

RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y CONTENIDO IÓNICO DEL MOCO CERVICAL CON EL ESTADO DE PREÑEZ AL INSEMINAR VAQUILLONAS A CELO DETECTADO

Relationship between physical characteristics and ionic content of cervical mucus pregnancy status to inseminate heifers detected in estrus

C.L. Savia¹, J. Reátegui², P.R. Marini³, S.F. Bernardi⁴

- 1 Becaria de Investigación. Consejo Interuniversitario Nacional. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.
- 2 Investigador Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEPL). Universidad Católica de Santa María. Arequipa. Perú.
- 3 Director Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras. Facultad de Ciencias Veterinarias. CIC-Universidad Nacional de Rosario. Argentina.
- 4 Investigador Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

E-mail:
sbernard@unr.edu.ar

RESUMEN

La detección de celo suele ser uno de los múltiples factores que afectan la tasa de preñez en las explotaciones lecheras, debido a que se inseminan hembras fuera del momento más adecuado para alcanzar la fertilización. El objetivo del presente trabajo fue analizar las características macroscópicas (cantidad, apariencia, consistencia), fenómeno de cristalización, pH, nivel de calcio, magnesio, potasio, sodio y cloro en el moco cervical de vaquillonas con el fin de relacionar estas propiedades con el período periovulatorio. Se utilizaron 20 vaquillonas Holstein. El moco se obtuvo previo a la inseminación y se colectó por aspiración desde el cérvix. Se determinó pH utilizando cinta reactiva (6 - 7,9) y se evaluó el grado de cristalización (0 - 4) según formaciones típicas y atípicas de hojas de helecho. El contenido iónico se determinó utilizando kits comerciales (Wiener Laboratorios SAIC). Se detectó preñez a los 60 días post inseminación. Cada variable fue descrita por su media y desvío estándar y por una ANDEVA se estableció diferencias significativas entre medias. Se demostró que la preñez estuvo relacionada con un moco que contiene una concentración significativamente menor de K y Mg, si se compara con vaquillonas vacías (K, P: 7,76 V: 12,97; Mg, P: 2,80 V: 3,93; $p < 0,05$ $t = 2,16$). En las vaquillonas preñadas el pH fue significativamente mayor, y el grado de cristalización significativamente menor (pH P: 7,60 V: 6,23; Cristalización P: 1,31 V: 2,21; $p < 0,01$ $t = 3,01$). Los resultados permiten concluir que el momento óptimo para inseminar estuvo asociado a un moco cervical que macroscópicamente se observa fluido, transparente y abundante, con un pH por encima de 7,0 y que cristalizó formando hojas atípicas de helecho con un grado promedio de 1,31. Probablemente, la consistencia fluida o líquida favorece el transporte de los espermatozoides y guarda relación con el contenido iónico tal vez ejerciendo una fuerza osmótica activa, responsable de la retención de agua en la secreción.

Palabras clave: flujo cervical, estro, preñez, bovinos lecheros

ABSTRACT

The detection of zeal tends to be one of them factors multiple that affect the rate of pregnancy in dairy farms; because females are inseminated outside the most appropriate time to reach fertilization. The objective of the present study was to analyze macroscopic characteristics (quantity, appearance and consistency), crystallization phenomenon, pH, level of calcium, magnesium, potassium, sodium and chlorine in the cervical mucus of heifers in order to relate these properties with the periovulatory period. Be used 20 Holstein heifers. Mucus was obtained prior to insemination and it was picked up by suction from the cervix. pH was determined using reactive tape (6-7,9) and the degree of crystallization (0-4) was evaluated according to typical and atypical fern leaf formations. It was determined pH test (6-7,9) tape and evaluate the degree of crystallization (0 - 4) according to the typical and atypical formations of fern leaves. Ionic content was determined using commercial kits (Wiener SAIC laboratories). Pregnancy was detected in 60 days post insemination. Each variable was described by its mean and deviation standard and by ANOVA established significant differences between means. It showed that the

pregnancy was related to a mucus contains a concentration significantly less than K and Mg, compared with empty heifers (K, P:7,76 V: 12,97; Mg, P:2, 80 V:3,93; $p < 0,05$ $t = 2,16$). pH was significantly higher in the pregnant females, and the crystallization grade significantly lower (pH P:7, 60 V: 6, 23; crystallization P: 1,31 V2, 21; $p < 0,01$ $t = 3,01$). The results allow concluding that the optimum to inseminate was associated with cervical mucus observed macroscopically liquid, transparent and generous; with a pH above 7.0 and that it was forming atypical leaves of fern with an average of 1.31. Probably, the liquid consistency or liquid facilitates the transport of sperm and an osmotic active, responsible for the retention force is not related to content perhaps exerting an osmotic force active, responsible for the retention of water in the secretion.

Keywords: cervical flow, estrus, pregnancy, dairy cattle

INTRODUCTION

En el cérvix se localizan diversas glándulas que tienen como función elaborar y secretar a la luz de este tracto uterino, una secreción mucosa llamada flujo o moco cervical. Esta función glandular se ve modificada por el patrón hormonal que rige el ciclo estral, fundamentalmente, estas células modifican su grado de actividad según se encuentren bajo los efectos de los estrógenos o de la progesterona. Además, esas variaciones repercuten en las propiedades reológicas del moco modificando por ejemplo, su contenido acuoso, el que alcanza hasta un 98-99% durante el período próximo a la ovulación (moco estrogénico). En bovinos, hembras con actividad cíclica normal (celo espontáneo), se ha observado que las propiedades físicas del moco podrían ser utilizadas para determinar el momento óptimo para recibir inseminación y lograr un resultado positivo (Tsiligianni *et al.*, 2000; Tsiligianni *et al.*, 2011). Durante la ovulación el volumen de moco cervical producido es mayor respecto del resto del ciclo, y es más acuoso y transparente (Cortés, 2012; Bernardi *et al.*, 2016). En el cérvix, la secreción mucosa es fundamental puesto que facilita el transporte de espermatozoides en su ascenso hacia el oviducto actuando como barrera selectiva en su paso.

Esta secreción mucosa del cérvix fue objeto de estudio de numerosas investigaciones. Se ha descrito su composición química definiendo que su componente fundamental es el agua (90-95%) y el resto está representado por proteínas, mucinas, enzimas y sales inorgánicas (5-10%) (Tsiligianni *et al.*, 2002; Cortés, 2012). También se ha comparado las propiedades físicas del moco obtenido de hembras con celo normal e inducido, inclusive se compararon diversos protocolos entre sí (Tsiligianni *et al.*, 2001; Cortés *et al.*, 2013); además se estudió la asociación entre estas propiedades y la concentración sérica de hormonas sexuales como estrógenos y progesterona, con el proceso de ovulación (Tsiligianni *et al.*, 2000; Predojevic *et al.*, 2007; Layek *et al.*, 2013). Varios autores estudiaron la relación de las características macroscópicas y fisicoquímicas del moco cervical con la tasa de concepción estudiando hembras con celo normal y vacas repetidoras (Predojevic *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2014).

El objetivo del presente trabajo fue analizar las características macroscópicas (cantidad, apariencia, consistencia), fenómeno de cristalización, pH, nivel de calcio, magnesio, potasio, sodio y cloro en el moco cervical de vacas inseminadas a celo detectado con el fin de relacionar estas propiedades con el período periovulatorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: El trabajo se realizó en un establecimiento lechero comercial ubicado en la localidad de San Gregorio provincia de Santa Fe (34° 19'31.08"S, 62° 2'18.96"W) Argentina. ,

durante el otoño de 2015. Se utilizaron vacas Holstein (n = 20), con una condición corporal de 3 en la escala de 1-5 (Edmondson *et al.*, 1989). Previo a las actividades propias del trabajo se realizó un examen del aparato reproductor, descartando aquellas con alguna anomalía anatómica o funcional. Los animales tuvieron la siguiente alimentación base: forrajes pastoreados (pasturas polifíticas y verdes anuales de invierno-avena y raigrás- y de verano -sorgo forrajero y soja-), conservados (silajes de planta entera de maíz y de sorgos, heno de praderas) y concentrados (granos de maíz y de sorgo, afrechillo de trigo, harina de soja y sales minerales).

El estro fue detectado por personal altamente calificado a través de la observación directa del comportamiento de los animales dos veces al día (mañana y tarde). La inseminación artificial (IA) se llevó a cabo aproximadamente a las 12 horas posteriores a la detección del celo. Todas las vacas fueron inseminadas con semen congelado de calidad certificada por el centro de comercialización (CIALE y CIAVT de la provincia de Santa Fe, Argentina) y a los 60 días de la IA se detectó preñez por tacto.

Moco Cervical: las muestras de moco fueron colectadas inmediatamente antes de realizar la inseminación artificial y se obtuvieron por aspiración desde el cérvix. Para ello se utilizó una jeringa plástica de 60 ml conectada, por su extremo en punta, a una vaina de plástico utilizada para inseminación. Una gota del material se utilizó para medir el pH de la secreción mediante cinta reactiva con rango 6 – 7,9 en rollo (Machere y Nagel, Germany). El resto de la muestra obtenida fue alícuotada en microviales y almacenada a -20°C hasta su posterior uso en el laboratorio con el fin de observar el fenómeno de cristalización. Una vez obtenidas las muestras de moco de las 20 hembras, se procedió a descongelarlas a 37°C sumergidas en baño térmico. Con cada muestra se realizó un frotis cumpliendo el mismo procedimiento que permite hacer los frotis de sangre. Se dejó secar al aire por aproximadamente 30 minutos y luego se observó utilizando un microscopio binocular de campo claro (Leica DM750), con cámara fotográfica (Leica EC3). La cristalización fue clasificada utilizando una escala de 0 a 4, siendo 0: sin formación de cristales; 1: todos los cristales tienen forma atípica de hoja de helecho; 2: formación en su mayoría de cristales atípicos y sólo unos pocos típicos; 3: en su mayoría cristales con forma típica y sólo algunos atípicos en hoja de helecho bien definida; 4: toda la arborización corresponde a cristales típicos (Tsiligianni *et al.*, 2000; Bernardi *et al.*, 2016). La determinación de la concentración de sodio (Na+) y potasio (K+) se realizó por fotometría de llama (Espectrofotómetro Zentec ZF 2500), para lo cual cada muestra fue diluida en agua destilada (1/200). Los iones cloruro (Cl-) fueron determinados mediante la reacción de Schoenfeld (Schoenfeld y Lewellen, 1964) y para ello se utilizaron microplacas (Placa 96 wells UBOT, CAT #5530200, Orange Scientific) y se realizó la curva de calibración correspondiente. Por colorimetría en microplacas se determinó

el contenido de magnesio (Mg^{+}) (Kit Mg-color, Cód. 1580001, Wiener Laboratorios S.A.I.C.) y de calcio (Ca^{+}) (Kit Ca-color, Cód. 1152002, Wiener Laboratorios S.A.I.C.). La lectura de ambos iones fue realizada por espectrofotómetro (Tecan F50).

Análisis estadístico: el contenido iónico estudiado fue descrito por su distribución de frecuencia, prueba de normalidad, mediana (valor máximo – valor mínimo). Su distribución normal fue resumida utilizando la media y desvío estándar; y a modo de buscar variables más representativas para determinar el período del celo que nos interesa se estimaron componentes principales (análisis multivariado). Mediante la aplicación de análisis de la variancia y pruebas de t-student se probó si existían diferencias entre grupos (preñados y vacíos). Para mostrar si existía relación entre el fenómeno físico de cristalización de la secreción cervical respecto de la concentración iónica, se estimaron los coeficientes de correlación simple entre el grado de arborización y el contenido de cada ión. Todos los análisis detallados se realizaron bajo el software JMP en su versión 5.0 para Windows (JMP®, SAS Institute, 2003).

RESULTADOS

Los resultados del análisis de concentración iónica en el moco cervical colectado de todas las vacas utilizadas en el presente trabajo se muestran en la Figura 1.

El control de preñez realizado sesenta días posteriores a la fecha de inseminación permitió calcular el porcentaje de preñez alcanzado y fue de 53%. En adelante, el tratamiento de los datos se realizó comparando grupos preñados y vacías. En la tabla 1 se detalla el promedio y desvío estándar de las siguientes variables: pH, grado de cristalización, concentración de sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro. Los grupos de hembras difieren entre sí para el valor de pH, grado de cristalización, nivel de potasio y magnesio. El estado de preñez estuvo relacionado, según los componentes principales (CP) lo siguiente: la CP1 tuvo la mayor correlación positiva con el contenido de iones Mg^{+} y valor pH, mientras que la correlación negativa fue con el grado de cristalización ($Y1=0,41 Mg^{+}-0,53 cristalización+0,48 pH$). La CP2 tuvo la mayor correlación positiva con el contenido de Na^{+} en el moco, potasio y cloro ($Y2=0,50 Na^{+}+0,54 K^{+}+0,45Cl^{-}$); la CP3 tuvo una alta correlación con la concentración de Ca^{++} y negativa con el nivel de Cl^{-} ($Y3=0,76 Ca^{++} -0,55 Cl^{-}$).

En la Figura 2 se muestran los resultados producto del análisis de la relación entre los iones sodio y potasio calculada.

El MCB de las vacas vacías mostró una relación iónica significativamente menor si se compara este valor con el obtenido para las hembras preñadas.

DISCUSIÓN

Los resultados demostraron que la falla reproductiva o falta de preñez, en la mayoría de los animales, coincidió con una secreción mucosa gelatinosa, poco transparente o con flóculos de material opaco, y además se presentó en escasa cantidad. También en algunos animales el MCB fue muy abundante, absolutamente líquido y transparente. Esto coincide con lo publicado en trabajos anteriores en los que demostraron que

las características del moco cervical se modifican en función de las hormonas ováricas secretadas durante el estro. La dominancia de estrógenos provoca un aumento en la actividad de síntesis en las células del cérvix encargadas de secretar moco, por el contrario, la progesterona inhibe la producción de moco observándose una secreción cervical escasa en el período luteal del ciclo (Tsiligianni *et al.*, 2000; Layek *et al.*, 2014; Bernardi *et al.*, 2016).

El pH fue ligeramente ácido y la cristalización observada correspondió a un arreglo mixto observándose hojas atípicas y típicas de hehecho; y tanto el pH como el grado de cristalización fueron significativamente menor si se compara con el grupo de hembras que resultaron preñadas. Algunos autores sostienen que la variación del valor de pH, inducidas por fluctuaciones en los niveles de estrógenos (Tsiligianni *et al.*, 2011; Bernardi *et al.*, 2016).

En el MCB de las hembras que no han podido alcanzar la preñez, se determinó una menor concentración de potasio y magnesio que la encontrada en el moco de las hembras preñadas, y no hubo diferencias en las concentraciones de sodio, calcio y cloro. El bajo nivel de potasio encontrado en nuestro trabajo, para vacas que resultaron preñadas, coincide con estudios anteriores en los que se evaluó el contenido de potasio en sangre y secreciones vaginales de bovinos, demostrando que la concentración de K sufre una disminución marcada en el momento mismo de la ovulación o inmediatamente antes de este suceso (Guay, 1996). Por otro lado, la carga iónica de las secreciones mucosas está asociada por fuerzas electroquímicas a las mucinas sulfatadas que componen al moco y esto genera una fuerza osmótica responsable de la atracción de moléculas de agua (Alliende *et al.*, 2008; Pluta *et al.*, 2012). En este sentido, y considerando la relación sodio potasio intra y extracelular de fundamental importancia en la fisiología, en las vacas preñadas tal relación (Na^{+}/K^{+}) resultó significativamente mayor que la encontrada en las hembras vacías, esto permite suponer que guardaría relación con un mayor volumen de agua haciendo que el moco se observe más líquido o filante como se comentó anteriormente. Desbalances en esta relación catiónica fueron diagnosticados por ejemplo en presencia de ciclos estrales anormales, niveles de hormonas modificados, etc. (Campos y Hernández, 2008).

CONCLUSION

El análisis exhaustivo del moco cervical puede resultar útil en el diagnóstico del estro bovino más aun cuando los signos externos no son obvios, o cuando el celo es de corta duración; y también puede ser de utilidad para predecir la inminencia de la ovulación. Además, y no menos importante, es considerar que esta secreción en contacto con los espermatozoides impide que se produzca la reacción acrosómica prematura, manteniendo por tanto la capacidad fecundante del espermatozoide. A causa de esta función es que se vuelve indispensable profundizar el estudio bioquímico de la secreción cervical (Vigil *et al.*, 2008; Cortés 2012).

Figura 1. Contenido iónico del moco cervical bovino de vacas inseminadas a celo detectado

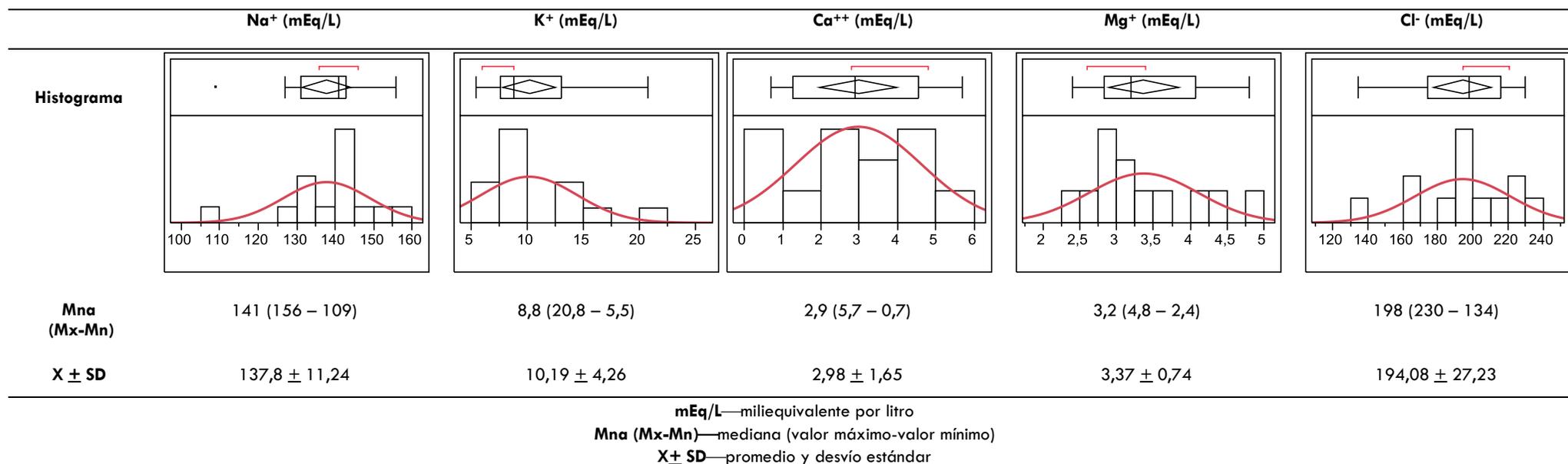
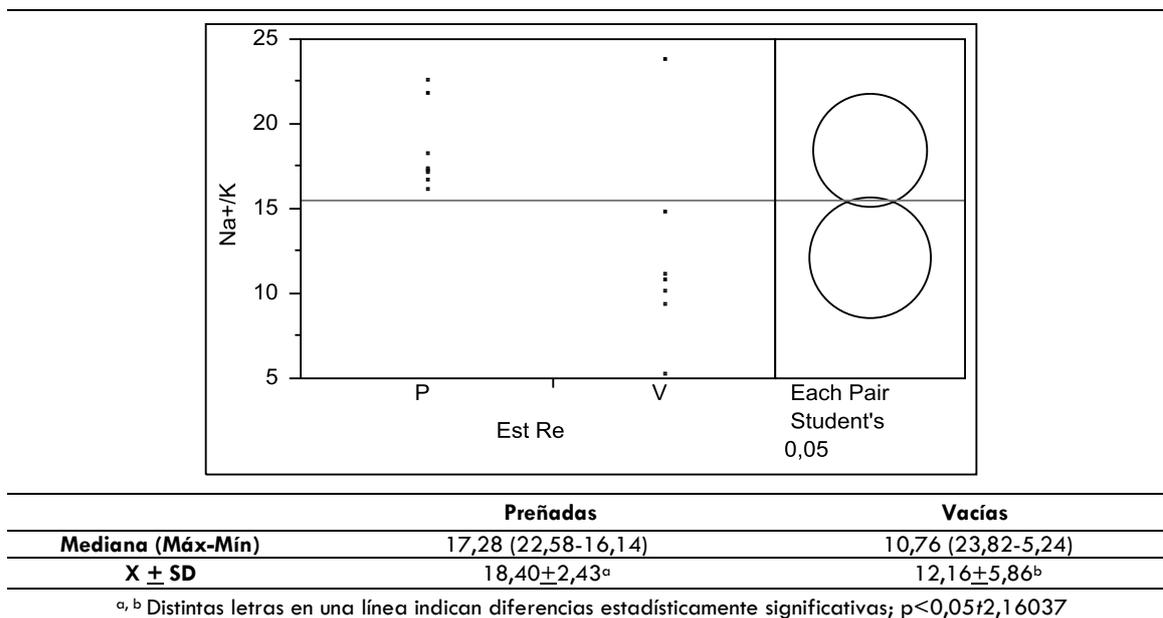


Tabla I. pH, grado de cristalización y contenido iónico del moco cervical bovino de vacas con celo espontáneo (Media y desvío estándar)

	pH	Cristalización	Na ⁺ (mEq/L)	K ⁺ (mEq/L)	Ca ⁺⁺ (mEq/L)	Mg ⁺ (mEq/L)	Cl ⁻ (mEq/L)
Preñadas	7,59 ± 0,38 ^a	1,31 ± 0,26 ^a	140,62 ± 1,15 ^a	7,76 ± 10,24 ^a	2,30 ± 1,30 ^a	2,80 ± 0,27 ^a	189,14 ± 25,84 ^a
Vacías	6,23 ± 0,41 ^b	2,21 ± 0,70 ^b	134,57 ± 12,81 ^a	12,97 ± 4,89 ^b	3,77 ± 1,77 ^a	3,93 ± 0,60 ^b	199,83 ± 30,08 ^a

mEq/L—mili equivalente por litro
^{a, b} columns with different superscripts are significantly different; P < 0,05 t = 1,99962

Figura 2. Diferencia entre grupos de la relación sodio-potasio (Na^+/K^+) por grupo de vacas según su estado reproductivo a los 60 días postinseminación



REFERENCIAS

- Alliende C, Kwon YJ, Brito M, Molina C, Aguilera S, Perez P, Leyton L, Quest AF, Mandel U, Veerman E, Espinosa M, Clausen H, Leyton C, Romo R, Gonzalez MJ. Reduced sulfation of MUC5b is linked to xerostomia in patients with Sjogren syndrome. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1480-1487.
- Bernardi SF, Rinaudo A, Marini PR. Cervical mucus characteristics and hormonal status at insemination of Holstein cows. *Iranian Journal Veterinary Research*. 2016; 17 (1):45-49.
- Campos GR, Hernández E. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ciencia Animal. Relación Nutrición-Fertilidad en Bovinos. Un Enfoque Bioquímico y Fisiológico. Available <http://www.bdigital.unal.edu.co/3656/1/romulocamposgaona2008.pdf>
- Cortes ME, Gonzalez F, Vigil P. Crystallization of Bovine Cervical Mucus at Oestrus: An Update. *Rev Med Vet Publication of Universidad de La Salle*. 2013; 28:103-116.
- Cortés ME. Morphological and ultrastructural characterization of different types of bovine cervical mucus using light and scanning electron microscopy. Tesis a Doctor en Ciencias de la Agricultura, Área Fisiología y Nutrición Animal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal 2012. http://dspace2.conicyt.cl/bitstream/handle/10533/89392/CORTES_MANUEL_1949D.pdf?sequence=1
- Edmondson AJ, Lean IJ. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 1989; 72:68-78.
- Guay P. Etude du taux et des variations du potassium dans le sang et dans les sécrétions génitales de la vache, au cours du cycle normal. *Can. Vet. Jour*. 1966; 7 (10):219-223.
- Kumar A, Mehrotra S, Dangi SS, Singh G, Singh M, Mahla AS. Amylase activity in cervical mucus and serum during estrus in normal and repeat breeder cattle. *Vet World*. 2012; 5 (8):486-488.
- Layek S, Mohanty T, Kumaresan A, Behera K, Chand S. Cervical mucus characteristics and peri-estrous hormone concentration in relation to ovulation time in Zebu (Sahiwal) cattle. *Livest Sci*. 2013; 152:273-281.
- Pluta K, McGettigan PA, Reid CJ, Browne JA, Irwin JA, Tharmalingam T, Corfield A, Baird A, BJ, Evans AC, Carrington SD. Molecular aspects of mucin biosynthesis and mucus formation in the bovine cervix during the peri-estrous period. *Physiol Genomics*. 2012; 44:1165-1178.
- Predojevic RM, Petrujkic T, Petrujkic TB and Predojevic MN. Influence of the ovarian hormones on the cervical mucus (biophysical properties) and sperm transport in relation to cow's conception rates. *Timisoara. Lucr St Med Vet*. 2007;60:91-94.
- Schoenfeld RG, Lewellen CJ. A colorimetric method for determination of serum chloride. *Clin Chem*. 1964; 10:533-539.
- Tsiligianni Th, Amiridis G, Dovolou E, Menegatos I, Chadio S, Rizos D, Gutierrez-Adan A. Association between physical properties of cervical mucus and ovulation rate in superovulated cows. *Can. J. Vet. Res*. 2011; 75:248-253.
- Tsiligianni T, Amiridis GS, Vainas E. Activity of glycosidases (37 β- N- acetylglucosaminidase, α-mannosidase, and β-galactosidase) in the uterine luminal fluid of cows after multiple ovulations. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2007; 71:300-304.
- Tsiligianni T, Karagiannidis A, Brikas P, Saratsis P. Physical properties of bovine cervical mucus during normal and induced (progesterone and/or PGF2α) estrus. *Theriogenology*. 2001; 55:629-640.
- Tsiligianni Th, Karagiannidis A, Brikas P, Saratsis P. Relationship between certain physical properties of

cervical mucus and fertility in cows. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 2000; 106:28–31.

- Tsiligianni T, Karagiannidis A, Roubies N, Saratsis P, Brikas P. Concentration of calcium, zinc, magnesium, potassium and sodium in the bovine cervical mucus during normal oestrus and oestrus induced by progesterone and/or PGF2 α . *Reprod Fertil Dev*. 2002; 14 (7-8):427-431.
- Verma KK, Prasad S, Kumaresan A, Mohanty TK, Layek SS, Patbandha TK, Chand S. Characterization of physico-chemical properties of cervical mucus in relation to parity and conception rate in Murrah buffaloes. *Veterinary World* 2014; available at www.veterinaryworld.org/Vol.7/July-2014/5.pdf
- Vigil P, Toro A, Godoy A. Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia*. 2008; 40:146-151.