnosticar y tratar posibles alteraciones de la salud ginecológica y reproductiva.

10. BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Chandra A, Martinez GM, Mosher WD, Abma JC, Jones J. Fertility, family planning, and reproductive health of U.S. women: data from the 2002 National Survey of Family Growth. *Vital Health Stat.* 2005;23:1-160.
- [2] Stanford JB, White GL, Hatasaka H. Timing intercourse to achieve pregnancy: current evidence. *Obstet Gynecol.* 2002;100:1333-41.
- [3] Odeblad E. The functional structure of human cervical mucus. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1968;47:57-79.
- [4] Moghissi KS, Syner FN, Evans TN. A composite picture of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;114:405-18.
- [5] Wolf DP, Blasco L, Khan MA, Litt M. Human cervical mucus. IV. Viscoelasticity and sperm penetrability during the ovulatory menstrual cycle. *Fertil Steril.* 1978;30:163-69.
- [6] Morales P, Roco M, Vigil P. Human cervical mucus: relationship between biochemical characteristics and ability to allow migration of spermatozoa. *Hum Reprod.* 1993;8:78-83.
- [7] Adamopoulos DA, Kapolla N, Abrahamian A, Dessypris A, Nicopoulou S, Giannacodemos G. Sex steroids in cervical mucus of spontaneous or induced ovulatory cycles. *Steroids.* 2000;65:1-7.
- [8] Daunter B. Biochemical and functional structural aspects of human cervical mucus. *Scan Electron Microsc.* 1984;1:343-58.
- [9] Lundberg O. Abstracts of the 34rd annual meeting of the european society of human reproduction and embryology. *Hum Reprod.* 2018;33:i1-i541.
- [10] Dunson DB, Colombo B, Baird DD. Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Hum Reprod.* 2002;17:1399-403.

- [11] Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci.* 2011;124:229-36.
- [12] Colombo B, Masarotto G. Daily Fecundability. *Dem Res.* 2000;06:3-5.
- [13] Bigelow JL, Dunson DB, Stanford JB, Ecochard R, Gnath C, Colombo B. Mucus observations in the fertile window: a better predictor of conception than timing of intercourse. *Hum Reprod.* 2004;19:889-92.
- [14] Wilcox AJ, Dunson D, Baird DD. The timing of the "fertile window" in the menstrual cycle: day specific estimates from a prospective study. *BMJ.* 2000;321:1259-62.
- [15] Fehring RJ, Schneider M, Raviele K. Variability in the phases of the menstrual cycle. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 2006;35:376-84.
- [16] Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci.* 2011;124:229-36.
- [17] Treloar AE, Boynton RE, Behn BG, Brown BW. Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Int J Fertil.* 1967;12:77-126.
- [18] Lenton EA, Landgren B, Sexton L. Normal variation in the length of the luteal phase of the menstrual cycle: identification of the short luteal phase. *BJOG.* 1984;91:685-89.
- [19] Bull JR, Rowland SP, Scherwitzl EB, Scherwitzl R, Danielsson KG, Harper J. Real-world menstrual cycle characteristics of more than 600,000 menstrual cycles. *NPJ Digit Med.* 2019;2:83.
- [20] Evans-Hoeker E, Pritchard DA, Long DL, Herring AH, Stanford JB, Steiner AZ. Cervical mucus monitoring prevalence and associated fecundability in women trying to conceive. *Fertil Steril.* 2013;100:1033-38.
- [21] Billings EL, Brown JB, Billings JJ, Burger HG. Symptoms and hormonal changes accompanying ovulation. *Lancet.* 1972;1:282-84.

- [22] Insler V, Melmed H, Eichenbrenner I, Serr D, Lunenfeld B. The cervical score. *Int J Gynaecol Obstet.* 1972;10:223-28.
- [23] Katz DF, Slade DA, Nakajima ST. Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Adv Contracept.* 1997;13:143-51.
- [24] Elstein M, Moghissi KS, Borth R. Cervical mucus in human reproduction. WHO Colloquium. Geneva. 1972. Copenhagen. Scriptor.1973.
- [25] Odeblad E. Biophysical techniques of assessing cervical mucus and microstructure of cervical epithelium. World Health Organization Colloquium. Geneva.1972.
- [26] Odeblad E, Ingelman-Sundberg A, Hallstrom L, Hoglund A, Lapanen U, Rudolfsson-Asberg K, et al. The biophysical properties of the cervical-vaginal secretions. *Int Rev Nat Fam Plann.* 1983;7:1-56.
- [27] Ryder B, Campbell H. Natural family planning in the 1990s. *Lancet.* 1995;346:233-4.
- [28] Odeblad E. Cervical mucus and their functions. *J Ir Coll Physicians Surg.* 1997;26:27-32.
- [29] Elstein M. Functions and physical properties of mucus in the female genital tract. *Br Med Bull.* 1978;34:83-8.
- [30] Grande G, Milardi D, Vincenzoni F, Pompa G, Biscione A, Astorri AL. Proteomic characterization of the qualitative and quantitative differences in cervical mucus composition during the menstrual cycle. *Mol BioSyst.* 2015;11:1717-25.
- [31] Odeblad E. Recent research on cervical mucus. *Avanc Regul Nat Fer Univ. Málaga.*1992(printed 1994);88-91.
- [32] Odeblad E. Physical properties of cervical mucus. In "Mucus in Health and Disease." *Adv Exp Med Biol.* 1977;89:217-25.

- [33] Menarguez M, Pastor LM, Odeblad E. Morphological characterization of different human cervical mucus types using light and scanning electron microscopy. *Hum Reprod.* 2003;18:1782-89.
- [34] Odeblad E. Micro-NMR in high permanent magnetic fields. *Acta Obst Gyn Scand.* 1966;45:1-188.
- [35] Odeblad E. The discovery of different types of cervical mucus and the Billings Ovulation Method. *Bull Nat Fam Plan Counc Vic.* 1994;21:1-35.
- [36] Gipson IK, Spurr-Michaud S, Moccia R, Zhan Q, Toribara N, Ho SB, Gargiulo AR, Hill JA. 3rd. MUC4 and MUC5B transcripts are the prevalent mucin messenger ribonucleic acids of the human endocervix. *Biol Reprod.* 1999;60:58-64.
- [37] Gipson IK, Moccia R, Spurrmichaud S, Argueso P, Gargiulo AR, Hill JA, et al. The amount of MUC5B mucin in cervical mucus peaks at midcycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:594-600.
- [38] Wolf DP, Sokoloski JE, Litt M. Composition and function of human cervical mucus. *Biochim Biophys Acta.* 1980;630:545.
- [39] Brunelli R, Papi M, Arcovito G, Bompiani A, Castagnola M, Parasassi T, et al. Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J.* 2007;21:3872-76.
- [40] Elstein M. Cervical mucus: its physiological role and clinical significance. *Adv Exp Med Biol.* 1982;144:301-18.
- [41] Yudin AI, Hanson FW, Katz DF. Human cervical mucus and its interaction with sperm: a fine-structural view. *Biol Reprod.* 1989;40:661-71.
- [42] Chantler E, Sharma R, Sharman D. Changes in cervical mucus that prevent penetration by spermatozoa. *Symp Soc Exp Biol.* 1989;43:325.
- [43] Katz DF, Slade DA, Nakajima ST. Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Adv Contraception.* 1997;13:143-51.

- [44] Ginsburg KA, Wolf NA, Fidel PL. Potential effects of midcycle cervical mucus on mediators of immune reactivity. *Fertil Steril*. 1997;67:46-50.
- [45] Wolman I, Gal TB, Jaffa AJ. Cervical mucus status can be accurately estimated by transvaginal ultrasound during fertility evaluation. *Fertil Steril*. 2009;92:1165.
- [46] Thijssen A, Meier A, Panis K, Ombelet W. Fertility Awareness-Based Methods and subfertility: a systematic review. *Facts Views Vis Obgyn*. 2014;6:113-23.
- [47] Billings EL, Westmore A. *The Billings Method*. 9th edn. Ann O'Donovan. Melbourne Publishing. 2011.
- [48] Parrilla JJ, Delgado JL. Métodos naturales de regulación de la fertilidad: perspectivas actuales. Ventajas e inconvenientes. *Prog Obstet Ginecol*. 1997;40:82-102.
- [49] Curlin M, Bursac D. Cervical mucus: from biochemical structure to clinical implications. *Front Biosci*. 2013;5:507-15.
- [50] Fehring RJ. Accuracy of the peak day of cervical mucus as a biological marker of fertility. *Contraception*. 2002;66:231-5.
- [51] Scarpa B, Dunson DB. Bayesian selection of predictors of conception probabilities across the menstrual cycle. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2006;20:30-7.
- [52] Hilgers TW, Prebil AM. The ovulation method - vulvar observations as an index of fertility/infertility. *Obstet Gynecol*. 1979;53:12-22.
- [53] Pallone SR, Bergus GR. Fertility awareness-based methods: another option for family planning. *J Am Board Fam Med*. 2009;22:147-57.
- [54] Bilian X, Heng Z, Shang-Chun W, Xiao-Ping J, Chang-Hai H, Wen-Qi S, et al. Conception probabilities at different days of menstrual cycle in Chinese women. *Fertil Steril*. 2010;94:1208-11.
- [55] Colombo B, Masarotto G. Daily fecundability: first results from a new data base. *Demogr Res*. 2000;3:39.

- [56] Mikolajczyk RT, Stanford JB. Measuring fecundity with standardised estimates of expected pregnancies. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2006;20:43-50.
- [57] Gnoth C, Frank-Herrmann P, Bremme M, Freundl G, Godehardt E. How do self-observed cycle symptoms correlate with ovulation?. *Zentralbl Gynakol.* 1996;118:650-4.
- [58] Frank-Herrmann P, Gnoth C, Baur S, Strowitzki T, Freundl G. Determination of the fertile window: reproductive competence of women--European cycle databases. *Gynecol Endocrinol.* 2005;20:305-12.
- [59] Frank-Herrmann P, Heil J, Gnoth C, Toledo E, Baur S, Pyper C, et al. The effectiveness of a fertility awareness based method to avoid pregnancy in relation to a couple's sexual behaviour during the fertile time: a prospective longitudinal study. *Hum Reprod.* 2007;22:1310-9.
- [60] Fernandez-Hermida Y, Grande G, Menarguez M, Astorri AL, Azagra R. Proteomic Markers in Cervical Mucus. *Protein Pept Lett.* 2018;25:463-71.
- [61] Peters CW, Kruse T, R Pollwein, Grzeschik KH, Sippel AE. El gen de la lisozima humana. Organización de la secuencia y la localización cromosómica. *Eur J Biochem.* 1989;182:507-16.
- [62] Gill AO, Holley RA. Surface application of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna. *J Food Prot.* 2000;63:1338-46.
- [63] Muraki M, Harata K, Sugita N, Sato K. Origin of carbohydrate recognition specificity of human lysozyme revealed by affinity labeling. *Biochemistry.* 1996;35:13562-7.
- [64] Perkins SJ, Johnson LN, Phillips DC, Dwek RA. The binding of monosaccharide inhibitors to hen egg-white lysozyme by proton magnetic resonance at 270 MHz and analysis by ring-current calculations. *Biochem J.* 1981;193:553-72.
- [65] Reitamo S, Klockars M, Adinolfi M, Osserman EF. Human lysozyme (origin and distribution in health and disease). *Ric Clin Lab.* 1978;8:211-31.

- [66] Valore EV, Park CH, Igrati SL, Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:561-8.
- [67] Hein M, Valore EV, Helmig RB, Ulbjerg N, Ganz T. Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:137-44.
- [68] Meyer W, Seegers U, Herrmann J, Schnapper A. Further aspects of the general antimicrobial properties of pinniped skin secretions. *Dis Aquat Organ.* 2003;53:177-9.
- [69] Yang B, Wang J, Tang B, Liu Y, Guo C, Yang P, et al. Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. *PLoS One.* 2011;6:e17593.
- [70] Cunningham FE, Proctor VA, Goetsch SJ. Egg-white lysozyme as a food preservative: a world overview. *Poultry Sci J.* 1991;47:141-63.
- [71] Jenzano JW, Lundblad RL. Effects of amines and polyamines on turbidimetric and lysoplate assays for lysozyme. *J Clin Microbiol.* 1988;26:34-7.
- [72] King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Regulation of natural antibiotic expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells. *Mol Hum Reprod.* 2002;8:341-9.
- [73] King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium. *J Reprod Immunol.* 2003;59:1-16.
- [74] Svinarich DM, Wolf NA, Gomez R, Gonik B, Romero R. Detection of human defensin 5 in reproductive tissues. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176:470-5.
- [75] Moriyama A, Shimoya K, Ogata I, Kimura T, Nakamura T, Wada H, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations in cervical mucus of women with normal menstrual cycle. *Mol Hum Reprod.* 1999;5:656-61.

- [76] King AE, Critchley HO, Kelly RW. Presence of secretory leukocyte protease inhibitor in human endometrium and first trimester decidua suggests an antibacterial protective role. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:191-6.
- [77] Feng Y, Pan X, Huang N, Feng Y, Wu Q, Wang B. The human beta-defensins expression in female genital tract and pregnancy-related tissues. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2003;34:217-9.
- [78] Schill WB, Schumacher GF. Radial diffusion in gel for micro determination of enzymes. I. Muramidase, alpha-amylase, DNase 1, RNase A, acid phosphatase, and alkaline phosphatase. *Anal Biochem.* 1972;46:502-33.
- [79] Tsibris JCM, Lewis V, Langerberg PW, Chatterton RT, Spellacy WN. Cervical mucus enzymes as markers of the woman's fertile period. *Int J Gynecol Obstet.* 1989;1:73-82.
- [80] Garcea N, Moneta E, Caruso A. Cervical mucus. *Ann Ostet Ginecol.* 1970;92:701-20.
- [81] Kamran S, Moghissi MD. Cervical Mucus Changes and Ovulation Prediction and Detection. *The journal of reproductive Medicine.* 1986;31:748-53.
- [82] Moghissi KS, Syner FN, Borin B. Cyclic changes of cervical mucus enzymes related to the time of ovulation. I. Alkaline phosphatase. *Am J Obstet Gynecol.* 1976;125:1044-8.
- [83] Eggert-Kruse W, Botz I, Pohl S, Rohr G, Strowitzki T. Antimicrobial activity of human cervical mucus. *Hum Reprod.* 2000;15:778-84.
- [84] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 1995;16:1090-4.
- [85] Dunham I. Data disclosure in the human genome project. *Mol Med Today.* 1998;4:335-6.

- [86] Newman A. RNA splicing. *Curr Biol.* 1998;8:R903-5.
- [87] Colledge M, Scott JD. AKAPs: From structure to function. *Trends Cell Biol.* 1999;9:216-21.
- [88] Krishna RG, Wold F. Post-translational modification of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1993;67:265-98.
- [89] Thelen JJ, Miernyk JA. The proteomic future: Where mass spectrometry should be taking us. *Biochem J.* 2012;444:169-81.
- [90] An HJ, Lebrilla CB. A glycomics approach to the discovery of potential cancer biomarkers. *Methods Mol Biol.* 2010;600:199-213.
- [91] Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Castagnola M, Marana R. Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology. *Mol Reprod Dev.* 2013;80:350-7.
- [92] Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292:587-92.
- [93] Panicker G, Lee DR, Unger ER. Optimization of SELDI-TOF protein profiling for analysis of cervical mucus. *J Proteomics.* 2009;71:637-46.
- [94] Andersch-Björkman Y, Thomsson KA, Holmén Larsson JM, Ekerhovd E, Hansson GC. Large scale identification of proteins, mucins, and their O-glycosylation in the endocervical mucus during the menstrual cycle. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6:708-16.
- [95] Gipson IK. Mucins of the human endocervix. *Front Biosci.* 2001;6:D1245-55.
- [96] Van Kooij RJ, Roelofs HJ, Kathmann GA, Kramer MF. Human cervical mucus and its mucous glycoprotein during the menstrual cycle. *Fertil Steril.* 1980;34:226-33.

- [97] Gilks CB, Reid PE, Clement PB, Owen DA. Histochemical changes in cervical mucus-secreting epithelium during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril.* 1989;51:286-91.
- [98] Argueso P, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Gipson IK. Variation in the amount of T antigen and N-acetyllactosamine oligosaccharides in human cervical mucus secretions with the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:5641-8.
- [99] Iacobelli S, Garcea N, Angeloni C. Biochemistry of mucus: a comparative analysis of the secretion from preovulatory, postovulatory, and pregnancy periods. *Fertil Steril.* 1971;22:727-34.
- [100] Chantler E, Debruyne E. Factors regulating the changes in cervical mucus in different hormonal states. *Adv Exp Med Biol.* 1977;89:131-41.
- [101] Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, et al. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:D412-6.
- [102] Trougakos IP. The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches - a mini-review. *Gerontology.* 2013;59:514-23.
- [103] Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messana I, Pontecorvi A, De Marinis L, Castagnola M, Marana R. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril.* 2012;97:67-73.
- [104] Poon S, Easterbrook-Smith SB, Rybchyn MS, Carver JA, Wilson MR. Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry.* 2000;39:15953-60.
- [105] O'Bryan MK, Baker HW, Saunders JR, Kirszbaum L, Walker ID, Hudson P, et al. Human seminal clusterin (SP-40,40). Isolation and characterization. *J Clin Invest.* 1990;85:1477-86.

- [106] Yeung WS, Lee KF, Koistinen R, Koistinen H, Seppälä M, Chiu PC. Effects of glycodefins on functional competence of spermatozoa. *J Reprod Immunol*. 2009;83:26-30.
- [107] Becher N, Hein M, Danielsen CC, Ulbjerg N. Matrix metalloproteinases in the cervical mucus plug in relation to gestational age, plug compartment, and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:113.
- [108] Jung J, Yoon T, Choi EC, Lee K. Interaction of cofilin with triose-phosphate isomerase contributes glycolytic fuel for Na,K-ATPase via Rho-mediated signaling pathway. *J Biol Chem*. 2002;277:48931-7.
- [109] Wiggins R, Hicks SJ, Soothill PW, Millar MR, Corfield AP. Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. *Sex Transm Infect*. 2001;77:402-8.
- [110] Domino SE, Hurd EA. LacZ expression in Fut2-LacZ reporter mice reveals estrogen-regulated endocervical glandular expression during estrous cycle, hormone replacement, and pregnancy. *Glycobiology*. 2004;14:169-75.
- [111] Thompson RC, Ohlsson K. Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:6692-6.
- [112] Chai H, Yu DL, Zhang B, Fu Y, Hu SN. Analysis of expressed sequence tags in porcine uterus tissue. *Biochem Genet*. 2009;47:117-25.
- [113] Levy AP, Asleh R, Blum S, Levy NS, Miller-Lotan R, Kalet-Litman S, et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12:293-304.
- [114] Zegels G, Van Raemdonck GA, Coen EP, Tjalma WA, Van Ostade XW. Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid using colposcopy samples. *Proteome Sci*. 2009;7:17.

- [115] Di Quinzio MK, Oliva K, Holdsworth SJ, Ayhan M, Walker SP, Rice GE, Georgiou HM, Permezel M. Proteomic analysis and characterisation of human cervico-vaginal fluid proteins. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2007;47:9-15.
- [116] Pereira L, Reddy AP, Jacob T, Thomas A, Schneider KA, Dasari S, et al. Identification of novel protein biomarkers of preterm birth in human cervical-vaginal fluid. *J Proteome Res.* 2007;6:1269-76.
- [117] Klein LL, Jonscher KR, Heerwagen MJ, Gibbs RS, McManaman JL. Shotgun proteomic analysis of vaginal fluid from women in late pregnancy. *Reprod Sci.* 2008;15:263-73.
- [118] Shaw JL, Smith CR, Diamandis EP. Proteomic analysis of human cervico-vaginal fluid. *J Proteome Res.* 2007;6:2859-65.
- [119] Tang LJ, De Seta F, Odreman F, Venge P, Piva C, Guaschino S, Garcia RC. Proteomic analysis of human cervical-vaginal fluids. *J Proteome Res.* 2007;6:2874-83.
- [120] Panicker G, Ye Y, Wang D, Unger ER. Characterization of the Human Cervical Mucous Proteome. *Clin Proteomics.* 2010;6:18-28.
- [121] Casado-Vela J, Rodriguez-Suarez E, Iloro I, Ametzazurra A, Alkorta N, García-Velasco JA, et al. Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate. *J Proteome Res.* 2009;8:4622-32.
- [122] Lee DC, Hassan SS, Romero R, Tarca AL, Bhatti G, Gervasi MT, et al. Protein profiling underscores immunological functions of uterine cervical mucus plug in human pregnancy. *J Proteomics.* 2011;74:817-28.
- [123] Grande G, Vincenzoni F, Mancini F, Baroni S, Luca G, Calafiore R, et al. Semen Proteomics Reveals the Impact of *Enterococcus faecalis* on male Fertility. *Protein Pept Lett.* 2018;25:472-7.
- [124] Odeblad, E. Cervical mucus and their functions. *J. Irish coll. Physicians and Curg.* 1997;26:27-32.

- [125] Schumacher GF, Kim MH, Hosseinian AH, Dupon C. Immunoglobulins, proteinase inhibitors, albumin, and lysozyme in human cervical mucus. I. Communication: hormonal profiles and cervical mucus changes--methods and results. *Am J Obstet Gynecol.* 1977;129:629-36.
- [126] Ellison RT, Giehl TJ. Matando a las bacterias gram-negativas de la lactoferrina y la lisozima. *J Clin Invest.* 1991;88:1080-91.
- [127] Cooper CA, Maga EA, Murray JD. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future. *Transgenic Res.* 2015;24:605-14.
- [128] Leitch EC, Willcox MD. Lactoferrin increases the susceptibility of *S. epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin. *Curr Eye Res.* 1999;19:12-9.
- [129] León-Sicairos N, López-Soto F, Reyes-López M, Godínez-Vargas D, Ordaz-Pichardo C, de la Garza M. Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, slgA and lysozyme. *Clin Med Res.* 2006;4:106-13.
- [130] Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messana I, Pontecorvi A, De Marinis L, Castagnola M, Marana R. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril.* 2012;97:67-73.
- [131] Masson PL, Heremans JF, Dive CH. An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin Chim Acta.* 1966;14:735-9.
- [132] Gambera L, Campanella G, Piomboni P, Serafini F, Morgante G, De Leo V. Association of antioxidants and natural immune activators in the treatment of asthenoteratospermia and abacterial leukocytosis. *Minerva Ginecol.* 2007;59:473-9.
- [133] Piomboni P, Gambera L, Serafini F, Campanella G, Morgante G, De Leo V. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian J Androl.* 2008;10:201-6.

- [134] Buckett WM, Luckas MJ, Gazvani MR, Aird IA, Lewis-Jones DI. Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. *J Androl.* 1997;18:302-30.
- [135] Zumoffen CM, Massa E, Caille AM, Munuce MJ, Ghersevich SA. Effects of lactoferrin, a protein present in the female reproductive tract, on parameters of human sperm capacitation and gamete interaction. *Andrology.* 2015;3:1068-75.
- [136] Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol.* 2006;7:R40.
- [137] Lönnerdal B. Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 1985;42:1299-317.
- [138] Schill WB. Cervix mucus and its significance for andrology. *Hautarzt.* 1973;24:469-74.
- [139] Ahmadvand S, Farahmand H, Mirvaghefi A, Eagderi S, Zargar A. Effects of (Anti) Androgenic Endocrine Disruptors (DEHP and Butachlor) on Immunoglobulin M (IgM) and Leukocytes Counts of Male Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull Environ Contam Toxicol.* 2015;94:695-700.
- [140] Thilagam H, Gopalakrishnan S, Bo J, Wang KJ. Effect of 17beta-estradiol on the immunocompetence of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Environ Toxicol Chem.* 2009;28:1722-31.
- [141] Watanuki H, Yamaguchi T, Sakai M. Suppression in function of phagocytic cells in common carp *Cyprinus carpio* L. injected with estradiol, progesterone or 11-ketotestosterone. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2002;132:407-13.
- [142] Wang R, Belosevic M. Estradiol increases susceptibility of goldfish to *Trypanosoma danilewskyi*. *Dev Comp Immunol.* 1994;18:377-87.
- [143] Martinez AR, Zinaman MJ, Jennings VH, Lamprecht VM. Prediction and detection of the fertile period: the markers. *Int J Fertil Menopausal Stud.* 1995;40:139-55.

[144] Foresta C, Manoni F, Businaro V, Donadel C, Indino M, Scandellari C. Possible significance of transferrin levels in seminal plasma of fertile and infertile men. *J Androl.* 1986;7:77-82.

[145] Bharshankar RN, Bharshankar JR. Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2000;44:456-60.