

225409



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Casa abierta al tiempo

**PARTICIPACIÓN DE ALGUNAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE
EL MOCO CERVICAL EN EL SÍNDROME DE LA VACA REPETIDORA**

MACRINO JULIÁN CHARGOY ACEVEDO

MATRICULA 99180742

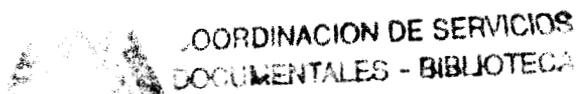
TESIS QUE PRESENTA PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

IZTAPALAPA, DISTRITO FEDERAL

2001

La presente tesis titulada: **Participación de Algunas Propiedades Fisico-químicas de el Moco Cervical en el Síndrome de la Vaca Repetidora**, realizada por el alumno **Macrino Julián Chargoy Acevedo**, ha sido aprobada y aceptada por el Jurado como requisito parcial para obtener el grado de:



MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

JURADO

PRESIDENTE

DR. MARIO PÉREZ MARTÍNEZ

SECRETARIO

M. en C. Ma. TERESA JARAMILLO JAIMES

VOCAL

M. en C. JORGE IVÁN OLIVERA LÓPEZ

Iztapalapa, Distrito Federal a 21 de Noviembre de 2001

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DEL AREA DE INVESTIGACIÓN APLICADA DE EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA, COMO PARTE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN **“EFECTO DE LA MELATONINA EN EL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DURANTE EL PREPARTO Y POSTPARTO TEMPRANO EN VACAS HOLSTEIN”** BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS MAESTROS: M. EN C. JORGE IVÁN OLIVERA LÓPEZ Y M. EN C. MA. TERESA JARAMILLO JAIMES.

DEDICATORIA

A mis padres por todos los valores que me inculcaron, pués gracias a estos he podido alcanzar todas las metas que me he propuesto. A tí Julián Eloí, aunque estás tan lejos de nosotros siempre siento tu amor y apoyo desde allá arriba. A tí Irma te quiero por todo el valor y amor que demostraste para sacarnos adelante.

A mi amada Maura por su paciencia, comprensión y apoyo incondicionales que siempre han renovado mis fuerzas en los momentos difíciles y me motivan a superarme cada día.

A Dios por todas las oportunidades que me ha dado en la vida.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Jorge I. Olivera López por permitirme el honor de trabajar a su lado y haber compartido conmigo sus conocimientos.

A la M. en C. Ma. Teresa Jaramillo Jaimes por estar siempre dispuesta a enseñar y proporcionar sus acertados consejos.

A Abel, Juan y Gabriela integrantes del laboratorio de Investigación Aplicada, por ser tan agradables compañeros y siempre estar dispuestos a ayudarme, lo cual permitió llevar a cabo mi trabajo en un ambiente de cordialidad, respeto y alegría.

A mis hermanos, amigos y familiares porque siempre estuvieron dispuestos a apoyarme en las buenas y en las malas.

Al Lic. Javier Conde, MVZ. Guillermo Islas, MVZ. Fidel Carmona y demás personal del Rancho "La Quinta" por permitirme utilizar las instalaciones y los animales para realizar este trabajo.

A la Unión Ganadera Regional de Nuevo León, al Ing. Manuel García Garza y al Ing. Arturo de la Garza Tijerina por el apoyo brindado para llevar a cabo parte importante de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo parcial para la realización de esta tesis, así como por la beca otorgada para financiar mis estudios de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
MATERIALES Y METODOS	12
- Descripción de la zona de trabajo.....	12
- Animales, tratamiento y manejo.....	12
- Colección y análisis de muestras.....	13
- pH.....	13
- Cristalización.....	13
- Prueba de Penetración.....	14
- Prueba de Contacto (SCMC).....	15
- Análisis Estadístico.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
- pH.....	16
- Cristalización.....	18
- Prueba de Penetración.....	22
- Prueba de Contacto (SCMC).....	26
- Análisis de la Correlación entre las variables pH, CRIST, PE y SCMC.....	29
CONCLUSIONES.....	31
LITERATURA CITADA.....	33

PARTICIPACIÓN DE ALGUNAS PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS DE EL MOCO CERVICAL EN EL SINDROME DE LA VACA REPETIDORA

Chargoy-Acevedo M. J.

Departamento de Biología de la Reproducción. D.C.B.S. U.A.M.I.

RESUMEN

Para realizar el presente trabajo, se tomaron muestras de Moco Cervical (MC) al momento de la Inseminación Artificial (IA) de 25 vacas en producción y de 7 vaquillas a primer servicio de un hato comercial de 1050 vacas, las cuales fueron divididas en tres grupos; I. 7 vaquillas a primer servicio, II. 10 vacas cargadas a primer y segundo servicio, III. 15 vacas que exhiben el Síndrome de la Vaca Repetidora (SVR). Se midió el pH del MC y se realizaron improntas con este para observar la Arborescencia (CRIST) y así mismo se realizaron pruebas de Penetración Espermática (PE) *in vitro* con semen bovino y los resultados mostraron que el pH no es determinante para la PE y la persistencia de motilidad espermática en la prueba de Contacto Semen Moco Cervical (SCMC), mientras que la arborescencia si es un factor determinante.

COPARTNERSHIP OF SOME PHYSICOCHEMICALS PROPERTIES OF THE CERVICAL MUCUS IN THE REPEAT BREEDER COW SYNDROME

Chargoy-Acevedo M. J.

Biology of the Reproduction Departament D.C.B.S. U.A.M.I.

ABSTRACT

To perform this investigation, Cervical Mucus (CM) samples were taken at the moment of the Artificial Insemination (AI), from 25 cows in production and from 7 heifers to first service from a commercial herd of 1050 cows, wich were divided en three groups; I. 7 heifers to first service, II. 10 cows pregnants at first and second service, III. 15 cows wich showed the Repeat Breeder Cow Syndrome (RBCS). CM pH was measured and stereotype plates were realized with it to view the fern phenomenon (CRIST) and test of Sperm Penetration (SP) *in vitro* were carried out with bovine semen and the results showed that the pH is not a determinant for the SP and the sperm motility in the Semen Cervical Mucus Contact test (SCMC).

INTRODUCCIÓN

Para los productores lecheros el manejo reproductivo hoy en día parece ser el principal problema que enfrentan en cuanto a salud del hato. Los casos de vacas repetidoras y la detección de calores son los problemas reproductivos más comunes. Las vacas repetidoras extienden el intervalo entre partos, y algunas vacas demeritan su valor pues el intervalo se extiende más allá de su valor económico. Es muy común encontrar vacas repetidoras cuando se utiliza la Inseminación Artificial. Se estima que sólo el 65% de las inseminaciones resultan en el nacimiento de un becerro (Whitmore *et. al.* 1992).

La falla en las vacas lecheras para quedar gestantes después de repetidas Inseminaciones Artificiales es causa de pérdidas económicas para los productores lecheros. En una reciente revisión, la incidencia de vacas repetidoras en varios países van del 10 al 18% e inclusive en algunos puede llegar hasta el 24% ocasionando un costo por vaca/lactación de \$ 385 USD. (Allen y Youngquist 1999).

En la práctica el termino de “vaca repetidora”, se define como aquella vaca que muestra estros normales cada 18 a 24 días, y que no ha podido quedar gestante después de dos servicios de Inseminación Artificial con semen fértil, regresando por tercera ocasión al estro. El síndrome de la vaca repetidora, puede tener diferentes etiologías, incluyendo defectos genéticos o adquiridos en el óvulo, en esperma ó en el cigoto; infecciones y procesos inflamatorios; disfunciones endocrinas; deficiencias nutricionales o de manejo y otros factores asociados con la pérdida temprana del embrión o aborto espontáneo (Whitmore *et. al.* 1992, Allen y Youngquist 1999).

En las últimas décadas se han realizado estudios donde se ha destacado la importancia de la observación de las características del moco cervical en el seguimiento de los casos de infertilidad en humanos, y se ha informado de la gran

similitud biofísica entre el moco cervical humano y el moco cervical bovino. Se han realizado recientemente trabajos encaminados a la descripción de la participación de las características físico-químicas del moco cervical en el síndrome de la vaca repetidora utilizando técnicas rutinarias en la investigación de la infertilidad humana.

El pH y la arborescencia del moco cervical se van modificando a lo largo del ciclo estral, debido a los niveles de las hormonas sexuales en cada etapa; cuando los niveles de estrógeno son elevados, se favorece la formación de helechos y el pH se encuentra en los niveles en los cuales la penetración, y supervivencia de los espermatozoides es adecuada para la concepción y por el contrario cuando la progesterona se encuentra en niveles elevados el pH del moco cervical se acidifica y no se observa la formación de helechos, lo cual crea un medio hostil para los espermatozoides.

Con base a los trabajos realizados hasta el momento en este tema, se hace necesario realizar estudios enfocados a esclarecer el posible papel que juegan el pH y la cristalización del moco cervical, así como la posible participación de inmunoglobulinas aglutinadoras de espermatozoides.

ANTECEDENTES

En los rumiantes, se ha comprobado, que el cérvix juega un papel importante durante un período prolongado después de la monta, debido a que funciona como un sitio reservorio de los espermatozoides (Matter 1966).

En algunas especies incluyendo la vaca, el cérvix es la primera barrera para la migración de los espermatozoides hacia el sitio de fertilización (Gaddum-Rosse y Lee 1978.). Se cree que los espermatozoides que llegan al oviducto inmediatamente después de la cópula no son fértiles y aquellos que han colonizado y permanecido cierto tiempo almacenados en sitios conocidos con el nombre de reservorios, migran posteriormente hacia el sitio de la fertilización mediante su propio movimiento progresivo, siendo el cérvix una de las estructuras que sirve de reservorio espermático.

El moco cervical (MC) es una sustancia viscosa y clara, que se encuentra en el canal cervical de las especies de mamíferos. Bioquímicamente es una mezcla de fluidos, iones y compuestos orgánicos e inorgánicos y células. El mayor componente del moco cervical es la mucina, glicoproteína producida por la células no ciliadas de las criptas del epitelio endocervical, la cual le da la consistencia gelatinosa (Fordney-Settlage 1981).

Las propiedades físicas y químicas del moco cervical determinan si el espermatozoide penetra en el cérvix y alcanza el sitio de fertilización pudiendo actuar éste como un agente o una barrera para la concepción (Linford 1974).

El moco cervical tiene una fase acuosa, también llamada plasma cervical o componente de baja viscosidad y una fase gel o componente de alta viscosidad. La mucina constituye la fase gel en forma de micelas ordenadas de tal manera que bajo la influencia de estrógenos (E) o progestágenos (G) abre o cierra la luz de los canales paralelos y permiten el paso de los espermatozoides. La fase acuosa contiene proteínas solubles, iones inorgánicos, compuestos orgánicos de

bajo peso molecular, células y agua la cual representa del 90 al 98% de la composición total del moco cervical (Fordney-Settlage 1981).

Se ha demostrado que existe una fuerte interacción biofísica entre el espermatozoide y el moco cervical y qué sus propiedades juegan un papel muy importante en el movimiento espermático individual (Katz *et. al.*, 1981), conservando éste papel aún cuando el espermatozoide pueda evitar al cérvix como es el caso de la Inseminación Artificial (Boyd *et. al.*, 1972).

El MC de muchas especies, muestra cambios cíclicos en sus propiedades físicas y químicas, estando estos cambios sujetos a un control hormonal (Linford 1974, Prasad *et. al.*, 1981). Existe un período limitado durante el ciclo estral, cuando el moco cervical permite al espermatozoide penetrar fácilmente. La penetración máxima en el MC de humanos y bovinos ocurre durante la fase ovulatoria con una marcada reducción antes y después de ésta fase (Linford 1974). En éste período los estrógenos predominan y el MC que es secretado es claro con un alto contenido de agua, más elástico, con un patrón de cristalización mayor y un menor contenido de células y proteínas, siendo esto contrario cuando la progesterona es la que predomina, presentándose esta secreción espesa, opaca e impenetrable para los espermatozoides (Agrawal *et. al.*, 1978).

No obstante que las implicaciones funcionales del MC no estan del todo definidas, al parecer funciona, con excepción del estro, como una barrera mecánica que impide el paso de partículas que de otra manera alcanzarían fácilmente la cavidad uterina. Durante la fase lútea del ciclo estral su función es netamente antimicrobial, la cual se complementa con la presencia de leucocitos, los cuales decrecen conforme se acerca la etapa de estro, en la cual exhibe su función más conocida que es el transporte de los espermatozoides (Fordney-Settlage 1981).

La impenetrabilidad de los espermatozoides en el MC en el humano ha sido

reconocido como una posible causa de infertilidad. Así tenemos los trabajos de Moghissi (1966), quién encontró que el tratamiento con progestágenos produce un moco cervical incompatible con la penetración espermática. Manautou y col. (1966) reportaron que una administración de dosis pequeñas de progestágenos, actúa como un anticonceptivo, aún cuando aproximadamente el 60% de las pacientes que recibieron el tratamiento ovularon. Roland (1970), observó la presencia de espermatozoides en el moco cervical de mujeres tratadas con el progestágeno sintético Norgestrel, sin embargo los espermatozoides fueron incapaces de entrar al útero.

Se han realizado estudios comparativos (Gaddum-Rosse *et. al.*, 1980b) en cuanto a la penetración espermática en MC *in vitro*, de mujeres a la mitad de su ciclo o en bovinos en estro, observándose que si eran puestos en contacto con espermatozoides de humanos, estos penetraban fácilmente, desarrollándose una rápida motilidad unidireccional, considerando por lo anterior que el MC de las dos especies tienen propiedades similares. Asimismo, se ha sugerido que el MC bovino puede ser utilizado como un posible sustituto para el MC humano en casos de infertilidad debida a la deficiencia del MC endógeno (Gaddum-Rosse *et. al.*, 1980a).

Existen estudios (Gaddum-Rosse y Lee 1978, Gaddum *et. al.*, 1980a), que reportan que el comportamiento en cuanto al movimiento de los espermatozoides del hombre y del toro depende de la disposición física de macromoléculas contenidas en el MC.

Se ha comprobado que la secreción del MC en los animales juega un papel importante ya que algunas alteraciones físicas de esta secreción afectan el proceso de fertilización (Youseff 1981). A este respecto Tsiligianni y col. (2000), encontraron que en vacas lecheras los porcentajes de concepción se elevan considerablemente cuando el patrón de cristalización es por encima del grado 3, mismo que corresponde a los grados 1 y 2 de la clasificación propuesta por

Jaramillo (1991).

Boyd y col. (1972) reportan que el 42% de las muestras de MC de animales tratados con acetato de megestrol (M.G.A.), durante 14 días no permitieron la migración espermática al llevarse a cabo pruebas *in vitro*. Al evaluar en las muestras su volúmen, consistencia, cristalización y contenido de fosfatasa alcalina, siendo mayor ésta última en los animales tratados en comparación con los animales no tratados, así como la velocidad de migración de los espermatozoides que fue menor en el moco cervical de los animales tratados. En relación a esto Akhtar y col. (1980), reportan que en moco fino ó intermedio la distancia que recorren los espermatozoides por segundo fue de 20 a 29 micras y en el moco espeso de 10 a 20 micras por segundo, siendo la mejor viabilidad espermática a la mitad o al final del estro.

Las variaciones en cuanto a la viabilidad y velocidad de los espermatozoides en el moco cervical, pueden estar en relación con los constituyentes químicos de éste último. Yousef (1981), trabajando con moco cervical de vacas en estro y otras en fase luteal, determinó que el contenido de nitrógeno total así como la materia orgánica, su contenido es menor en moco de vacas en estro que en las que están en fase luteal, reportando además que sólo algunos aminoácidos están presentes en el moco cervical de hembras en estro como es el caso de la histidina.

Agrawal y col. (1978), al realizar un estudio comparativo entre los niveles de proteína total y nitrógeno no proteico en MC de vacas y búfalos con mujeres encontró una disminución relativa de contenido proteico y la desaparición de la fracción de globulinas en el moco cervical de mujeres.

Prasad y col. (1981), reporta una disminución significativa en la concentración de las proteínas así como en la actividad de peróxidasas y fosfatasas ácidas y alcalinas, en moco cervical de búfalos hembras que presentaron estro dentro de

los cuatro días posteriores al tratamiento con prostaglandina $F_{2\alpha}$ y Cloprostenol. Considerando que la administración de éstos fármacos alteran significativamente los constituyentes bioquímicos del MC de los animales.

Akhtar y col. (1980), encontraron una variación en la migración de espermatozoides en MC *in vitro*, de muestras procedentes de animales sanos, vacas repetidoras o hembras con cervicitis, relacionando la velocidad disminuida con la baja concentración de sodio encontrada en el MC de vacas repetidoras, siendo el cloruro de sodio (NaCl) el responsable del mantenimiento de la presión osmótica que afecta la receptibilidad de los espermatozoides en el MC y consecuentemente afectan la migración y que la disminución en la velocidad espermática en MC de hembras con cervicitis puede ser debido a la variación en su pH, observándose una correlación positiva entre la penetración de los espermatozoides y el pH del moco cervical, así como el porcentaje de penetración de los espermatozoides en el MC es siempre alta en aquellos animales que gestan en comparación con los que no gestan.

Estudios más recientes llevados a cabo por Gupta (1981) confirman la importancia del pH, sobre la motilidad espermática, ya que al poner en contacto semen con moco vaginal de hembras normales que tenían un pH de 7.8 (7.2 - 8.2) disminuyó su motilidad de 60% a 40-45%, mientras que el moco de vacas repetidoras con un pH de 8.5 a 9.1 la motilidad espermática bajó a 6- 8%.

Eggert-Kruse y col (1993), proponen que el pH del moco cervical es un importante parámetro de la calidad del mismo, y tiene una significativa influencia sobre la viabilidad espermática, la cual ha sido confirmada con la prueba de contacto semen –moco cervical.

La cristalización del MC (formación de helechos), es debida a la cantidad de iones de sodio presentes en éste y el grado de cristalización está directamente relacionado con la velocidad de penetración de los espermatozoides en el MC

(Fordney-Settlage 1981 Tsiligianni *et. al.* 2000). Aunque el fenómeno de cristalización se puede apreciar en cualquier otro fluido corporal, en el MC es claramente dependiente de la acción de los estrógenos, que inducen su formación y la progesterona reduce la incidencia de formación de éste (Tsiligianni *et. al.* 2001).

La receptividad es la habilidad que tiene el MC de permitir a los espermatozoides penetrar en él (Tsiligianni *et. al.* 2001). Existen dos métodos para medir la receptividad del MC, las cuales son ampliamente usadas en medicina humana, pero no así en la práctica veterinaria, estos son: la prueba de penetración y la prueba de contacto semen-moco cervical (SCMC). Estas pruebas son usadas para determinar si los espermatozoides pueden penetrar el MC, manteniendo su motilidad por un periodo de tiempo específico (OMS, 1987).

Se ha observado un decremento en el título de espermaglutininas en el moco cervical durante la medicación con estrógenos, que puede ser aprovechado como un tratamiento alternativo para la infertilidad por la presencia de las mismas en el moco cervical (Ingerslev 1980). Ingerslev y col. (1982), sugiere fuertemente la presencia de anticuerpos contra espermatozoides del tipo IgA en el moco cervical de mujeres infértiles de acuerdo a la aglutinación espermática presentada a la prueba de contacto. Así mismo la presencia de anticuerpos contra espermatozoides del tipo IgG fueron demostrados en el suero sanguíneo. Es posible encontrar anticuerpos contra espermatozoides en el moco cervical en ausencia de la actividad correspondiente en el suero (Chen y Jones 1981).

En mujeres, la penetración espermática del MC es afectada por la presencia de anticuerpos aglutinadores de espermatozoides en suero y de la actividad inmovilizante en el MC (Menge y Beitner 1989; Domagala *et. al.* 1997).

Lorton y First (1977), proponen que la inhibición de la migración espermática a través del MC *in vivo*, puede estar influenciada por la secreción de

inmunoglobulinas en el cervix. De la misma manera se ha demostrado que la reducida penetración espermática en el MC está significativamente asociada con los títulos de anticuerpos contra espermatozoides en el suero (Menge *et. al.* 1982).

Friedman (1991) describe que la inseminación intrauterina es un factor de riesgo para la inducción de la formación de anticuerpos contra espermatozoides en el cérvix, y es precisamente esta práctica la más utilizada en el manejo reproductivo de los hatos lecheros.

Con base en los estudios existentes que atribuyen un papel relevante al moco cervical sobre la capacidad migratoria de los espermatozoides en su paso por el tracto genital femenino, en el presente estudio nos planteamos como objetivo principal evaluar la participación del pH y la arborescencia (formación de helechos) del moco cervical en el síndrome de la vaca repetidora al momento de la inseminación artificial en vacas lecheras y validar una prueba de campo para observar la presencia de algún factor inmunológico presente en el moco cervical.

MATERIALES Y METODOS

Descripción de la zona de trabajo.

El presente trabajo experimental fué realizado en las instalaciones del Rancho La Quinta, ubicado en el Municipio de Actopan en el Estado de Hidalgo. Se localiza a una altitud de 1980 m snm, entre los 20°14'14" de latitud norte y 98°57'00' de longitud oeste. El clima de la región está clasificado como de semiseco templado , tipo BS1KW(w)(i)g, de acuerdo a la clasificación de Köppen modificada por García,(García, 1987). La temperatura media anual varía de 16° a 20° C, con la media mensual máxima presente en mayo (22° C) y la mínima en enero con 14.9° C. Los valores reportados para la precipitación total anual fluctúan entre 400 a 500 mm disminuyendo en febrero donde no rebasa los 5 mm (INEGI, 1996).

Animales, tratamiento y manejo.

Se utilizaron 7 vaquillas al primer servicio; 10 vacas primíparas y multíparas (de segundo al séptimo parto) y 15 vacas que expresan el síndrome de la vaca repetidora (tercer servicio en adelante), que forman parte del hato comercial productivo de 1050 vacas Holstein de registro de alta producción del rancho en estudio las que fueron divididas en los grupos: nulíparas preñadas a primer servicio, primíparas y multíparas preñadas a primer y segundo servicio y repetidoras. Los animales del grupo de repetidoras, se seleccionaron de aquellos animales que han recibido dos servicios de inseminación artificial y no han quedado gestantes y que por lo mismo presentan estro por tercer ciclo consecutivo.

El sistema de alimentación se basó en la dieta convencional ofrecida en el rancho para todas la vacas y vaquillas que incluye: 20% PC en base a MS. El alimento se proporcionó a los animales en el horario de las 4:00 hrs, 12:00 hrs y 16:00 hrs; de acuerdo al manejo del rancho.

Colección y análisis de muestras.

Aparato reproductor.- El estado del útero se evaluó por palpación rectal el día de la inseminación, con la finalidad de estudiar la involución uterina así como los cambios anatomofisiológicos de los ovarios. (Zemjanis, 1980).

Moco Cervical.- Para la recolección del moco, se realizó un lavado del área vulvo-anal para retirar la acumulación de contaminantes. Con un ligero masaje en el cerviz, por vía rectal, se estimuló la salida del moco cervical se colectó en frascos viales para que no se deshidratara y se conservó a -12°C por un periodo de 4 semanas sin cambios en alguna de sus propiedades fisiológicas (Lee *et. al.* 1981).

La evaluación de las propiedades del moco cervical comprendió la estimación del grado de cristalización (formación de helechos) y pH; así como la penetración espermática. (OMS, 1987).

pH.

Inmediatamente después de la recolección, el pH se midió *in situ* con un potenciómetro electrónico y fue corroborado con tiras de papel tornasol.

Cristalización.

Se realizaron improntas con una gota de moco cervical extendiendola sobre un portaobjetos y se clasificaron por su grado de cristalización según la clasificación de Jaramillo (1991).

Grado 1: Cuando la cristalización de las sales del moco cervical se organizan en forma de hojas de helecho pequeñas, finas, abundantes y bien definidas.

Grado 2: La formación de la hoja de helecho para este grado se caracteriza por

que la hoja es de mayor tamaño, y la porción aserrada entre diente y diente es más abierta, la presencia de hojas es menor que en el grado 1.

Grado 3: En este grado las sales sólo se organizan en las nervaduras del helecho encontrando ausencia de la hoja como tal, o bien sólo se forman fragmentos de hojas.

Grado 4: El hallazgo en este grado fue la formación de nervaduras que van acompañadas de una gran cantidad de células epiteliales de tipo basal, así como la presencia de gran cantidad de leucocitos. Esta es la imagen de los mocos que generalmente denominamos como sucios. Sin embargo podemos encontrar que la formación del helecho puede ser la imagen de los grados 1 o 2 con la diferencia de una gran cantidad de leucocitos.

Prueba de Penetración

Para hacer una estimación detallada de la interacción entre los espermatozoides y el moco cervical se realizó una prueba de penetración *in vitro*, conocida como la prueba del portaobjetos (OMS, 1987), la cual consistió en colocar una gota de moco cervical en un portaobjetos y se aplanó con un cubreobjeto. A cada lado y al contacto con el borde del cubreobjeto se depositó una gota de semen de modo que éste se introduzca debajo del cubreobjeto por capilaridad, de esta manera se obtuvo una interfase nítida entre el moco cervical y el semen.

Los resultados se evalúan de la siguiente manera:

Grado 1) Excelentes: ≥ 25 espermatozoides en F1; ≥ 25 espermatozoides en F2.

Grado 2) Buenos: 15 espermatozoides en F1; 10 espermatozoides en F2.

Grado 3) Malos: 5 espermatozoides en F1; 0 espermatozoides en F2.

Grado 4) Negativos: no hay penetración en F1 ni en F2.

Prueba de contacto (SCMC).

Para detectar la presencia de anticuerpos contra los espermatozoides en el moco cervical, se aplicó la prueba del contacto entre espermatozoides y moco cervical (SCMC), que se realizó con una pequeña cantidad de moco cervical preovulatorio (una gota) y aproximadamente la misma cantidad de semen fresco en un extremo de un portaobjetos para microscopia. Se mezclarán muy bien los dos materiales y en el otro extremo del portaobjeto se depositó otra gota de la misma muestra de semen. La mezcla de semen y moco y la gota de semen se cubrieron con sendos cubreobjetos y el preparado se almacenó en una caja de petri húmeda a temperatura ambiente.

A los 30 minutos se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles que se agitaban rápidamente. El semen sólo, sirvió de testigo para la actividad de los espermatozoides.

Los resultados se clasificaron de la siguiente manera:

Grado 1) Fuertemente positivos: se agitan del 76 al 100%.

Grado 2) Positivos: se agitan del 51 al 75%.

Grado 3) Débilmente positivos: se agitan del 26 al 50% (se debe repetir la prueba).

Grado 4) Negativos: se agitan del 0 al 25%.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados por una prueba de correlación por medio del paquete de general de modelos lineares (GLM) del SAS (SAS, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

pH

Las mediciones de pH hechas a los tres grupos de estudio se observan en la tabla 1 y Gráfica 1., donde se puede observar que el Grupo I con 7 animales obtuvo una media de 8.19, teniendo como mínimo 7.443 y máximo 9 con una desviación estándar de 0.592; Grupo II con 10 animales obtuvo una media de 8.03 con un mínimo de 7.21, un máximo de 8.79 y una desviación estándar de 0.541 y Grupo III con 15 animales obtuvo una media de 7.93 con un mínimo de 7.3, un máximo de 8.86 y una desviación estándar de 0.471.

Tabla 1. Medias de mínimos cuadrados para la variable pH del Moco Cervical en grupos de vacas productoras con y sin Síndrome de la Vaca Repetidora.

	n	X	DS	MIN	MAX
GPO I	7	8.19	0.592	7.43	9
GPO II	10	8.03	0.541	7.21	8.79
GPO III	15	7.93	0.471	7.3	8.86

n = número de animales.

X = media.

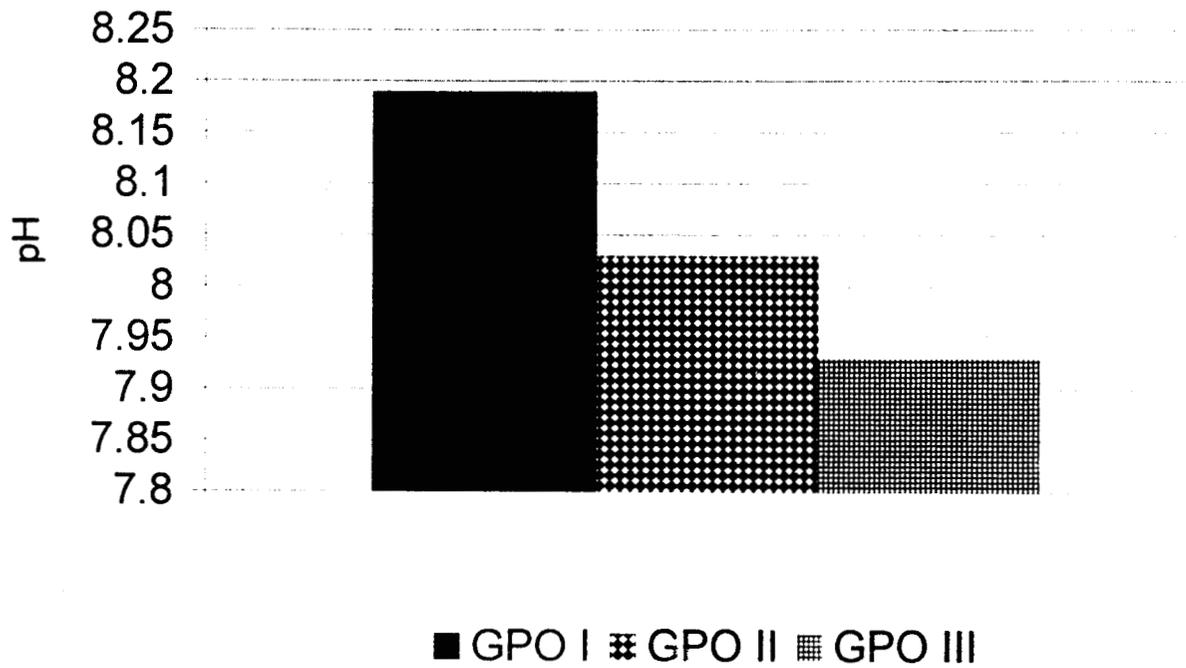
DS = Desviación Standard

MIN = dato mínimo registrado en el grupo.

MAX = dato máximo registrado en el grupo.

De acuerdo a los trabajos realizados por Gupta (1981) y Eggert-Kruse y col. (1993), en los cuales se encontró que a bajos niveles de pH la motilidad espermática se ve seriamente afectada y que en los niveles que oscilan entre los 7 y 8.2 de pH se mantiene una motilidad óptima para el libre desplazamiento de los espermatozoides por todo el tracto reproductivo hasta el sitio de fertilización. En promedio las mediciones de los tres grupos se incluyen dentro del rango descrito por los estos dos autores. Por lo cual el pH no es una causa de la presentación del SVR en los animales del presente estudio.

Grafica 1. Representación gráfica de las medias de mínimos cuadrados para la variable pH del Moco Cervical en grupos de vacas altas productoras con y sin el síndrome de la vaca repetidora.



Cristalización

De las improntas observadas al microscopio se obtuvieron imágenes que concuerdan con los grados de estimación de formación de helechos en el MC propuestos por Jaramillo (1991), aunque existen otras escalas de estimación de este fenómeno como la de Tsiligianni y col. (2000), la cual presenta parámetros similares, por lo cual se optó por la primera. De acuerdo a este criterio se encontraron imágenes que muestran una formación bien definida de las hojas de helecho, finas y abundantes (Fotografía 1.), imágenes en las cuales las hojas del helecho son de mayor tamaño y con una separación mas amplia entre los dientes de la porción aserrada (Fotografía 2.), imágenes en las cuales sólo se aprecian las nervaduras del helecho, sin la presencia de hojas (Fotografía 3.) e imágenes en las cuales se aprecia una gran cantidad de leucocitos con muy poca formación de helechos (Fotografía 4.).

En la tabla 2 se puede observar que las medias de los grupos II y III son similares, aunque el rango entre el máximo y el mínimo es el mismo para los tres grupos, en el grupo I se tuvo un mejor grado de cristalización.

Estudios realizados por Fordney-Settlage (1981) en los cuales se constata que la velocidad de penetración esperamtica en el MC está directamente relacionada con el grado de cristalización de este y que es en aquellos en que mejor se aprecia la formación de helechos en los cuales los índices de fertilidad aumentan, los grados de cristalización 1 y 2 son de aquellos MC dónde se encontrará una penetración espermática idónea para que se lleve a cabo la fertilización.

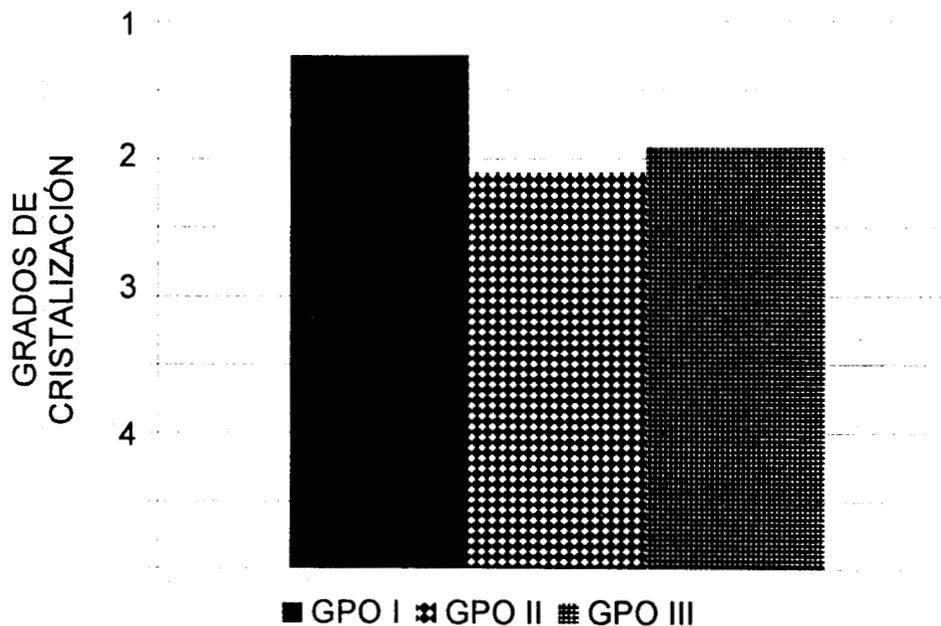
Tabla 2. Medias de mínimos cuadrados para la variable CRIST del Moco Cervical en grupos de vacas altas productoras con y sin Síndrome de la Vaca Repetidora.

	n	X	DS	MIN	MAX
GPO I	7	2	1.155	1	4
GPO II	10	2.4	0.966	1	4
GPO III	15	2.53	0.99	1	4

n = numero de animales.
 X = media.
 DS = Desviación Standard.

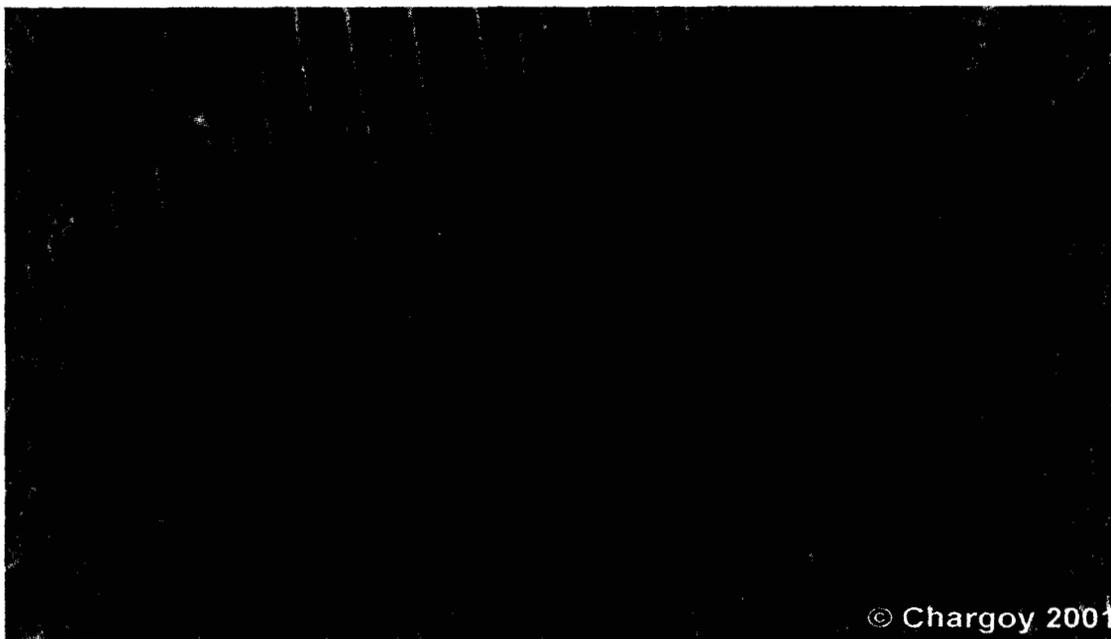
MIN = dato mínimo registrado en el grupo.
 MAX = dato máximo registrado en el grupo.

Grafica 2. Representación gráfica de medias de mínimos cuadrados para la variable CRIST del Moco Cervical en grupos de vacas productoras con y sin Síndrome de la Vaca Repetidora.

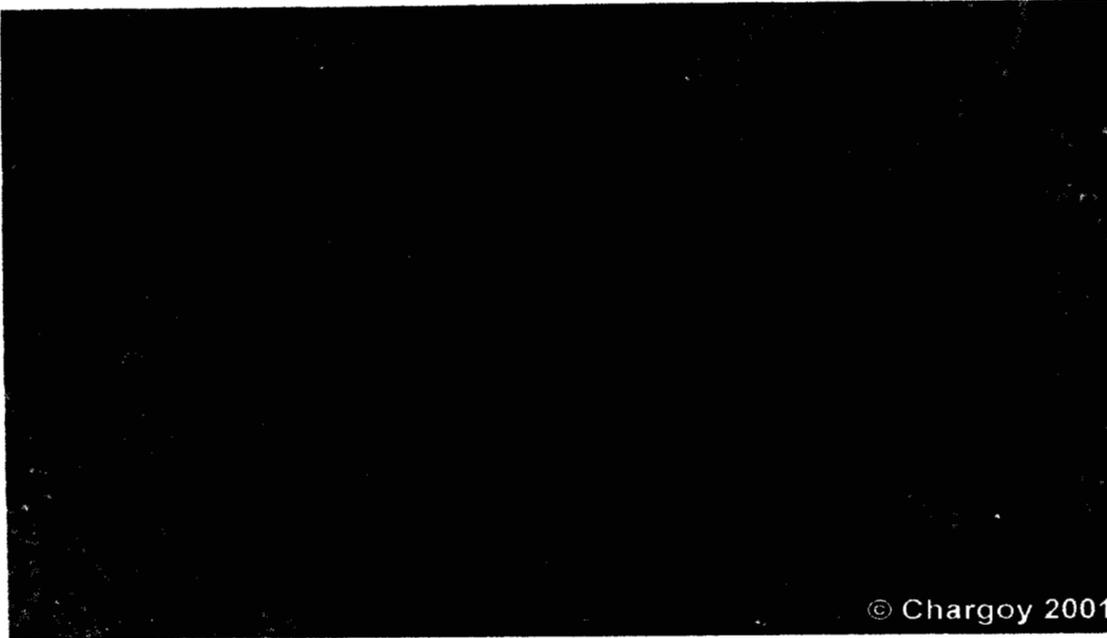




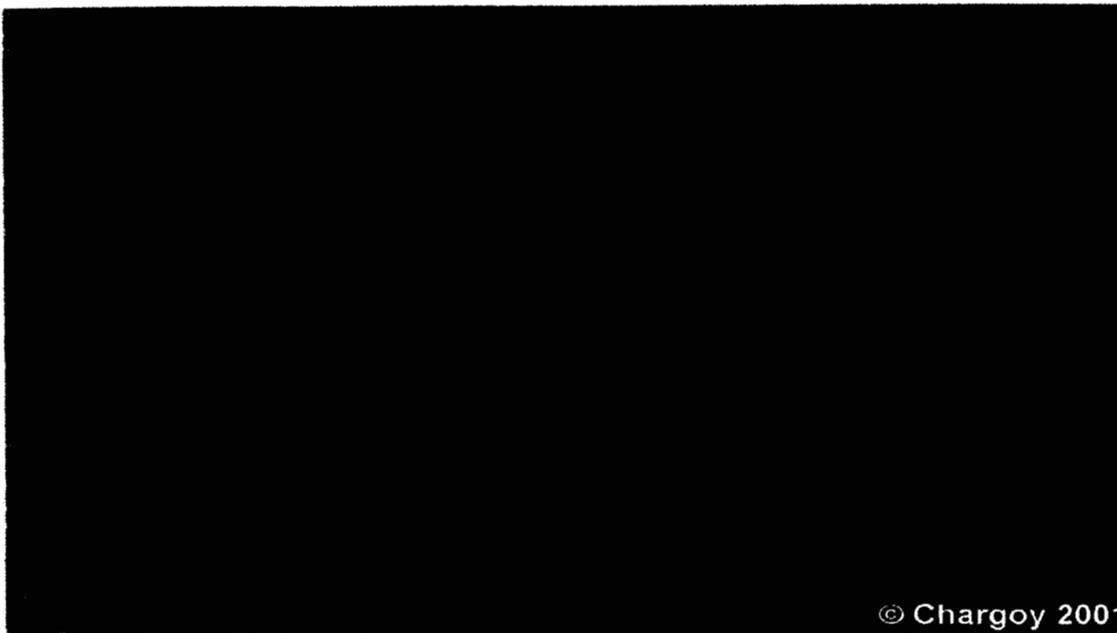
Fotografía 1. Grado 1 de cristalización del MC observada con un microscopio de contraste de fases a una resolución de 100X. Nótese la apariencia de hojas de helecho.



Fotografía 2. Grado 2 de cristalización del MC observada con un microscopio de contraste de fases a una resolución de 100X. Nótese el cambio en el tamaño de las hojas.



Fotografía 3. Grado 3 de cristalización del MC observada con un microscopio de contraste de fases a una resolución de 100X. Nótese la ausencia de hojas.



Fotografía 4. Grado 4 de cristalización del MC observada con un microscopio de contraste de fases a una resolución de 100X. Nótese la ausencia de helechos y la gran cantidad de leucocitos.

Prueba de Penetración

En la interfase aparecieron a los pocos minutos prolongaciones digitiformes o falanges de liquido seminal, que penetraron en el moco. La mayoría de los espermatozoides penetraron en estas digitaciones antes de entrar en el moco. En muchos de los casos un solo espermatozoide aparentó encabezar a una columna de espermatozoides dentro del moco. Una vez que estuvieron dentro del moco cervical, los espermatozoides se abrieron en abanico y se movieron al azar. Algunos volvieron a la capa del plasma seminal, en tanto que la mayoría migró en la profundidad del moco cervical hasta que encontraron la resistencia de detritos celulares o leucocitos. Para interpretar esta prueba se cuantificó la cantidad de espermatozoides por campo ocular a partir de la interfase (Foto 5).

Los espermatozoides que estuvieron en las digitaciones no se incluyeron en el conteo. Sólo los espermatozoides que estuvieron fuera de toda duda dentro de la sustancia del moco cervical se consideraron penetrados. Para cuantificar la prueba se hizo un conteo en el primer campo microscópico consecutivo a la interfase, que se llamó F1 (magnificación 100x), a los 5 y 15 minutos de la iniciación de la prueba. La magnificación se anotó para cada prueba. Para estudiar la profundidad de la penetración también se evaluó el segundo campo microscópico adyacente al primero (F2) y también el tercero (F3), anotando la cantidad de espermatozoides que hubo en ellos.

Como la prueba se hizo para comparar la calidad de varios especimenes de moco cervical, se utilizó una sola muestra de semen con un recuento, motilidad y morfología óptimos.

En la tabla 3 se pueden observar los resultados obtenidos, donde todos los animales del Grupo I obtuvieron la calificación de 1, lo cual quiere decir que un gran numero de espermatozoides fueron capaces de penetrar y avanzar profundamente dentro del MC, en el Grupo II el promedio de la calificación fue de 1.5, teniendo como calificación máxima 1 y como mínima 3, y en el Grupo III la

media fue de 1.73 con una calificación máxima de 1 y una mínima de 4.

Tabla 3. Medias de mínimos cuadrados para la variable PEN del Moco Cervical en grupos de vacas altas productoras con y sin Síndrome de la Vaca Repetidora.

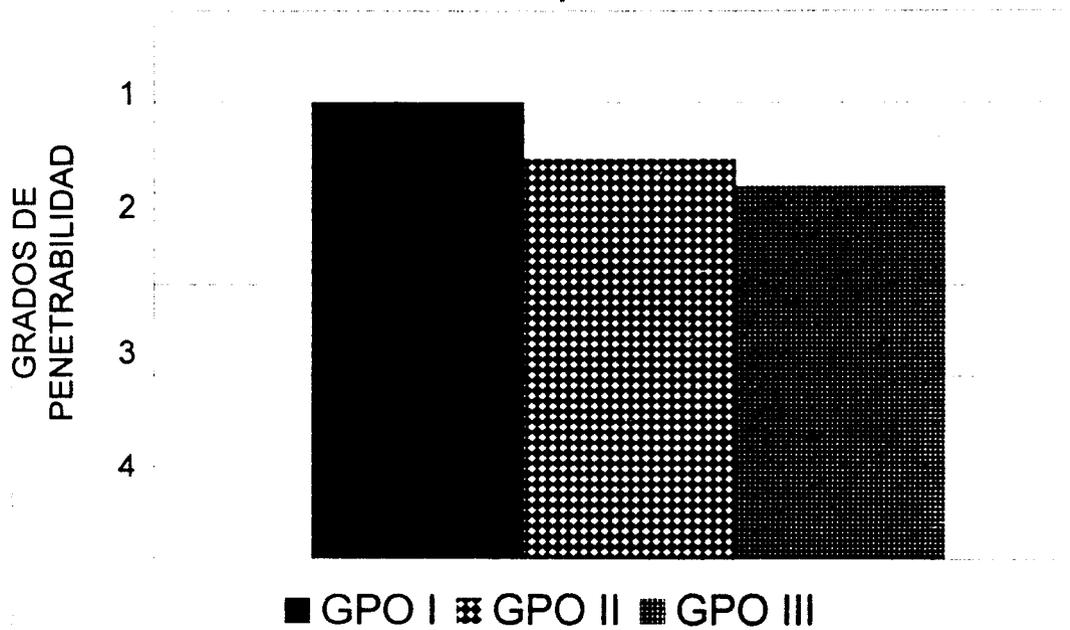
	n	X	DS	MIN	MAX
GPO I	7	1	0	1	1
GPO II	10	1.5	0.707	1	3
GPO III	15	1.73	1.099	1	4

n = número de animales.
X = media.
DS = Desviación Standard.

MIN = dato mínimo registrado en el grupo.
MAX = dato máximo registrado en el grupo.

Estos resultados al ser comparados con los resultados de la evaluación del patrón de cristalización del MC, concuerdan con lo descrito por Fordney-Settlage (1981), Bishnoi (1982) y Tsiligianni y col. (2000) donde el grado de cristalización está directamente relacionado con la velocidad de penetración de los espermatozoides en el MC, esto mismo se puede apreciar de mejor manera en las Gráficas 2 y 3 donde al disminuir el grado de cristalización, proporcionalmente se disminuye la penetración espermática. Por lo anterior podemos decir que el patrón de cristalización si es un indicador de la calidad del MC, en cuanto a la presentación del SVR se refiere.

Grafica 3. Representación gráfica de medias de mínimos cuadrados para la variable PEN del Moco Cervical en grupos de vacas altas productoras con y sin Síndrome de la Vaca Repetidora.





Fotografía 5. Evaluación de la Penetrabilidad Espermática en el MC, formación de la digitación de espermatozoides al contacto con el MC. Resolución 100X en microscopio de contraste de fases.

Prueba de contacto (SCMC)

Para esta prueba no se tuvieron en cuenta los espermatozoides inmóviles ni los que se agitan con lentitud. Se consideró que los espermatozoides que se agitaban pero que avanzaban con lentitud y los que se agitaban con movimientos de avance intermitentes pertenecían a la fracción que se aglutinaba.

Como la prueba se efectuó con varias muestras de MC y un solo lote de semen, se realizó una especie de prueba cruzada, donde se dedujo que de existir aglutinación, podía deberse a factores del MC y no del semen

Los resultados en la Tabla 4. muestran que en el Grupo I hubo muy escasa aglutinación de espermatozoides (Fotografía 6) obteniendo una calificación de 1.57, con un máximo de 1 y mínimo de 2; en el Grupo II se observó una aglutinación mayor de espermatozoides sin que esta llegara a representar un impedimento para que los animales de este grupo gestaran, con una calificación de 2.3 con un máximo de 1 y mínimo de 3. En el grupo que si se observó una gran aglutinación de espermatozoides fue en el III el cual obtuvo una calificación de 3.4 con un máximo de 3 y mínimo de 4 (Fotografía 7).

Los resultados de este estudio no descartan que este involucrado algún factor inmunológico como ha sido descrito en humanos (Menge & Naz 1993, Domagala *et. al.* 1997), donde se han encontrado anticuerpos contra espermatozoides en el MC de mujeres infértiles, los cuales aglutinan a los espermatozoides impidiendo que estos fertilicen al óvulo. Aunado a esto la inseminación intrauterina en humanos ha sido descrita como un factor de riesgo para la activación de un proceso inmunológico en la mucosa del tracto reproductivo (Friedman, *et. al.* 1991). Es muy probable que esto mismo este sucediendo en las vacas del ható en estudio.

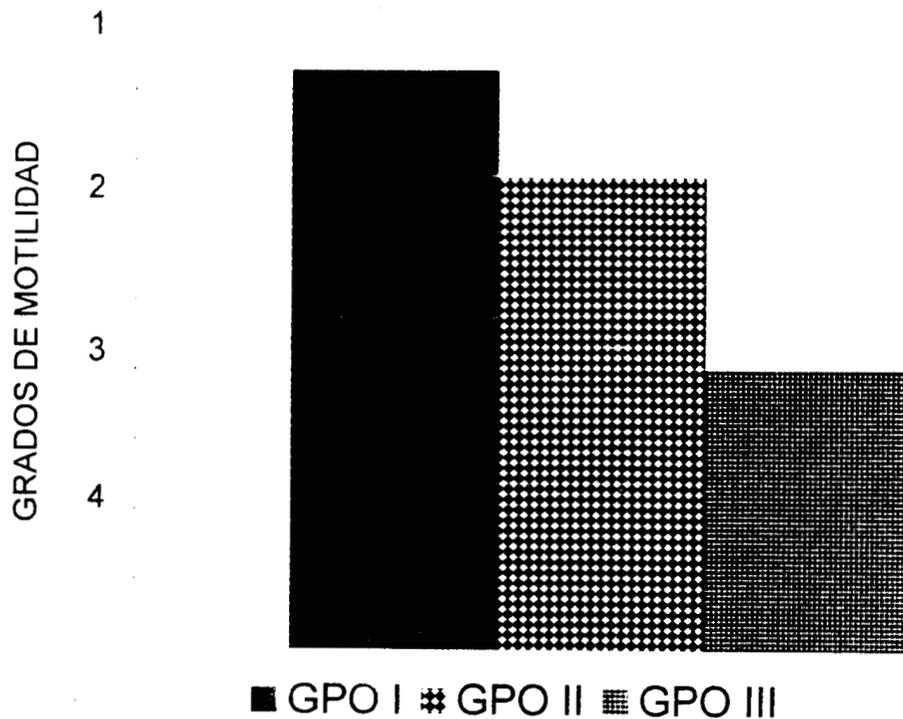
Tabla 4. Medias de mínimos cuadrados para la variable SCMC en grupos de vacas altas productoras con y sin Síndrome de la Vaca Repetidora.

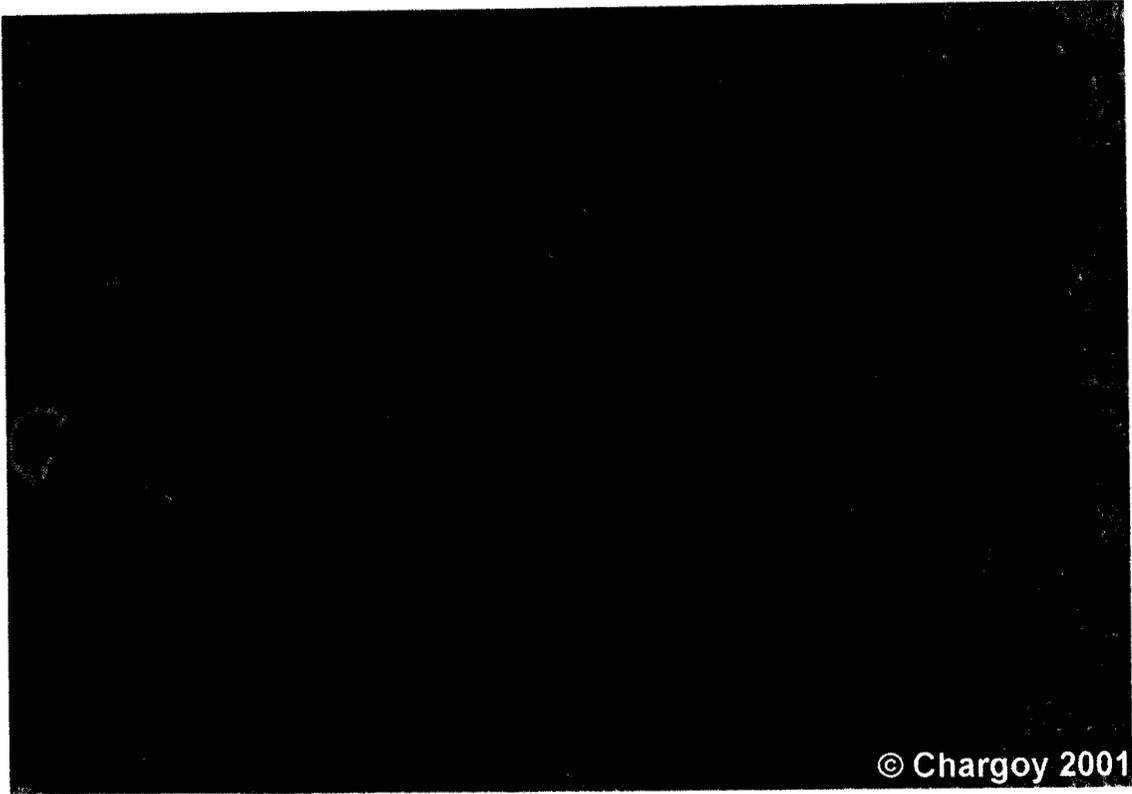
	n	X	DS	MIN	MAX
GPO I	7	1.57	0.534	1	2
GPO II	10	2.3	0.823	1	3
GPO III	15	3.4	0.507	3	4

n = número de animales.
 X = media.
 DS = Desviación Standard.

MIN = dato mínimo registrado en el grupo.
 MAX = dato máximo registrado en el grupo.

Grafica 4. Representación gráfica de medias de mínimos cuadrados para la variable SCMC en grupos de vacas altas productoras con y sin Síndrome de la Vaca Repetidora.





Fotografía 6. Libre movimiento de los espermatozoides en el MC a 30 minutos de homogenizar fluidos. Resolución a 100X.



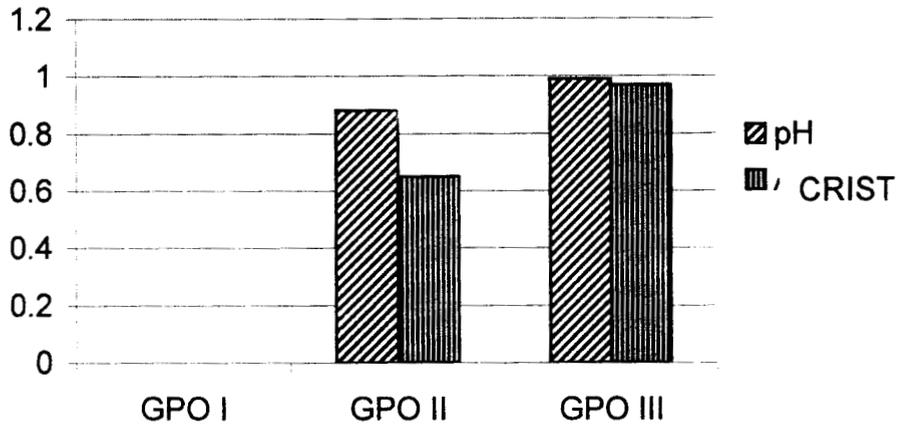
Fotografía 7. Aglutinación e inmovilización de espermatozoides en el MC a 30 minutos de homogenizar fluidos. Resolución a 200X .

Análisis de Correlación entre las variables pH, CRIST, PE y SCMC.

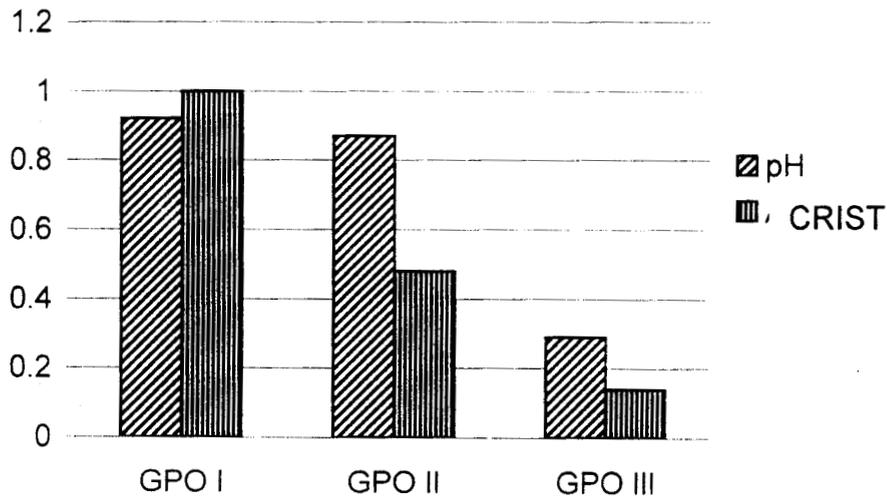
Las correlaciones muestran que la variable Penetrabilidad Espermática (PE) es alta con respecto a la variable pH en los grupos II ($r = 0.88$) y III ($r = 0.99$). Así mismo las correlaciones de la variable PE con respecto a la variable CRIST fueron altas en los grupos II ($r = 0.65$) y III ($r = 0.97$). (Gráfica 5.). La variable SCMC tiene una alta correlación con respecto a la variable pH en los grupos I ($r = 0.92$), II ($r = 0.87$). Con respecto a la variable CRIST la correlación es alta en el grupo I ($r = 1.00$) y mediana para el grupo II ($r = 0.48$), como se observa en la Gráfica 6.

En este estudio los valores de la variable pH del MC en los tres grupos no fueron estadísticamente diferentes, por lo cual se considera que esta característica no es determinante para la penetración y motilidad espermática. Por el contrario, la cristalización demostró ser un factor importante, pues aquellos individuos con una alta calificación en el patrón de arborescencia mostraron también un alto grado de penetrabilidad y motilidad espermática. Sin embargo en el Grupo III se encontraron individuos, los cuales aún teniendo un pH y una cristalización del MC óptimos y una muy buena penetrabilidad, la motilidad espermática se ve afectada negativamente por lo que es probable que la inmovilización de los espermatozoides este asociada a la presencia de anticuerpos en el MC, ya descrito como un factor de infertilidad (Domagala *et. al.*, 1997) y así mismo que un factor de riesgo para la inducción de la presencia de estos anticuerpos es la inseminación intrauterina (Friedman *et. al.*, 1991), a la cual los animales en estudio han sido sometidos.

Grafica 5. Correlación entre la variable PE y las variables pH y CRIST



Grafica 6. Correlación entre la variable SCMC y las variables pH y Arborescencia



CONCLUSIONES

De los resultados del presente estudio se concluye que:

1.- El pH del MC no es un indicador determinante para la presentación del SVR, pues en todos los grupos de estudio se obtuvieron mediciones similares encontrando animales que quedaron gestantes en los grupos I y II con un pH en MC cuya motilidad espermática se ve disminuida notablemente, mientras que en el grupo III se encontraron individuos que no gestaron aun presentando un pH en el MC que favorece la motilidad espermática.

2.- El patrón de arborescencia funciona como un indicador determinante para la presentación del SVR, pues aquellos MC en los cuales se observa una buena formación del hehecho, obtienen una alta calificación en la prueba de penetrabilidad, haciéndose evidente como la capacidad de los espermatozoides para penetrar el MC disminuye conforme el grado de cristalización del MC disminuye. De la misma manera, muchas vacas que no quedaron gestantes después de la IA, presentaron baja calificación en la prueba de penetrabilidad espermática en el MC.

3.- La prueba de contacto semen-MC es una herramienta sencilla de laboratorio que podría ser muy útil para la evaluación rutinaria del MC en el manejo reproductivo de los hatos lecheros, ya que algunas vacas del grupo III que presentaban un pH y un patrón de arborescencia óptimos para la penetrabilidad espermática, fallan en esta prueba al presentar aglutinación e inmovilización de espermatozoides quedando claro que es ésta la causa de que no quedaran gestantes.

4.- Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, cuyo objetivo fue correlacionar la participación de algunas propiedades fisico-químicas del MC con la presentación del SVR, sería conveniente realizar más estudios encaminados a

esclarecer la participación de algún factor inmunológico presente en el MC, que sea una causa de la falla en la fecundación.

10/10/2010 10:10:10

LITERATURA CITADA

- Agrawal, S. C., Pangaukar G. R., Datta I. C. 1978. A comparative study of total protein and non-protein nitrogen level in oestral cervical mucus in different breeds of cows and buffalo. *Indian Vet. J.* 55 : 756-760.
- Akhtar, H., Singh B. K., Sinha R. P. 1980. Studies on migration rate of spermatozoa in bovine cervical mucus. *Indian Vet. J.* 57 : 386-390.
- Allen-Garverick, H., Youngquist R.S. 1999. Getting problem cows pregnant. University Extension. University of Missouri – Columbia.
- Bishnoi, B. L., Vyas K. K., Dwaraknath P. K. 1982. Note of spinnbarkeit and crystallization pattern of bovine cervical mucus during oestrus. *Indian J. Anim. Sci.* 52 : 438-440.
- Boyd, L. J., Gibbons R. A., Tasker J. B. 1972. Characteristics of cervical mucus from progestagen-treated cattle. *Br. Vet. J.* 128 : 260-269.
- Chen, C., Jones W. R. 1981. Application of a sperm micro-immobilization test to cervical mucus in the investigation of immunologic infertility. *Fertil. Steril.* 35 (5): 542-5
- Domagala, A., Kasprzak M., Kurpisz M. 1997. Immunological characteristics of cervical mucus in infertile women. *Zentralbl Gynakol* 119 (12): 616-20.
- Eggert-Kruse, W., Kohler A., Rohr G., Runnebaum B., 1993. The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. *Fertil. Steril.* 59 (3) : 617-28.
- Fordney-Settlage, D. 1981. A review of cervical mucus and sperm interactions in humans. *Int. J. Fertil.* 26: 161-169.
- Friedman, A.J., Janeau-Norcross M., Sedensky B. 1991. Antisperm antibody production following intrauterine insemination. *Hum. Reprod.* 6 (8) : 1125-8.
- Gaddum-Rosse, P., Lee W. I. 1978. Sperm motility in cervical mucus a comparative study. *Anat. Rec.* 190 : 593.
- Gaddum-Rosse, P., Blandau R., Lee W. 1980a. Sperm penetration into cervical mucus in vitro. I. Comparative studies. *Fertil. Steril.* 33 (6): 636-643.
- Gaddum-Rosse, P., Blandau R. J., Lee W. I. 1980b. Sperm penetration into cervical mucus in vitro. II. Human spermatozoa in bovine mucus. *Fertil. Steril.* 33 (6): 644-648.

- Gupta, K. C., Vyas K. K., Areek P. K., Dwaraknath P. K. 1981. Note on sperm and cervical mucus incompatibility in repeat-breeding cows. *Indian J. Anim. Sci.* 51 (10) : 981.
- Ingerslev, H. J. 1980. Spermagglutinating antibodies and sperm penetration of cervical mucus from infertile women with spermagglutinating antibodies in serum. *Fertil. Steril.* 34 (6): 561-568.
- Ingerslev, H. J., Moller N. P., Jager S., Kremer J. 1982. Immunoglobulin class of sperm antibodies in cervical mucus from infertile women. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2 (6): 296-300.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 1996. Síntesis geográfica nomenclatura y anexo cartográfico del Edo. de México , México.
- Jaramillo, J. M. T. 1991. Efecto de las prostaglandinas y progestagenos sobre la composición del moco cervical en vacas Holstein. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- Katz, D. F., Bloom T. D., Durant R. H. 1981. Movement of bull spermatozoa in cervical mucus. *Biol. Reprod.* 25 : 932-937.
- Lee, W. I., Gaddum-Rosse P., Blandau R. J. 1981. Sperm penetration into cervical mucus in vitro. III. Effect of freezing on estrous bovine cervical mucus. *Fertil. Steril.* 36: 209- 213.
- Linford, E. 1974. Cervical mucus: an agent or a barrier to conception. *J. Reprod. Fertil.* 37 : 239-250.
- Lorton, S. P., First N. L. 1977. Inhibition of sperm migration through cervical mucus in vitro. *Fertil. Steril.* 28: 1295-1300.
- Manatou, J. M., Cortez V., Giner J., Aznar R., Casasola J., Rudel H. W. 1966. Low dose of progestagen as an approach to fertility control . *J. Reprod. Fertil.* 17 (1) : 49-57.
- Matter, P. E. 1966. Formation and retention of the spermatozoan reservoir in the cervix of the ruminant. *Nature* 1479-1480.
- Menge, A. C., Medley N. E., Mangione C. M., Dietrich J. W. 1982. The incidence and influence of antisperm antibodies in infertile human couples on sperm-cervical mucus interaction and subsequent fertility. *Fertil. Steril.* 38 (4): 439-446.

- Menge, A. C., Beitner O. 1989. Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertil. Steril.* 51 (3): 486-492.
- Moghissi, K. S. 1966. Cyclic changes of cervical mucus in normal and progesterin-treated women. *Fertil. Steril.* 17 (5) : 663-675 .
- Organización Mundial de la Salud. 1987. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Ed. Médica Panamericana.
- Prasad, A., Kalyan N. K., Bachlaus K., Arora R. C., Pandey S. 1981. Biochemical changes in the cervical mucus of buffalo after induction of oestrus with prostaglandin F2 alpha and cloprostenol. *J. Reprod Fertil.* 62: 583-587.
- Roland, M. 1970. Prevention of sperm migration into the uterine cavity by a microdose progestagen. *Fertil. Steril.* 21 : 211.
- SAS Institute, Inc. 1990. SAS for linear models: a guide to the ANOVA and GLM procedures. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Tsiligianni, T.H., Karagiannidis A, Brikas P, Saratsis P. 2000. Relationship between certain physical properties of cervical mucus and fertility in cows. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 17(1) : 28-31.
- Tsiligianni, T.H., Karagiannidis A, Brikas P, Saratsis P. 2001. Physical Properties of bovine cervical mucus during normal and induced (progesterone and/or Pgf_{2α}) estrus. *Theriogenology* 55 (2): 629-640.
- Whitmore, H.L., Conlin B. J., Seguin B. E., 1992. Repeat-breeding problems in dairy cattle. *Reproduction. University of Minnesota*
- Yousef, A. A. 1981. Note on the biochemical aspects of bovine cervical mucus. *Indian J. Anim. Sci.* 51 (11) : 1082-1085.
- Zemjanis R. 1980. Anoestrus in cattle, in current therapy. *Theriogenology* 193-8.