

Determinación de las Fluctuaciones de los Niveles de Estrógenos en Tréboles, con Relación a las Condiciones Ecológicas y al Estadio de Desarrollo de la Planta

INTRODUCCION

Se encontró, desde hace algunos años, que plantas de la familia de las leguminosas utilizadas comúnmente como pasto y forraje contienen sustancias nocivas que, al ser ingeridas por los animales, pueden producir desórdenes en su funcionamiento reproductivo. Se ha establecido que los compuestos biológicamente activos son sustancias estrogénicas cuya actividad es semejante a la de los estrógenos animales y que se hallan presentes en elevada concentración en plantas forrajeras, especialmente en algunas especies de tréboles.

El efecto nocivo de los estrógenos vegetales sobre la reproducción animal fue establecido en Australia (Bennets, et al., 1946) donde la fertilidad de ovejas hembras alimentadas a base de trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*, var. Dwalganup) disminuyó progresivamente durante el período comprendido entre 1941-1944 y el número de corderos nacidos descendió aproximadamente al 30%. La esterilidad se producía por disminución de la fecundidad, acompañada de un estado quístico en el tracto reproductor. Este síndrome presentado en ovejas alimentadas con trébol subterráneo, sugería que un estrógeno vegetal interfería en la fertilidad de las ovejas reproductoras y por ello se la denominó "enfermedad del trébol".

En Colombia, el trébol se ha constituido en los últimos años en una planta de importancia debido a que su uso como forraje se ha incrementado, al igual que por su alta capacidad adaptativa, presenta un fuerte dominio sobre otras plantas en las praderas naturales. Por otra parte, la reproducción bovina en nuestro medio es muy baja solamente el 70%), fenómeno atribuido, generalmente, a deficiencias nutricionales y errores en el manejo reproductivo. Teniendo en cuenta que en otros países se ha demostrado claramente una relación entre la baja fertilidad y la alimentación con trébol, se ha creído necesario establecer si existe una actividad estrogénica en los tréboles locales que pueda relacionarse con la disminución de la fertilidad en nuestro ganado.

En la Sabana de Bogotá, región central de Colom-

Este trabajo forma parte del programa de investigación sobre subfertilidad de vacas lecheras en la Sabana de Bogotá. El objetivo del presente trabajo fue establecer la presencia de fitoestrógenos en pastos utilizados como alimento de las vacas de la región, así como su variación en concentración bajo diferentes condiciones. El programa de investigación mencionada está pronosticado por la Agencia Internacionada de Energía Atómica (AIEA) y el Instituto de Asuntos Nucleares (IAN).

LUIS ARTURO GIL P.
Químico Farmacéutico, M. Sc., Ph.D.
Profesor de Cátedra, Un. Nacional
MARIA CONSUELO DIAZ B.
Bióloga, M. Sc.
Profesora Asistente
JAIME RAMIREZ P.
Biólogo, M. Sc.
Profesor Asistente, U. Nacional

bia, existen praderas utilizadas en su gran mayoría en el desarrollo de la industria lechera. Ellas se caracterizan por presentar en gran cantidad pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y tréboles (*Trifolium repens*, var. ladino), los cuales en los últimos años parecen haberse incrementado espontáneamente llegando a constituir hasta el 50% de algunas praderas. En los estudios realizados en otros países se ha establecido que el *Trifolium subterraneum* L (Bennetts, 1946; Moule, et al., 1963; Shutt, 1976), y el *Trifolium pratense* (Cheng, et al., 1953; Bickoff, et al., 1957; Kitts, et al., 1959; Wong, 1962), contienen fitoestrógenos en suficiente cantidad para afectar negativamente la reproducción del ganado, mientras el trébol blanco (*Trifolium repens*, var. ladino) presenta bajas concentraciones (Sanger, et al., 1958; Bickoff, et al., 1960b; Guggolz, et al., 1961).

Con base en estos hechos y debido a que en el país se carece de estudios sobre la actividad estrogénica de nuestros tréboles, se decidió realizar el presente trabajo cuyo objetivo fue medir la actividad estrogénica del *Trifolium repens*, var. ladino que crecía en dos praderas de la Sabana de Bogotá, localizadas en la Granja Experimental de Tibaitatá (ICA), una de las cuales estuvo pastoreada durante el año que duró el estudio.

MATERIALES Y METODOS

1. Material vegetal

Se seleccionaron dos praderas donde crecían los tréboles en asociación con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). Una fue pastoreada rotativamente, permitiéndole períodos de recuperación. La otra se mantuvo sin ganado durante todo el período de muestreo. La población de tréboles en la pradera pastoreada estaba distribuida en zonas discretas donde alcanzaba alturas superiores a las del kikuyo hacia el final de los períodos de recuperación. En la pradera no pastoreada, el porte de los tréboles fue siempre inferior al del kikuyo, lo cual impidió una adecuada iluminación para éstos.

Las muestras de tréboles fueron colectadas semanalmente, tomando plantas representativas de toda el área en cada pradera. Este material se secó en estufa a 100°C por 48 horas. Las muestras secas se molieron con un molino Willey hasta pulverizarlas y se conservaron en recipientes herméticos hasta el momento de ser extraídas o fermentadas.

2. Extracción y fermentación

Se extrajeron 0.5 g. de muestra seca con 5 ml. de agua, mediante agitación ocasional y remojo durante 48 h. a 39°C

La fermentación consistió en incubar anaeróbicamente 0.5 g. de muestra seca con 40 ml. de solución de McDugall y 10 ml. de fluido ruminal filtrado (inóculo) a 39°C por 48 horas (Tilly & Terry, 1963). El inóculo fue obtenido de una vaca, con

fístula en el rumen, que se encontraba pastando tréboles y kikuyo. Por esta razón se prepararon blancos en los cuales, en lugar del trébol se colocó papel de filtro molido. Los valores de los blancos se sustrajeron de los de las muestras respectivas.

Terminado el tiempo de extracción o fermentación, las muestras fueron centrifugadas a 3.500 rpm, separando los sobrenadantes a los cuales se les determinó la actividad estrogénica.

3. Cuantificación de la actividad estrogénica

Los anteriores extractos fueron incubados "in vitro" a 4°C por 18 h. en presencia de una cantidad constante de 17-β-Estradiol-³ H radiactivo y una cantidad constante de citosol que contenía receptores específicos para estrógenos. La curva de calibración se elaboró incubando concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 y 1.280 pg. de 17-β-Estradiol frío.

La valoración de cada muestra, se realizó extrapolando sobre la curva de calibración el porcentaje de radiactividad ligada al citosol después de sedimentar la fracción de hormona no ligada adsorbida a gránulos de carbono recubiertos con dextrano (Korenman, et al., 1969).

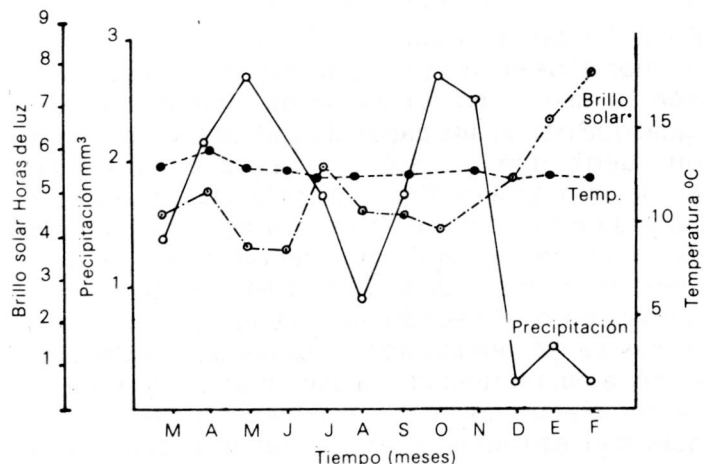
El citosol se obtuvo por ultracentrifugación a 105.000 g. durante 90 min. a 4°C de un homogeneizado celular de úteros de conejas adultas (Corker, et al., 1970).

4. Parámetros meteorológicos

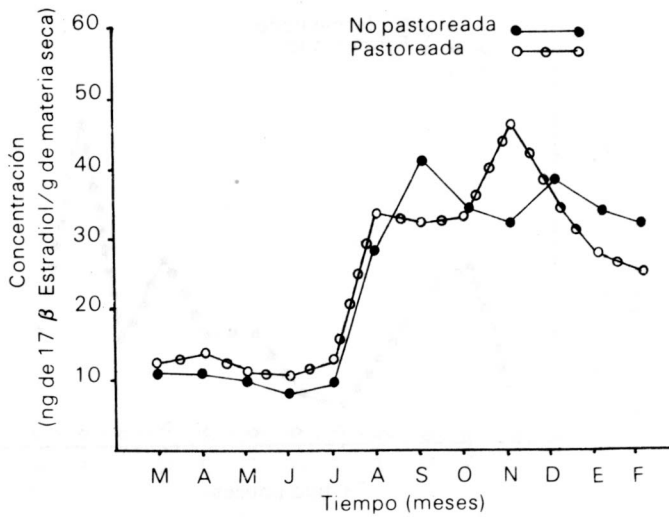
Se tomaron datos diarios de precipitación pluvial, temperatura ambiental y brillo solar, los cuales fueron correlacionados con los valores de actividad estrogénica encontrados.

5. Análisis estadísticos

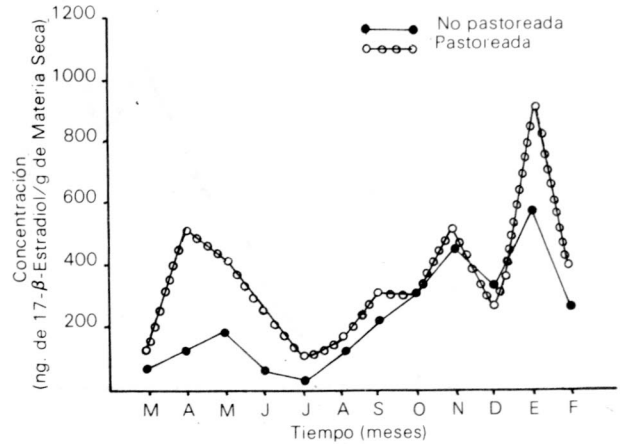
Los valores de actividad estrogénica en las praderas, pastoreada y no pastoreada, fueron comparados mediante un análisis de varianza, al igual que los valores de los tréboles fermentados con los no fermentados (Crow, et al., 1960).



GRAFICA 1. Promedios mensuales de precipitación pluvial, temperatura y brillo solar 1979-1980.



GRAFICA 2. Promedios mensuales de actividad estrogénica en las praderas pastoreada y no pastoreada 1979-1980.



GRAFICA 3. Promedios mensuales de actividad estrogénica en tréboles fermentados de las praderas pastoreada y no pastoreada 1979-1980.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Fluctuación anual

Los promedios mensuales de las tres variables meteorológicas medidas, se representan en la Gráfica 1. Solamente la precipitación pluvial mostró una marcada fluctuación durante el año, presentándose dos períodos lluviosos; el primero alcanzó su máximo valor en el mes de mayo y el segundo entre los meses de octubre y noviembre.

Similarmente la Gráfica 2, indica los niveles de actividad estrogénica de la pradera pastoreada y de la no pastoreada. Se observa un incremento a partir del mes de agosto en ambas praderas, lo cual coincide con el segundo período de lluvias.

Esta relación se observa en forma más clara para las actividades estrogénicas de los tréboles fermentados como se puede ver en la Gráfica 3, donde los niveles de ambas praderas fluctúan en forma similar a las variaciones de precipitación pluvial.

El análisis de los resultados obtenidos permite establecer que existe una fluctuación estacional en la actividad estrogénica de los tréboles, lo cual coincide con lo detectado en los bioensayos realizados en Australia (Alexander & Watson, 1951), Inglaterra (Pieterse & Andrews, 1956), Canadá (Kitts et al., 1959), y Estados Unidos (Bickoff, et al., 1960a, 1960b).

También se observa que la variación estacional puede relacionarse con la precipitación pluvial (Gráficas 1, 2, 3). Por tanto, esto indicaría que este factor incidiría sobre la síntesis de isoflavonas. Pero al estudiar la relación de la temperatura y el brillo solar con la actividad estrogénica se puede deducir, como lo había establecido Rossiter (1966, 1967a, y 1970), que estos factores no tienen efecto sobre la estrogénicidad del trébol.

2. Efecto del pastoreo

Al comparar estadísticamente los datos representados en la Gráfica 2, se encontró que no existen diferencias significativas ($P > 0.01$) entre los valores de actividad estrogénica en tréboles sin fermentar de las praderas pastoreada y no pastoreada.

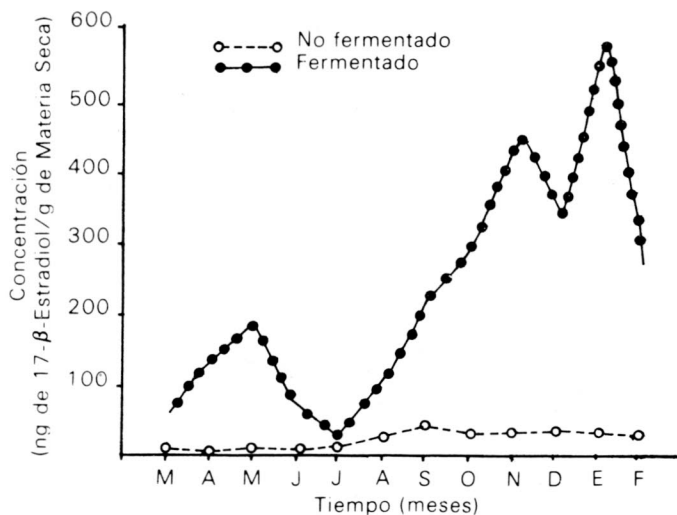
Sin embargo, al comparar los niveles de estrógenos de las dos praderas después de un proceso de fermentación ruminal, éstos difieren significativamente ($P < 0.01$).

Los valores de actividad estrogénica de los tréboles no sometidos a fermentación tanto de la pradera pastoreada como de la no pastoreada, no difieren significativamente. Sin embargo, al ser sometidos a fermentación se presentan diferencias significativas. Podrían interpretarse estos resultados, considerando que bajo circunstancias de no pastoreo las plantas están en un estado de senescencia avanzada, caracterizado por una disminución de fitoestrógenos metilados (formononetina y biochanina A) y la aparición de daidzeína (Rossiter & Beck, 1967b). Mientras que los tréboles sometidos a pastoreo mantienen niveles constantes de fitoestrógenos, mayores en cantidad comparados con los no pastoreados, pero iguales en actividad por el efecto compensatorio de la daidzeína cuya afinidad es mayor por los receptores uterinos (Shutt, 1972).

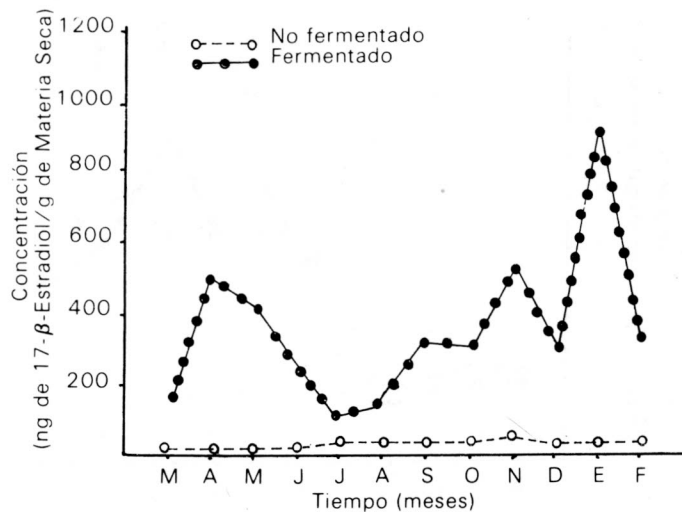
Era de esperarse que el crecimiento y la renovación de los tréboles pastoreados presentaran valores superiores, debido a que las hojas en crecimiento mantienen una síntesis continua de isoflavonas, alcanzando su máxima actividad al lograr una completa expansión foliar (Beck, 1964; Francis & Millington, 1965; Rossiter & Beck, 1967b).

3. Efecto de la fermentación ruminal

Las Gráficas 4 y 5 ilustran las variaciones en actividad estrogénica de las praderas, pastoreada y



GRAFICA 4. Promedios mensuales de actividad estrogénica. Tréboles fermentados y no fermentados. Pradera no pastoreada 1979-1980



GRAFICA 5. Promedios mensuales de actividad estrogénica. Tréboles fermentados y no fermentados. Pradera Pastoreada 1979-1980.

no pastoreada, y la forma como se incrementa esta actividad por acción microbiana. En promedio el incremento fue hasta de 15 veces para la pradera pastoreada y de 8.7 para la no pastoreada.

Los valores de actividad estrogénica, para la pradera no pastoreada sin fermentar, oscilaron entre 4.2 y 40.7 con un promedio de 22.5 ng de 17-β-E/g de materia seca, mientras que las muestras fermentadas variaron entre 17.8 y 373.4 con un promedio de 195.6 ng de 17-β-E/g de materia seca.

La fermentación "in vitro" de los tréboles presenta una actividad estrogénica mayor comparada con los extractos no fermentados (Gráficas 4 y 5), lo cual corrobora los resultados obtenidos por Nilsson (1961, 1962). Podría pensarse que los extractos acuosos de los tréboles sin fermentar contienen glucósidos sin afinidad por los receptores estrogénicos. Pero es más probable que el aumento en

estrogenicidad efectuado por la fermentación, se deba a desmetilación microbiana de la formononetina y la biochanina A, para generar daidzeína y genisteína con hidróxilos libres que les confieren mayor actividad estrogénica como ha sido demostrado por Shutt (1972).

5. CONCLUSIONES

Con el trabajo se pudo concluir que:

- El trébol blanco (*Trifolium repens* var ladino) presenta actividad estrogénica "in vitro".
- El pastoreo induce un aumento en el metabolismo y crecimiento del trébol, lo cual conduce a una mayor síntesis de isoflavonas.
- Bajo condiciones de humedad ambiental alta el contenido de fitoestrógenos aumenta en el trébol.
- Bajo condiciones de fermentación "in vitro" se aumenta la actividad estrogénica.

BIBLIOGRAFIA

1. Alexander, G., and Watson, R. H. 1951. The assay of oestrogenic activity of *Trifolium subterraneum* L. by increase in uterine weight in spayed guinea pig. II. Assay. Aust. J. Agric. Res. 2. 480-493.
2. Beck, A. B. 1964. The oestrogenic isoflavones of subterranean clover. Aust. J. Agric. Res. 15. 223.
3. Bennetts, H. W. 1946. Metaplasia in the sex organs of castrated male sheep maintained on early subterranean clover pastures. Aust. Vet. J. 22. 70-78.
4. Bennetts, H. W., Underwood, E. J., and Shier, F. L. 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. Aust. J. Vet. 22. 2-12.
5. Bickoff, E. M., Booth, A. N., Livingston, A. L., and Hendrickson, A. P. 1960a. Observations on the effect of drying on oestrogenic activity of alfalfa samples of varying maturity. J. Anim. Sci. 19. 189-197.
6. Bickoff, E. M., Livingston, A. L., Booth, A. N., Thomson, C. R., Hollowell, E. A., and Beinhart, E. G. 1960b. Some variation in oestrogenic activity in fresh and dried white clover and the ladino variety. L. Anim. Sci. 19. 1143-1149.
7. Bickoff, E. M., Booth, A. N., Lyman, R. L., Livingston, A. L., Thomson, C. R., and DeEds, F. 1957. Coumestrol a new oestrogen isolated from forage crops. Science. 126. 969-970.
8. Corker, C. S., Exley, D., and Naftolin, F. 1970. Assay of 17-oestradiol by competitive protein binding methods. Acta Endoc. Suppl. 147. 305.
9. Crow, E. L., Davies, F. A., and Maxfield, M. W. 1960. Statistics Manual. Dover Publications, Inc. New York.
10. Cheng, E., Story, C. D., Payne, L. C., Yoder, L., and Burroughs, W. 1953. Detection of oestrogenic substances in alfalfa and clover hays fed to fattenign lambs. J. Anim. Sci. 12. 507-514.
11. Francis, C. H., and Millington, A. I. 1965. Varietal variation in the isoflavone content of subterranean clover: Its estimation by a microtechnique. Aust. J. Agric. Res. 16. 557.
12. Guggolz, J., Livingston, A. L., and Bickoff, E. M. 1961. Detection of daidzein, formononetin, genistein and biochanin A in forages. J. Agric. Food. Chem. 9. 330-332.
13. Kitts, W. D., Swierstra, E., Brink, V. C., and Wood, A. I. 1959. The oestrogen-like substances in certain legumes and grasses. I the quantitative determination of such substances in red clover and oats. J. Anim. Sci. 39. 396-413.

14. Korenman, S. G., Perrin, L., and McCallum, T. P. 1969. A radioligand binding assay system for oestradiol measurement in human plasma. *J. Clin. Endoc.* 29, 879.
15. Moule, G. R., Braden, A. W. H., and Lamond, D. R. 1963. The significance of oestrogens in pasture plants in relation to animal production. *Anim. Breeding Abs.* 31 (2), 139-157.
16. Nilsson, A. 1962. Demethylation of the plant oestrogen formonetin to daidzain in rumen fluid, *Arkiv. Kemi* 19, 549.
17. Nilsson, A. 1961. Demethylation of the plant oestrogen biochanin A in the rat. *Nature. Lond.* 192, 358.
18. Pieterse, P. J. S., and Andrews, F. N. 1956. The oestrogenic activity of alfalfa and other feedstuffs. *J. Anim. Sci.* 15, 25-36.
19. Rossiter, R. C. 1970. Factors affecting the oestrogenic content of subterranean clover pastures. *Aust. Vet. J.* 46, 141-144.
20. Rossiter, R. C., and Beck, A. B. 1967a. Physiological and Ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) III. Effects of light. *Aust. J. Agric. Res.* 18, 23.
21. Rossiter, R. C., and Beck, A. B. 1967b. Physiological and Ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover. (*Trifolium subterraneum* L.) V. Ontogenetic Changes. *Aust. J. Agric. Res.* 18, 561-573.
22. Rossiter, R. C., and Beck, A. B. 1966. Physiological and Ecological Studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) I. Effects of temperature. *Aust. J. Agric. Res.* 17, 29.
23. Sanger, V. L., Engle, P. H., and Bell, O. S. 1958. Evidence of oestrogenic stimulation in anestrus ewes pastured on ladino clover and birdsfoot trefoil, as revealed by vaginal smear. *Amer. J. Vet. Res.* 19, 288-294.
24. Shutt, D. A. 1976. Los efectos de los estrógenos vegetales sobre la reproducción animal. *Endeavour* 35, 126.
25. Shutt, A. R., and Cox, R. I. 1972. Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors "in vitro". *J. Endoc.* 52 290-310.
26. Tilly, J. H., and Terry, R. A. 1963. A two stage technique for the "in vitro" digestion of forage crops. *J. Brit. Grassland Soc.* 18, 104-111.
27. Wong, E. 1962. Detection and estimation of oestrogenic constituents in red clover. *J. Sci. Fd. Agric.* 13, 304-308.