

DETERMINACION DE ACTIVIDAD ESTROGENICA EN TREBOL SUBTERRANEO (*Trifolium subterraneum*)¹

por

SAMUEL GOLDZVEIG M.², CARMEN VISCONTI P.²

y

ROSARIO SERRANO Z.²

GENERALIDADES

El trébol subterráneo está alcanzando en Chile amplia aceptación como forraje. Es un pasto anual y tiene la propiedad de proveer su auto-siembra, enterrando sus semillas en el período de crecimiento. En Australia y otros países fué introducido hace mucho tiempo como forraje de elección para el ganado lanar, obteniéndose con ello grandes éxitos debido a que es apetecido por los animales y crece exuberantemente, necesitando nada más que un abono regular con fosfatos y a veces, zinc.

En Australia y Nueva Zelandia se observaron trastornos en la reproducción de las ovejas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12 y 13). Al hacer estudios sobre la sintomatología clínica, Bennetts y colaboradores llegaron a la conclusión de que los desórdenes se debían a la acción de los estrógenos contenidos en el pasto (1, 2 y 3).

Actualmente se conocen 200 a 300 sustancias con acción estrogénica (para definición ver Allen y Doisy (8)).

Química del compuesto de actividad estrogénica del trébol subterráneo. Bradhery y White (6) aislaron dos sustancias cristalinas a partir del floculado de extractos de trébol subterráneo sin saponificar. Estas sustancias eran: 7-hidroxi-4'-metoxi-isoflavona (formonetin) y la 5-7-4'-trihidroxi-isoflavona (genisteína). El ensayo biológico de ambas sustancias demostró que el formonetin no era estrogénico, pero sí la genisteína aunque débilmente (más o menos 10^{-5} de la estrona). Años más tarde Biggers y Curnow (5) estudiaron en detalle la actividad estrogénica de la genisteína sintética y también de la natural, encontrando que la actividad determinada en dos laboratorios diferentes era de $1,25 \times 10^{-5}$ y $4,53 \times 10^{-5}$ veces que la del estradiol, usando el test de co-

¹ Recibido para su publicación el 30 de Abril de 1958.

² Médicos Veterinarios de la Sección Experimentación. Instituto de Investigaciones Veterinarias.

locación en la vagina de la laucha. El primer resultado se obtuvo usando como vehículo propilenglicol por vía subcutánea y el último empleando aceite de arachis. Es probable que la desigualdad de los resultados se deban a las diferentes técnicas. Estos autores demostraron que la genisteína era un pro-estrógeno, el que se convierte en estrógeno verdadero dentro del organismo.

MATERIALES Y METODOS

Se determinó la actividad estrogénica en 25 muestras de trébol subterráneo, variedades Mount Barker y Dwalganup, traídas de la zona de Cauquenes y Chillán. En 14 muestras se hicieron determinaciones cuantitativas.

Las muestras fueron deshidratadas a 80°C durante 24 horas, quedando con una humedad entre 7 a 9% (9). Dicha humedad fué determinada en el momento de preparar el extracto. Luego fueron molidas finamente y guardadas en frascos herméticamente cerrados, hasta el momento de iniciar el ensayo.

a) *Preparación del extracto de trébol subterráneo.* Se usó el método indicado por A. B. Beck y A. W. Braden (4).

b) *Preparación del material biológico.* Se usaron lauchas hembras inmaduras entre 7,5 y 12 g. de peso y ratas vírgenes de la variedad Rockefeller entre 30 y 53 g. con alimentación de pellets (Vita-Ovo) y agua ad-libitum. Las ratas fueron ovariectomizadas según las indicaciones de Bülbring y Burn (7).

Las lauchas no tuvieron ningún tratamiento previo.

c) *Preparación de la curva de calibración.* La actividad estrogénica del trébol subterráneo se calculó por referencia a una curva obtenida inyectando subcutáneamente dietilestilbestrol a las ratas ovariectomizadas y randomizadas. El peso uterino fué expresado en mg. por 100 g. de peso corporal (7).

1) *Solución stock de dietilestilbestrol.* 50 mg. en 100 cc. de alcohol absoluto.

2) *Solución standard.* 1 cc. de la solución stock en 100 cc. de alcohol absoluto.

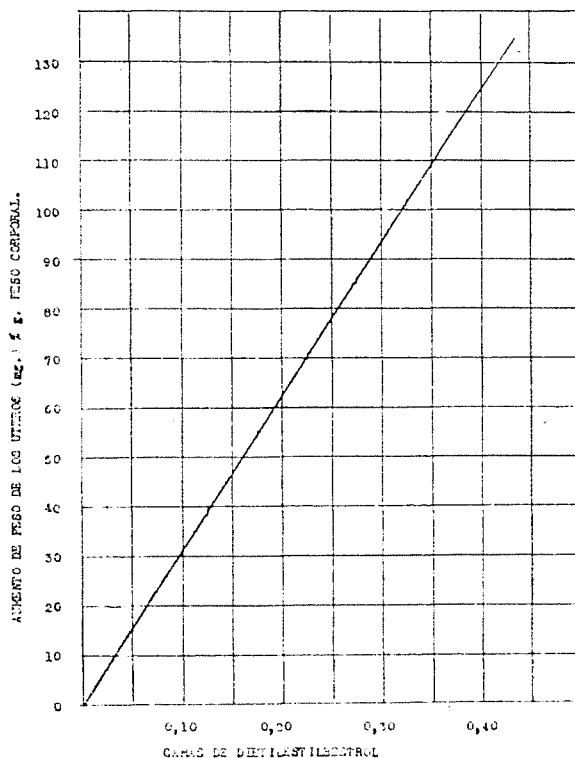
3) *Soluciones oleosas de dietilestilbestrol.* La preparación de estas soluciones se hizo en la siguiente forma, señalando en la última columna la cantidad de gamas de dietilestilbestrol por cc.:

	cc. sol. standard	cc. aceite oliva	Gamas de dietilestilbestrol expres. por cc.
SOLUCION 1:	0.10	9.90	0.05
SOLUCION 2:	0.30	9.70	0.15
SOLUCION 3:	0.50	9.50	0.25
SOLUCION 4:	1.00	9.00	0.50

4) *Preparación de la curva Standard.* Las ratas fueron distribuídas en 5 grupos de 15 cada uno y se inyectaron subcutáneamente 24 horas después de la ovariectomía, en dosis de 0,20 cc. de aceite de oliva, diariamente, durante cuatro días. 24 horas después de la última inyección las ratas fueron sacrificadas, pesadas y los úteros disecados y colocados por 24 horas en Solución Bouin, luego secados entre papel filtro y pesados en una balanza de torsión (7).

Gamas de dietilestilbestrol inyectadas a cada rata durante 4 días.			
GRUPO 0:	0.00	GRUPO 3:	0.20
GRUPO 1:	0.04	GRUPO 4:	0.40
GRUPO 2:	0.12		

Con los datos obtenidos se dibujó la curva (Fig. N° 1); en función de la cual se calcularon los problemas.



RESULTADOS

TABLA N° 1

ENSAYO BIOLOGICO CUALITATIVO DE ACTIVIDAD ESTROGENICA
EN RATAS OVARECTOMIZADAS

Dosis total inyectada: 0,6 cc. = 6 g. de sust. fresca

N° de la muestra	T. m. peso corporal antes de inyectar g.	T. m. peso corporal después de inyectar g.	T. m. dif. aumento g.	T. m. peso útero mg.	T. m. dif. entre control y testigo mg.	Aumento en %
1 Control	49,06	61,30	12,24	13,00	3,60	27,69
1 Test	48,12	58,20	9,08	16,60		
2 Control	31,50	34,97	3,47	13,25	2,75	20,70
2 Test	31,75	38,82	7,07	16,00		
3 Control	43,37	66,40	23,03	14,50	1,75	12,06
3 Test	44,45	53,75	9,30	16,25		
4 Control	53,00	64,23	11,23	18,33	3,00	16,30
4 Test	53,30	66,80	13,50	21,33		
5 Control	48,73	61,94	13,21	13,60	3,20	23,53
5 Test	48,82	65,12	16,30	16,80		
6 Control	29,00	46,70	17,70	13,33	2,67	20,03
6 Test	29,00	40,80	11,80	16,00		
7 Control	31,30	42,17	10,87	12,50	6,00	48,00
7 Test	31,50	42,00	10,50	18,50		
8 Control	39,52	57,40	17,88	24,75	1,50	6,05
8 Test	42,20	60,42	18,22	26,25		
9 Control	32,36	59,44	27,08	13,20	15,40	84,61
9 Test	32,52	53,82	21,30	33,60		
10 Control	53,30	64,43	11,13	23,00	4,66	20,26
10 Test	53,03	69,00	15,97	27,66		
11 Control	39,20	49,07	9,87	24,50	1,25	5,10
11 Test	39,20	49,27	10,07	25,75		

OBSERVACIONES: Todas las muestras estaban formadas por el tallo, peciolo y hojas, con excepción de la Muestra N° 9 (solamente hojas).

(Continuación Tabla Nº 1)

ENSAYO BIOLÓGICO CUALITATIVO DE ACTIVIDAD ESTROGENICA
EN LAUCHAS INMADURAS

Dosis total inyectada: 0,3 cc. = 3 g. sust. fresca

Nº de la muestra	T. m. peso corporal antes de inyectar g.	T. m. peso corporal después de inyectar g.	T. m. dif. aumento g.	T. m. peso útero mg.	T. m. dif. entre control y testigo mg.	Aumento en %
1 Control	8,00	8,55	0,55	7,25	1,5	20,60
1 Test	8,50	9,37	0,87	8,75		
2 Control	8,15	9,67	1,52	3,25	1	30,77
2 Test	8,15	8,87	0,72	4,25		
3 Control	8,46	8,10	0,36	3,00	2,66	88,60
3 Test	8,43	8,66	0,23	5,66		
4 Control	7,52	7,75	0,23	4,25	1	23,50
4 Test	7,47	8,07	0,60	5,25		
5 Control	10,02	11,22	1,20	5,50	2,50	45,45
5 Test	10,27	11,87	1,60	8,00		
6 Control	8,04	8,02	0,02	7,00	4,00	57,14
6 Test	8,04	11,04	3,00	11,00		
7 Control	10,62	12,07	1,45	6,00	4,00	37,20
7 Test	10,27	11,82	1,55	7,50		
8 Control	11,57	12,75	1,18	10,75	4,00	37,20
8 Test	11,90	13,12	1,22	15,75		

TABLA N° 2

RESULTADOS DE LAS 14 MUESTRAS.

METODO BIOLOGICO CUANTITATIVO EN RATAS OVARIECTOMIZADAS

N° de la muestra	N° de ratas	Peso corporal antes g.	Peso corporal después g.	Aumento peso g. %	Peso uterino mg. % Peso corporal antes	Diferencia con control mg. %	Cantidad inyectada trébol g.	Potencia medida en gamas stilbestrol % trébol seco
1 Control	8	43,10 ± 3,37	74,52 ± 4,46	72,91	54,44 ± 4,30	23,73	3,64	2,98
1 Test	10	42,67 ± 3,13	69,93 ± 3,29	43,03	78,17 ± 2,06			
2 Control	8	43,10 ± 3,37	74,52 ± 4,46	72,91	54,44 ± 4,30	15,66	3,62	1,38
2 Test	10	42,72 ± 3,11	63,39 ± 2,53	50,63	70,10 ± 7,35			
3 Control	8	43,10 ± 3,37	74,52 ± 4,46	72,91	54,44 ± 4,30	20,31	3,67	1,77
3 Test	10	43,21 ± 2,34	67,15 ± 4,51	55,40	74,75 ± 4,90			
4 Control	8	43,10 ± 3,37	74,52 ± 4,46	72,91	54,44 ± 4,30	16,31	3,67	1,46
4 Test	9	42,37 ± 3,47	62,96 ± 3,26	48,60	71,25 ± 7,74			
5 Control	10	41,22 ± 3,31	47,61 ± 1,54	15,50	40,22 ± 1,91	10,37	3,72	0,51
5 Test	10	40,36 ± 1,62	49,74 ± 1,76	21,70	50,79 ± 2,37			
6 Control	8	43,10 ± 3,37	74,52 ± 4,46	72,91	54,44 ± 4,30	42,20	3,68	2,66
6 Test	8	41,51 ± 2,64	64,46 ± 3,53	55,28	96,64 ± 5,72			
7 Control	10	32,93 ± 2,52	30,18 ± 1,75	-8,30	58,35 ± 4,54	22,21	2,18	3,21
7 Test	10	30,50 ± 2,39	39,23 ± 2,33	28,78	80,56 ± 5,91			
8 Control	10	44,81 ± 2,89	48,52 ± 2,14	8,28	54,01 ± 2,16	30,29	3,30	2,39
8 Test	8	44,10 ± 4,39	49,69 ± 4,55	12,67	84,30 ± 10,39			
9 Control	10	44,81 ± 2,89	48,52 ± 2,14	8,28	54,01 ± 2,16	21,50	3,67	1,84
9 Test	9	42,52 ± 3,16	46,17 ± 3,13	8,57	75,51 ± 4,37			
10 Control	10	32,93 ± 3,52	30,13 ± 1,75	-8,30	58,35 ± 4,54	29,29	3,63	2,54
10 Test	10	32,62 ± 2,55	41,83 ± 2,31	28,20	87,64 ± 6,82			
11 Control	10	41,22 ± 3,31	47,61 ± 1,64	15,50	40,22 ± 1,91	6,91	3,66	0,60
11 Test	10	41,44 ± 1,56	47,65 ± 1,49	15,00	47,13 ± 2,21			
12 Control	10	32,93 ± 2,52	30,18 ± 1,75	-8,30	58,35 ± 4,54	12,90	3,68	1,12
12 Test	7	34,44 ± 2,39	47,47 ± 4,21	37,83	71,25 ± 5,31			
13 Control	10	44,81 ± 2,89	48,52 ± 2,14	8,28	54,01 ± 2,16	13,86	3,30	1,34
13 Test	7	47,12 ± 2,64	46,94 ± 2,78	-0,36	67,87 ± 3,98			
14 Control	10	44,81 ± 2,89	48,52 ± 2,14	8,28	54,01 ± 2,16	24,83	3,65	2,17
14 Test	8	39,13 ± 2,26	43,56 ± 2,91	11,34	78,84 ± 2,27			

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

SIMBOLOS (7)

b	=	coeficiente de regresión.
c	=	número de dosis.
C	=	total de los animales que reciben la misma dosis — la calculada.
d	=	desviación.
g. l.	=	grado de libertad.
F	=	relación entre los cuadrados de dos promedios.
G	=	total para todos los animales — el calculado.
n	=	número de observaciones.
$n_1 n_2$	=	grados de libertad para dos promedios cuadrados en el análisis de variante, en la prueba de "F".
r	=	número de grupos.
R	=	total para todos los animales menos el calculado.
s	=	desviación standard.
s_x	=	error standard.
S	=	suma.
S_{xx}	=	suma de los cuadrados de las desviaciones de x.
S_{xy}	=	suma de los productos de las desviaciones de x e y.
(S_{y2})	=	ajuste para el promedio.
t	=	número usado en la prueba de "t".
V	=	variante.
x	=	dosis.
$\bar{x}$	=	promedio aritmético de x.
y	=	respuesta a una dosis.
$\bar{y}$	=	promedio de y.
Y	=	valor esperado de y para x en la ecuación de regresión.
μ_y	=	media poblacional.

FORMULAS (7)

$$1) \quad y = \frac{rR + cC - G}{(r-1)(c-1)}$$

$$2) \quad \text{ajuste para el promedio} = \frac{(Sy)^2}{n}$$

$$3) \quad \begin{array}{l} \text{suma de los cuadrados} \\ \text{de las entre dosis.} \end{array} = \frac{(S_1y)^2}{n_1} + \frac{(S_2y)^2}{n_2} + \dots + \frac{(S_xy)^2}{n_x} - \frac{(Sy)^2}{n}$$

$$4) S_{yy} = Sy^2 - \frac{(Sy)^2}{n}$$

$$5) S_{xx} = Sx^2 - \frac{(Sx)^2}{n}$$

$$6) S_{xy} = Sxy - \frac{(Sx)(Sy)}{n}$$

$$7) b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

$$8) x = \frac{n_1 x_1 + n_2 x_2 + \dots + n_x x_x}{n}$$

$$9) y = \frac{y_1 + y_2 + \dots + y_x}{n}$$

$$10) Y = \bar{y} + b(x - \bar{x})$$

$$11) F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

$$12) F(b) = \frac{s^2}{S_{xx}}$$

$$13) \text{ Error suma de los cuadrados} = Sy \bar{y} \quad (\text{S de los cuadrados entre grupos} + \text{S de los cuadrados entre dosis}).$$

$$14) \mu y = y \pm t S\bar{y}$$

TABLA N° 3

PESO DE LOS UTEROS DE RATAS OVARIECTOMIZADAS. EN MG POR 100 G.
DE PESO CORPORAL. DESPUES DE SER INYECTADAS CON
DIETILESTILBESTROL

Grupo N°	Dosis total en 4 días					TOTALES
	Aceite	0.04	0.12	0.20	0.40	
1	49.40	46.80	(71.10)	72.00	126.60	294.80 (365.80)
2	46.00	44.70	77.20	98.60	(165.00)	266.50 (431.50)
3	53.10	57.90	77.50	137.40	(179.60)	325.90 (505.50)
4	52.60	66.70	102.00	101.70	(178.80)	323.00 (501.80)
5	52.60	61.80	105.10	149.10	(190.40)	368.60 (559.00)
6	52.80	60.40	107.60	118.90	142.10	481.80
7	51.40	64.50	122.50	118.40	151.80	508.60
8	54.20	69.40	122.00	136.90	325.50	708.00
9	(44.00)	76.10	83.10	79.70	172.60	411.50 (455.50)
10	83.90	70.70	111.30	131.40	(197.30)	397.30 (594.60)
11	57.80	83.90	(125.0)	126.60	242.00	510.30 (635.30)
12	61.30	58.10	104.30	(117.3)	199.00	422.70 (540.00)
13	42.30	61.80	90.60	88.10	140.20	423.00
14	48.00	50.70	91.40	81.50	104.10	375.70
15	43.40	47.40	77.50	81.80	(160.60)	250.10 (410.70)
	748.80 (792.80)	920.90	1272.10 (1468.1)	1522.10 (1639.4)	1603.90 (2675.6)	6067.80 (7496.80)

Los números entre paréntesis han sido calculados según fórmula 1.

TABLA N° 4

PROMEDIOS Y TOTALES CON DATOS DE LA TABLA N° 3 INCLUYENDO
LOS VALORES CALCULADOS

	Dosis totales en 4 días					TOTALES
	Aceite	0.04	0.12	0.20	0.40	
Totales	792.80	920.90	1468.10	1639.40	2675.60	7496.80
Promedio aritmético	59.90	61.40	97.90	109.30	178.40	100.00

TABLA Nº 5

ANÁLISIS DE VARIANCIA CON LOS DATOS DE LA TABLA Nº 3

Ajuste para el promedio = 749.360			
Clase de variación	g. l.	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio
Regresión	1	147.592	
Desviación de la regresión	2	1.606	803
Entre dosis	4	149.198	
Entre grupos	14	26.015	1.858
Error	46	12.092	263
TOTAL	64	187.305	

Distribución de "F".

$$F = \frac{803}{263} = 3,054$$

En la tabla de Fisher para $n_1 = 2$ y $n_2 = 46$ aparece un nivel de significación de 3,25 por lo tanto la evidencia de no relación lineal no es significativa.

Ecuación de regresión.

$$b = 313$$

$$Y = 52,42 + 313 x.$$

TABLA Nº 6

VALORES DE "Y" EN FUNCION DE "x". (POR LA ECUACION DE REGRESION)

Valor de "x"	Valor de "Y"	Aumento del peso uterino en mg. por 100 g. de peso corporal
0.00	52.42	0.00
0.04	64.94	12.52
0.12	89.98	37.56
0.20	115.02	62.60
0.40	177.62	125.20

Con estos valores se traza la recta ideal, colocando en el papel milimetrado; en el eje de las abscisas las concentraciones en gamas inyectadas en los cuatro días, y en el eje de las ordenadas los aumentos del peso uterino expresados en mg. por 100 g. de peso corporal (Fig. N° 1).

TABLA N° 7

DETERMINACION DE ESTADIGRAFOS Y PARAMETROS DE LA POBLACION CORRESPONDIENTE A LA ACTIVIDAD ESTROGENICA DEL TREBOL SUBTERRANEO. EXPRESADA EN GAMAS DE DIETILESTILBESTROL POR 100 G. DE SUBSTANCIA SECA

N°	y	d	d2
1	2.08	0.15	0.0225
2	1.38	—0.55	0.3025
3	1.77	—0.16	0.0256
4	1.46	—0.47	0.2209
5	0.91	—1.02	1.0404
6	3.66	1.73	2.9929
7	3.21	1.28	1.6384
8	2.89	0.96	0.9216
9	1.84	—0.09	0.0081
10	2.54	0.61	0.3721
11	0.60	—1.33	1.7689
12	1.12	—0.81	0.6561
13	1.34	—0.59	0.3481
14	2.17	0.24	0.0576
S	26.97		10.3753

$$\bar{y} = 1.93$$

$$s^2 = 0.80$$

$$s = 0.89$$

$$sy = 0.24$$

$$\mu y = 1.93 \pm 0.5184$$

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Del análisis estadístico de los resultados se concluye que las muestras de trébol subterráneo B. Barker y Dwalganup poseen una actividad estrogénica igual a 1.93 ± 0.84 gamas de dietilestilbestrol por 100 g. de substancia seca. Esta actividad es inferior a la descrita por autores extranjeros (5, 6, 11).

Todas las muestras estuvieron formadas por hojas, tallos y pecíolos, con excepción de una (muestra N° 9) que lo fué solamente de hojas. Las futuras determinaciones deberán tomar en cuenta este factor, ya que recientes publicaciones señalan a las hojas como las de más alto contenido estrogénico (3).

Nuestras curvas standards fueron hechas sobre la base de dietilestilbestrol, mientras que autores extranjeros utilizan el estradiol.

La comparación estadística de los resultados debe ser hecha con este antecedente en vista.

Sin embargo, se debe dejar constancia que el trébol subterráneo ensayado, es de reciente adaptación en nuestro país y que será necesario, entonces, realizar permanentes determinaciones de su contenido estrogénico. Al mismo tiempo se deberá observar los índices de reproducción en los animales sometidos a una alimentación con ese trébol. Una experiencia con carneros y ovejas se ha iniciado ya en el Fundo Porvenir de Cauquenes.

SUMMARY

1. Subterranean clover (var. Dwalganup and M. Barker) from Chillán and Cauquenes, Chile, has an estrogenic activity of $1,93 \pm 0,84$ of diethylstilbestrol per 100 g. of dry matter.

2. Comparing with the accepted scale of activity between oestradiol, the activity determined in our Subterranean clover is smaller than the foreign values (5, 6, 11).

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BENNETTS, H. W. — "Metaplasia in the Sex Organs of Castrated Male Sheep Maintained on Early Subterranean Clover Pastures". (Dept. Agric. W. Austral).
- 2.—BENNETTS, H. W. — "A Further Note on Metaplasia in the Organs of Castrated Male Sheep on Subterranean Clover Pastures". (Dept. Agric. Perth Australia). Austral. Vet. J. 23, 10-15, 1947.
- 3.—BENNETTS, H. W.; UNDERWOOD, E. J. and SHIER, F. L. — "A Specific Problem of Sheep on Subterranean Clover Pastures in Western Australia". Austral. Vet. J. 22, 2-12, 1946.
- 4.—BECK, A. B. and BRADEN, A. W. — "Studies on the Oestrogenic Substance in Subterranean Clover". (Trifolium L. Var. Dwalganup). Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 29.
- 5.—BIGGERS, J. D. and CURNOW, — "Oestrogenic Activity of Subterranean Clover. The Oestrogenic Activity of Genistein". Biochem. J. 58:278, 1954.
- 6.—BRADBURY, R. B. and WHITE, D. E. — "Oestrogenic Activity of Subterranean Clover". J. Chem. Soc. 3447, 1951.
- 7.—BURN, J. H.; FINNEY, D. J. and GOODWIN, L. G. — "Biological Standardization". Oxford University. Amen. House, London, E. C. 4 Great Britain, 1950.
- 8.—EMMENS, C. W. — "Estrogens" 391 Hormone Assay. Edit. Emmens. Academic Press. Inc. N. Y. U.S.A., 1950.
- 9.—PIETERSE, P. S. and ANDREW, F. N. — "The Estrogenic Activity of Legume, Grass and Corn Silage". Journal of Dairy Science. Vol. XXXIX, N° 1, 81-90, January, 1956.
- 10.—POPE, G. S. — "The Importance of Pasture Plant Oestrogens in the Reproduction and Lactation of Grazing Animals". Dairy Science Abstracts. Vol. 16, N° 5, 333-356, May, 1954.
- 11.—ROBINSON, T. J. — "Oestrogenic Potency of Subterranean Clover (T. Subterraneum L. var. Dwalganup): The Preparation and Assay of Extracts". (Dept. Agric. Perth). Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 127, 297-305, 1949.
- 12.—SCHENCKEL, P. G. — "Infertility in Ewes Grazing Subterranean Pastures. Observations of Breeding Behaviour Following Transfer South Country. (Agric. Coll. Roseworthy, S. Australia) Austral. Vet. 24, 289-294, 1948.
- 13.—SHIER, F. L. and ROSSITER, R. C. — "Clover Disease. Practical Findings and Recommendations for Control". J. Agric. W. Austral. 26, 111-116, 1949.