

**ESTUDIO PREVIO SOBRE EL CONTENIDO ESTROGENICO
DE ALGUNAS PLANTAS FORRAJERAS DE LA PROVINCIA
DE LEON**

*Por Eduardo Vigil Maeso
Juan Antonio Olmedo Olmedo
Miguel Abad Gavín.*

INTRODUCCION:

Ante la pavorosa ola de infertilidad que afectó en los años 1941-45 a los efectivos ovinos de Australia, se centró la atención mundial en los inesperados efectos nocivos provocados por sustancias biológicamente activas presentes en los pastos, junto a los perjuicios económicos causados por dichos agentes.

Biológicamente el mayor interés recaía en el hecho de ser la primera dolencia atribuible a los Estrógenos vegetales, definiendo los australianos al proceso provocado como Clover Disease (Enfermedad del Trébol), habiéndosela incluido ya en la terminología veterinaria como sinónimo del síndrome hiperestrogénico de origen pratense, caracterizado por infertilidad, distocias por inercia uterina, prolápso uterino, etc.

La existencia de plantas con actividad estrogénica capaces de producir tales trastornos de la reproducción ha sido comprobada en los pastos de múltiples países por diversos autores. El síndrome ha sido, incluso, reproducido experimentalmente por numerosos investigadores^{1,6,22,23} inyectando por vía subcutánea o intramuscular estrógenos activos, habiendo establecido MOULE¹⁵ que la dosis mínima para producir infertilidad en la oveja es de 0,1-0,3 mg/día/oveja de DES, durante seis meses.

Estableciendo comparativamente la actividad estrogénica del Trébol subterráneo, usando ratas nulíparas, se comprueba que un ovino consume dosis de estrógenos del orden de 0,015 mg/día⁵ de DES. Por otro lado y teniendo en cuenta que 100 gr. de materia seca de trébol subterráneo contienen 740 mg. de Genisteína, basta que un ovino consuma diariamente 1 Kg. de materia seca de dicha leguminosa, para ingenir 7 gr. de Genisteína/día.⁹

Los fitoestrógenos pertenecen a tres grupos:

Esteroides.

Isoflavonas.

Cumarinas, caracterizándose todos ellos ¹⁸ por:

—Ser eficientes administrados oralmente, a diferencia de los estrógenos naturales, sólo activos parenteralmente.¹⁰

—Termoestabilidad, incluso por encima de los 100° C.

—Elevada resistencia a la acción ácida.

—Resistencia relativamente alta a la acción alcalina.

—Actividad estrogénica menor que las de las hormonas foliculares y estrógenos sintéticos.

Entre los fitoesteroides que se han aislado se encuentran la Estrona ²⁰ y el Estriol ^{11,20}. Según BRADBURY y WHITE,⁵ las levaduras contienen también una gran variedad de Esteroides, entre los que se incluyen el Ergosterol y el Zimosterol, siendo interesante señalar que las fuentes más ricas, entre los vegetales, en fitoestrógenos son los aceites obtenidos de semillas de trigo, centeno, maíz, nabo, alfalfa, soja, etcétera.²⁰

Entre las isoflavonas las biológicamente activas son: genisteína, biochanín A, prunetina, formononetina y daidzeína.¹³

La genisteína se ha demostrado en diversas especies vegetales,^{4,5,8,9,16,20,24} existiendo junto a ella una serie de derivados suyos, todos glucósidos, de los cuales los más interesantes son: biochanín A,^{7,8,14,17,21} prunetina,^{5,20} formononetina^{5,7,8} y daidzeína.^{8,9,12,20} De estas isoflavonas la daidzeína es la más activa biológicamente, la genisteína y biochanín A tienen prácticamente la misma actividad, en tanto que la Formononetina presenta una actividad inferior.

De las cumarinas la más interesante es el cumestrol, aislado en cierto número de especies vegetales^{9,19} y habiendo sido ya sintetizado.²⁰ Su actividad es 30 veces superior a la de la genisteína,¹⁹ calculándose que 1 mg. de DES equivale a 2,780 mg. de cumestrol.²

La amplia difusión de los fitoestrógenos en las especies vegetales forrajeras, una serie de hechos anómalos observados en la Clínica de este Departamento y el plan de intensificación de forrajes en la zona, con la introducción de nuevas variedades, de las cuales algunas pueden poseer fuerte potencia estrogénica, nos ha conducido a plantear la presente experiencia, como avance de un plan más amplio que este Departamento se propone realizar en un futuro inmediato, para establecer un Mapa Estrogénico de los pastos de la provincia.

MATERIAL Y METODOS:

Se ha investigado la actividad estrogénica de dos especies vegetales bastante extendidas en la provincia: alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol (*Trifolium repens*). La

alfalfa se encontraba en estado de prefloración y con una humedad del 6,5 %, procedente de Grandoso (León). El trébol se encontraba en estado de floración, con una humedad del 8,3 %, siendo su procedencia la misma que en el caso de la alfalfa.

El método seguido para la extracción del principio activo ha sido el descrito por BONADONNA y FURNAROLI.³

El extracto final obtenido de la alfalfa arrojó un peso de 1,427 grs. que se disolvieron en 20 c.c. de alcohol etílico, calidad reactivo. De esta disolución se inyectaron 0,4 c.c. diarios, por vía subcutánea, durante diez días, a los cinco animales destinados a la experiencia, de forma que la dosis total de extracto que recibió cada uno de ellos fue de 0,2854 grs.

El extracto de trébol, a su vez, arrojó un peso de 2,051 grs. disueltos, así mismo, en 20 c.c. de alcohol etílico, inyectados por la misma vía, a las mismas dosis y durante el mismo tiempo que en el caso de la alfalfa, de forma que la dosis total/rata administrada fue de 0,4102 grs.

En la experiencia se han usado ratas blancas de laboratorio, de 6-8 meses de edad, con pesos comprendidos entre 232 y 384 grs., todas ellas nulíparas. Los animales se castraron según la técnica de ZONDECK, con las precauciones asépticas habituales. Tras la ovariectomía los animales se colocaron en jaulas individuales, sometidos a alimentación standard y añadiendo antibióticos al agua de bebida durante los cinco primeros días tras la castración.

Diez días después de la ovariectomía se practicaron frotis vaginales diarios, durante siete días, en cada una de las ratas, tiñéndose dichos frotis mediante hematoxilina-cosina. La constancia de imagen anéstrica dio la garantía de que los animales eran aptos para ser usados como reactivos biológicos.

Al fin de estos 17 días la atrofia uterina era prácticamente completa, como se comprobó ante el sacrificio de cuatro animales, elegidos al azar, comenzándose entonces la administración de los extractos de alfalfa, trébol y un estrógeno patrón (dienestrol).

Los 27 animales usados en la experiencia se agruparon de la siguiente forma:

—Grupo A: cinco animales, a los que se inyectó el extracto de alfalfa.

—Grupo B: cinco animales, a los que se inyectó el extracto de trébol.

—Grupo C: cinco animales, que no recibieron ningún tratamiento, como controles.

—Grupo D: 12 animales, divididos a su vez en seis subgrupos, de dos animales cada uno, que recibieron cantidades conocidas de 3,4-p'-dihidroxi-difenil-2,4-heksamideno (dienestrol), administrado en dosis crecientes, por vía subcutánea.

Este estrógeno estaba destinado a provocar una respuesta ponderal uterina progresivamente creciente para la obtención de una escala de valores de estimulación uterina que permitiera establecer equivalencias con la actividad de los fitoestrógenos, es decir una curva patrón de dosis.

Veinticuatro horas después de la inyección todos los animales se pesaron indi-

vidualmente, sacrificándoseles por rotura del cuello. Seguidamente se extraía el útero, a nivel de la unión útero-vaginal, se liberaba de los ligamentos, se pesaban en balanza de precisión, tras abrirlos longitudinalmente y comprimirlos entre dos hojas de papel de filtro para eliminar las secreciones, a fin de apreciar las fluctuaciones sufridas por el órgano bajo la influencia de los estrógenos administrados.

Para cada animal se halló la relación Peso Uterino/Peso Corporal (PU/PC), para separar los efectos estrogénicos de los debidos al peso corporal correspondiente. Las relaciones medias PU/PC de los animales tratados con extractos de alfalfa, trébol y cada uno de los seis lotes tratados con Dienestrol se compararon con la relación PU/PC media de los animales controles, a fin de determinar la tasa de actividad estrogénica de cada uno de los productos usados.

RESULTADOS:

En las condiciones de la presente experiencia y en los estados vegetativos de las plantas utilizadas, tanto la alfalfa como el trébol, demostraron poseer actividad estrogénica, induciendo un incremento de peso uterino, respecto de los animales usados como control, de 7,39 y 4,79, respectivamente, incrementos que se corresponden aproximadamente con los inducidos por 15 μ g y 3 μ g de dienestrol, respectivamente (Cuadros I, II y III y fotografías n.º 1, 2, 3 y 4).

1	2	3	4	5	6
Alfalfa	0,0254 gr.	0,2854 gr.	317,6 gr.	0,96 gr.	0,00303
Trébol	0,04102	0,4102	290,03	0,590	0,00196
DES 1. ^o	0,3ug	3ug	294,60	0,600	0,00203
DES 2. ^o	0,6ug	6ug	331,10	0,700	0,00211
DES 3. ^o	0,9ug	9ug	234,45	0,507	0,00216
DES 4. ^o	1,2ug	12ug	341,60	0,720	0,00298
DES 5. ^o	1,5ug	15ug	262,60	0,860	0,00327
DES 6. ^o	1,8ug	18ug	323,00	0,767	0,00330
Controle	—	—	354,08	0,174	0,00042

1 = Compuesto inyectado
2 = Dosis/día/rata
3 = Dosis total/rata
4 = Peso corporal medio
5 = Peso uterino medio
6 = PU/PC.

Los úteros de todos los animales tratados con extractos de alfalfa y trébol aparecen repletos de exudados, que en el caso de la alfalfa es de 2,128 grs. de cantidad media y en el del trébol de 1,917 grs. En los animales tratados con dienestrol la cantidad de exudado comprobado se halla en dependencia de la dosis usada, variando de 0,858 grs. para la dosis de 3 μ g. a 3,830 grs. para la dosis de 18 μ g.

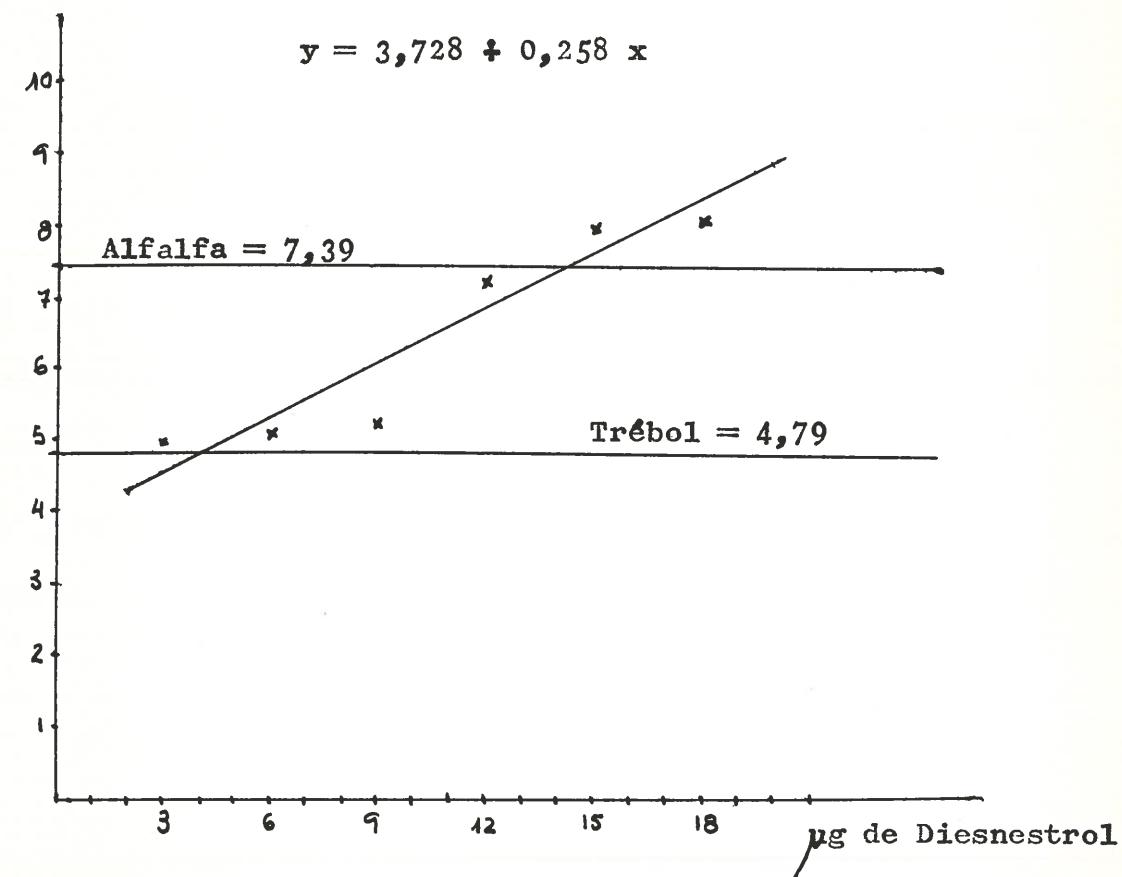
CUADRO N.º II

Relación PU/PC de los animales tratados con extractos Alfalfa y Trébol y con Dienestrol, en relación al PU/PC de los animales controles.

Alfalfa	7,39
Trébol	4,79
Dienestrol	
1. ^o	4,95
2. ^o	5,14
3. ^o	5,26
4. ^o	7,97
6. ^o	8,04

CUADRO N.º III

Curva patrón de dosis de Dienestrol, con expresión de los incrementos ponderales por los extractos de alfalfa y trébol.



En ninguno de los animales tratados se observaron efectos colaterales imputables a la inyección subcutánea de los productos utilizados.

CONSLUSIONES:

En el presente estudio se comprueba que muestras de alfalfa y trébol de pastos de la provincia de León, contienen cantidades de fitoestrógenos suficientes para producir interferencias en la función reproductora de las hembras domésticas que se alimentan con dichos pastos.

En consecuencia se llega a la conclusión de la necesidad de un estudio más amplio acerca del contenido estrogénico de los pastos de esta región, en apoyo de una posible mejora ganadera, mediante la lucha contra la hipofecundidad de las hembras domésticas subsidiarias de los mismos.

RESUMEN:

Como preludio a un estudio posterior más amplio, se estudia el contenido estrogénico de la Alfalfa y Trébol, cultivados en la provincia de León, encontrando que su actividad estrogénica, medida sobre útero de rata castrada, es equiparable a la producida por 12 y 3 ug. de Dienestrol respectivamente.

RESUME:

On donne, comme prélude à un étude postérieur plus ample, le contenu estrogénique de la lucerne et le tréfle, de la province de León, trouvant que leur activité estrogénique, chez la rat ovariectomisé, c'est de la teneur de 12 et 3 ug de dienestrol, respectivement.

SUMMARY:

The oestrogenic activity of the lucerne and clover, obtained in the province of León, is given, estimating that their oestrogenic power is comparable, in the ovariectomized rat, to 12 and 3 ug of Dienestrol, respectively.

BIBLIOGRAFIA

1. BENNET, A. W. (1946): *Aust. Vet. J.*, **22**: 70-78.
2. BICKOFF, E. M., LIVINGSTON, A. C., BOOTH, A. A., THOMPSON, C. R., HOLLOWELL, E. A., BEINHART, E. G. (1960): *J. Anim. Sci.*, **19**: 1143-49.
3. BONADONNA, T., FURNAROLI, D. (1966): «Ormoni e Reproduzioni Animale». Foggia.
3. BONADONNA, T., FURNAROLI, D. (1966): «Ormoni e Reproduzioni Animale». Foggia.
4. BRADBURY, R. B., WHITE, D. E. (1951): *J. Chem. Soc.*, 3447.
5. BRADBURY, R. B., WHITE, D. E. (1954): In: «Vitamins Hormones». Academic Press. N. Y. Vol 12.
6. BRANDEN, A. W. H. (1954): *Endocrinology*, **55**: 112.
7. CHENG, E., STORY, C. D., PLAINE, L. C., YODER, L., BURROUGHS, W. (1963): *J. Anim. Sci.*, **12**: 507-514.
8. CURNOW, D. H., ROSSITTER, R. C. (1955): *Aust. J. Esp. Biol and Med. Sci.*, vol **33**.

9. CURNOW, D. H. (1964): *Biochem. J.*, **58**: 283-287.
10. DERIVAUX, J. (1961): «Fisiopatología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los animales domésticos». Ed. Acribia.
11. FERRANDO, R. (1960): *Ann. Nutr. Anim.*, **14** (6): B-52.
12. FINNEMORE, H. (1960): *Pharm. J.*, **31**: 604.
13. FRANCIS, C. M., MILLINGTON, A. J., BAYLEY, E. T. (1967): *Aust. J. Vet. Res.*, **18**(1): 47-65.
14. GUGCOLZ, J., LIVINGSTON, A. L., BICKOFF, A. M. (1961): *J. Agric. Food Chem.*, **9**(4): 330-332.
15. MOULE, G. R. (1954): *Aust. Vet. J. Res.*, **37**(4): 109-114.
16. POPE, G. S. (1959): *Dairy Sci. Abst.*, **16**(5): 334-335.
17. POPE, G. S., MCNAUGHTON, M. J., JONES, E. H. (1959): *J. Dairy Res.* vol **26**.
18. SCHOOP, G. (1959): *Proc. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod.* Cambridge.
19. SHIBATAS, S., MURANAKI, T., NISHIKAWA, Y. (1961): *J. Pharm. Soc. Jap.*, vol **79**.
20. SOUSSA, E. J. (1968): *Reproductae Animal*, vol 4.
21. SPIDICUI, S. (1945): *J. Sci. Indust.*, **3**: 68-70.
22. UNDERWOOD, E. J., SHIER, F. L., PETERSON, S. E. (1953): *Aust. Vet. J. Res.*, **29**: 106.
23. UNDERWOOD, E. J., SHIER, F. L., DAVENPORT, N. E., BENNET, H. W. (1959): *Aust. Vet. J. Res.*, **35**: 84.
24. WONG, E., FLUSH, D. S. (1962): *J. Endocrinollogy*, **24**: 341-348.

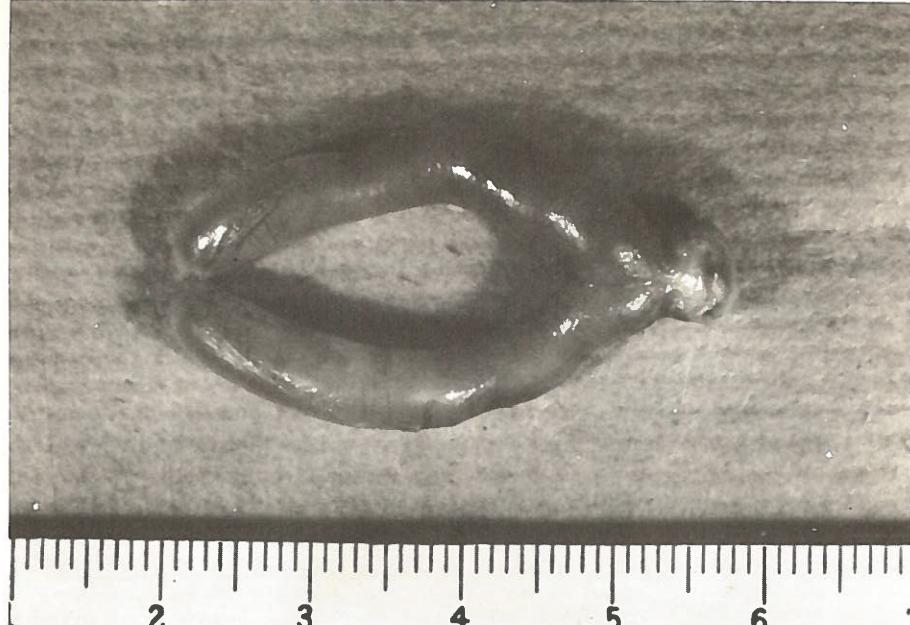


Fotografía n.º 1: Utero de animal control

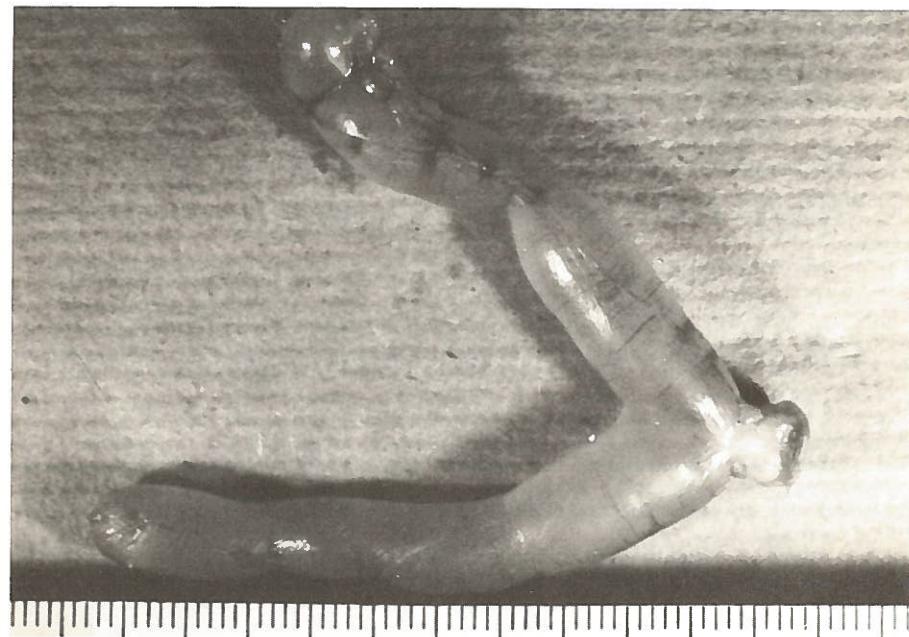


Fotografía N.º 2: Utero de animal tratado con extracto de trébol.

— 610 —



Fotografía n.º 3: Utero de animal tratado con extracto de alfalfa.



Fotografía n.º 4: Utero de animal tratado con 18 g de dienestrol.

— 611 —