

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Veterinaria  
Departamento de Patología Animal II

**EFFECTO DEL PASTOREO DE ALFALFA TIERRA DE CAMPOS EN SECANO, SOBRE ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y ANATÓMICOS DEL APARATO REPRODUCTOR DE OVEJAS MANCHEGAS.**

113011  
**TESIS DOCTORAL**

Vº Bº  
El director del trabajo

Vº Bº  
El ponente

Dra. Isabel Vázquez González

Dr. Manuel Rodríguez Sánchez

Memoria que presenta la Lda. Mª Angeles Cantero Bonilla para acceder al grado de Doctor.

**Madrid 1993**

*Universidad Complutense de Madrid*  
*Facultad de Veterinaria*  
*Departamento de Patología Animal II*

**EFEECTO DEL PASTOREO DE ALFALFA TIERRA DE CAMPOS EN SECANO, SOBRE ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y ANATÓMICOS DEL APARATO REPRODUCTOR DE OVEJAS MANCHEGAS.**

La directora del trabajo  
Dra. Isabel Vázquez González.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'I. Vázquez', written in a cursive style.

Memoria que presenta la Lda. M<sup>a</sup> Angeles Cantero Bonilla para acceder al grado de Doctor

**Madrid 1993**

*Agradecimientos*

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al Dr. D. Ignacio Elorrieta, Subdirector General de Investigación Agraria de la C.A.M. y al Dr. D. Santiago Martín Rillo, Director del Departamento de Producción Animal del I.N.I.A., por todas las facilidades dadas para la realización del trabajo.

Al I.N.I.A., por la concesión de la beca predoctoral de la que he disfrutado.

A la Dra. Isabel Vázquez González, por su labor en la dirección de esta tesis y su valiosa ayuda a todos los niveles. A D. Tomás González del Castillo, tutor de la beca de la que he disfrutado, del que partió la idea de este tema y que puso a mi disposición los medios para la realización del trabajo.

Al Dr. D. Manuel Rodríguez Sánchez, Director del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid, por aceptar la ponencia de esta tesis.

Quiero expresar mi más sincera gratitud al Dr. D. Diego Dualde Pérez, Director del Laboratorio de Sanidad Animal del Estado en Valencia. Su gran experiencia, interés y confianza han supuesto para mi una ayuda inestimable.

Al Area de Reproducción Animal del CIT/INIA, en especial al Dr. D. Antonio López-Sebastián, que siempre estuvo dispuesto a resolver dudas que surgieron en el desarrollo del trabajo, y a la Dra. Amelia Gómez Brunet, por su ayuda en los análisis hormonales y su eficaz orientación para interpretarlos. Al Dr. Eugenio Mateos Rex y a la Dra. Belen Pintado, que también me prestaron su ayuda. De una forma muy especial a Blanca Cabellos, que me enseñó la técnica del R.I.A., por su paciencia, su gran ayuda en los análisis hormonales y sobre todo por su simpatía y amistad. También quiero recordar a todos los mozos de la granja y, como no, a Dionisio, que varias tardes me ayudo a coger moruecos.

A la Dra. Juana M<sup>a</sup> Flores Landeira, Catedrática del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid, por la realización de los análisis histológicos y sus indicaciones en la interpretación de los mismos. A la Dra. María Castaño, que siempre me atendió amablemente. A Antonio Rodríguez por su ayuda en el matadero y en los análisis histológicos.

A Susana Pérez Boada y Rosa Calvo, del Centro de Cálculo del I.N.I.A., por la realización del análisis estadístico y sus indicaciones. En especial a Susana por su infinita paciencia.

A D. Juan Carlos Tercero y D. Jorge Alemany de Pharma-mar, por su amabilidad al realizar las fotos de las placas de cromatografía.

Al Dr. D. Jose Valderrábano y D. Julio P. Ramón, del S.I.A. de Zaragoza, cuya experiencia en este tema me ayudo a resolver varias dudas.

A todos mis compañeros del Encín, especialmente a Mariano Cabellos, de la Sección de Viticultura, que dedicó muchas horas de su tiempo en poner a punto la técnica de análisis del coumestrol. Su buen humor y sus bromas hicieron los análisis mucho más llevaderos. A Pilar García, por su ayuda con las fotografías. A Teodora Martínez, por la realización de las disponibilidades de pasto. A Jesús Alegre y Felipe Ruiz de Huidobro por sus consejos, apoyo y amistad. A Cristina y Barbara que se levantaron muchas veces del ordenador para dejarme imprimir.

Al personal laboral de la finca El Encín: a Carlos Sánchez que incluso ya jubilado, siempre estuvo dispuesto a ayudar. De una forma especial a Antonio Alvarez y J. Carlos Blanco, que sufrieron conmigo, a veces no tan estoicamente, muchas inclemencias del tiempo, cansancio y sobre todo, mucho sueño. A Paco, Raquel, Felix y a todos los eventuales que pasaron por allí. A Charo, por las comidas y cenas que nos preparó. Gracias a todos por su hospitalidad y los buenos ratos que pasamos.

A mis amigos, en especial a Felix, Raúl, Nieves y Anabel, que tanto me han apoyado en los momentos difíciles.

A mis padres, por supuesto, les debo todo lo que soy.

Por último, y con un especial cariño, al mejor compañero que podía haber tenido, Jose Luis Sancha. Pasó muchas horas conmigo analizando la alfalfa, muchos días y noches recogiendo muestras y muchos meses intentando que comprendiera la estadística. Por su apoyo, su compañía y dedicación, en fin, por todo, gracias.

Esta Tesis se realizó mediante la concesión de una beca predoctoral del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, desde Noviembre de 1991 a Mayo de 1994.

Forma parte del proyecto de Investigación N° CO 13/91 "Estudio de problemas reproductivos producidos al pastorear alfalfa de secano ganado ovino Manchego" financiado por la Comunidad Autónoma de Madrid y cuyos investigadores responsables son Tomás González del Castillo e Isabel Vázquez González.

***INDICE***

INDICE

Pág.

|   |    |
|---|----|
| <b>1.- INTRODUCCION.</b>  | 1  |
| <b>1.1.- <i>Objetivos</i></b>   | 4  |
| <b>2.- REVISION BIBLIOGRAFICA</b>   | 5  |
| <b>2.1.- <i>Compuestos estrogénicos.</i></b>  | 5  |
| 2.1.1.- Principales compuestos estrogénicos.  | 5  |
| 2.1.2.- Compuestos estrogénicos en la alfalfa.  | 6  |
| 2.1.3.- Efecto de los factores medio-ambientales en los niveles<br>estrogénicos de las leguminosas. | 7  |
| 2.1.4.-Metabolismo de los fitoestrógenos.   | 10 |
| 2.1.5.- Interacción de los fitoestrógenos con los estrógenos endógenos.                             | 13 |
| <b>2.2.- <i>Alteraciones de la reproducción asociadas al consumo de fitoestrógenos.</i></b>         | 15 |
| 2.2.1.- Infertilidad permanente y temporal.   | 16 |
| 2.2.2.- Influencia de los fitoestrógenos en el ciclo estral y en el<br>comportamiento sexual.       | 18 |
| <b>2.3.- <i>Alteraciones del moco cervical ovino debidas al consumo de fitoestrógenos.</i></b>      | 20 |
| 2.3.1.- Cervix uterino.   | 20 |
| 2.3.1.1.- Funciones del cervix.   | 22 |
| 2.3.2.- Moco cervical.  | 24 |
| 2.3.2.1.- Estructura.   | 24 |
| 2.3.2.2.- Propiedades.  | 27 |
| 2.3.3.- Efecto de los fitoestrógenos sobre el moco cervical.  | 31 |

|  |    |
|--|----|
| <b>2.4.- Alteraciones hormonales asociadas al consumo de fitoestrógenos.</b>                   | 36 |
| 2.4.1.- Gonadotropinas.  | 37 |
| 2.4.2.- Interacción entre los efectos reproductivos de los fitoestrógenos<br>y el fotoperíodo. | 38 |
| 2.4.3.- Estrógenos.  | 41 |
| 2.4.4.- Progesterona.  | 42 |
| <br>   |    |
| <b>2.5.- Alteraciones anatomopatológicas asociadas al consumo de fitoestrógenos.</b>           | 44 |
| 2.5.1.- Lesiones anatomopatológicas asociadas a la forma permanente<br>de infertilidad.        | 44 |
| 2.5.1.1.- Aparato reproductor.   | 44 |
| 2.5.1.2.- Otras alteraciones.  | 51 |
| <br>   |    |
| <b>2.6.- Medidas de control.</b>   | 52 |
| <br>   |    |
| <b>3.- MATERIAL Y METODOS.</b>   | 55 |
| <br>   |    |
| 3.1.- EXPERIENCIAS.  | 55 |
| <b>3.1.1.- EXPERIENCIA 1ª. OTOÑO DE 1991.</b>  | 55 |
| .- Animales.   | 55 |
| .- Diseño Experimental.  | 56 |
| 3.1.1.1.- Control de celos y recogida de moco cervical.  | 56 |
| 3.1.1.2.- Recogida de muestras de sangre.  | 57 |
| 3.1.1.3.- Toma de muestras del pasto.  | 58 |
| <br>   |    |
| <b>3.1.2.- EXPERIENCIA 2ª. PRIMAVERA DE 1992.</b>  | 59 |
| .- Animales.   | 59 |
| .- Diseño experimental.  | 60 |
| 3.1.2.1.- Control de celos y recogida de moco cervical.  | 60 |
| 3.1.2.2.- Recogida de muestras de sangre.  | 61 |
| 3.1.2.3.- Toma de muestras del pasto.  | 61 |

|  |    |
|--|----|
| <b>3.1.3.- EXPERIENCIA 3º. OTOÑO DE 1992.</b>  | 61 |
| .- <i>Animales.</i>  | 61 |
| .- <i>Diseño experimental.</i>   | 62 |
| 3.1.3.1.- Control de celos y recogida de moco cervical.                                      | 62 |
| 3.1.3.2.- Recogida de muestras de sangre.  | 62 |
| 3.1.3.3.- Recogida de muestras para el estudio anatomopatológico<br>del aparato reproductor. | 62 |
| <b>3.2.- ANALISIS DEL MOCO CERVICAL.</b>   | 63 |
| .- <i>Material y Métodos.</i>  | 63 |
| <b>3.3.- ANALISIS HORMONALES.</b>  | 65 |
| <b>3.3.1.- Progesterona.</b>   | 65 |
| 3.3.1.1.- Técnica de extracción.   | 65 |
| 3.3.1.2.- Reacción inmunológica.   | 65 |
| 3.3.1.3.- Separación de las fracciones.  | 66 |
| 3.3.1.4.- Análisis de los resultados.  | 66 |
| <b>3.3.2.- LH.</b>   | 67 |
| 3.3.2.1.- Marcaje y purificación de la LH.   | 67 |
| 3.3.2.2.- Análisis de LH.  | 68 |
| 3.3.2.3.- Cálculo de los resultados.   | 68 |
| <b>3.4.- TECNICA HISTOLOGICA.</b>  | 69 |
| 3.4.1.- Fijación e inclusión.  | 69 |
| 3.4.2.- Corte.   | 69 |
| 3.4.3.- Tinción.   | 70 |
| 3.4.4.- Iconografía.   | 70 |
| <b>3.5.- ANALISIS DEL CONTENIDO EN COUMESTROL.</b>   | 70 |

|   |            |
|---|------------|
| 3.6.- ANALISIS ESTADISTICO.   | 75         |
| <b>4.- RESULTADOS.</b>  | <b>79</b>  |
| <i>4.1.- Disponibilidad de pasto y contenido en coumestrol.</i>   | 79         |
| <i>4.2.- Efecto del pastoreo de alfalfa sobre las características del moco cervical.</i>                    | 83         |
| 4.2.1.- Experiencias 1, 2 y 3.  | 83         |
| 4.2.2.- Efecto del pastoreo de alfalfa y de la estación sobre el moco cervical.                             | 89         |
| 4.2.3.- Efecto de la dieta y del tiempo de pastoreo sobre el moco cervical.                                 | 91         |
| <i>4.3.- Efecto del pastoreo de alfalfa sobre los perfiles hormonales de LH y progesterona.</i>             | 93         |
| 4.3.1.- Experiencias 1, 2 y 3.  | 93         |
| 4.3.2.- Efecto de la estación y del pastoreo de alfalfa sobre los perfiles hormonales de LH y progesterona. | 120        |
| 4.3.3.- Efecto de la dieta y del tiempo de pastoreo sobre los perfiles hormonales de LH y progesterona.     | 128        |
| <i>4.4.- Estudio anatomopatológico del aparato reproductor.</i>   | 136        |
| <b>5.- DISCUSION.</b>   | <b>144</b> |
| <i>5.1.- Disponibilidad de pasto y contenido en coumestrol.</i>   | 144        |
| <i>5.2.- Efecto del pastoreo de alfalfa sobre el moco cervical ovino.</i>                                   | 145        |
| <i>5.3.- Efecto del pastoreo de alfalfa sobre los perfiles hormonales de LH y progesterona.</i>             | 149        |
| <i>5.4.- Efecto del pastoreo de alfalfa sobre el aparato reproductor.</i>                                   | 155        |
| <b>6.- CONCLUSIONES.</b>  | <b>158</b> |

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| <b>7.- RESUMEN.</b>      | 160 |
| <b>8.- ABREVIATURAS.</b> | 162 |
| <b>9.- BIBLIOGRAFIA.</b> | 163 |

## *INTRODUCCION*

## 1.- INTRODUCCION

El pastoreo es el sistema más barato y extendido de alimentación del ganado ovino. La explotación ovina, desde el punto de vista económico, tiene poca viabilidad si una parte importante de la alimentación no está constituida por pastos o subproductos agrícolas o industriales.

El sistema de alimentación y manejo aplicado en España coloca a nuestra ganadería en condiciones de inferioridad, en lo que a costes se refiere, respecto a los países que disponen de grandes extensiones destinadas a pastos. Por otra parte, la penalización del cultivo de cereales y las primas al uso no agrícola del suelo por parte de la Política Agrícola Comunitaria, hace que los sistemas de producción en pastoreo puedan resultar una alternativa económica para determinadas áreas cerealistas del interior de España (Alegre, 1991).

En los últimos años se ha incrementado la superficie destinada a praderas de siembra con el fin de reducir los gastos de alimentación en pesebre, aunque los gastos de fertilización nitrogenada que conllevan las praderas de gramíneas han hecho disminuir las expectativas de desarrollo de tales cultivos (Sierra y Thos, 1982). Sin embargo, la alfalfa reúne unas características que la hacen un cultivo muy interesante para su utilización como pradera de pastoreo, y su importancia aumentará en el futuro debido a su alto rendimiento, calidad de forraje y amplia adaptación al clima y al suelo. Es independiente del nitrógeno del suelo, que puede conseguir directamente del aire, y es el cultivo que produce más proteína por hectárea y además de gran calidad, por el alto valor de sus aminoácidos esenciales para la nutrición animal y humana (Muslera y Ratera, 1984). Además, la alfalfa ofrece mayores posibilidades que muchas de las

otras leguminosas de pastoreo, porque por su forma de crecimiento erguido y su rápida recuperación, se presta para recogerla como heno, ensilado o alimento verde.

La alfalfa, (*Medicago sativa L.*), es el cultivo forrajero más importante en España. Según los datos del Anuario de Estadística Agraria del MAPA (1990), este cultivo ocupa una superficie de 295.966 Ha, por delante de los cereales de invierno, praderas polifitas y veza-avena. En definitiva, del heno consumido por nuestra ganadería, el 68% es heno de alfalfa, sumando además un consumo en verde de 2,2 millones de Tm y una cifra semejante para el consumo de alfalfa deshidratada.

Sin embargo, un factor limitante de la utilización de la alfalfa para la nutrición animal podría ser un posible efecto negativo sobre la reproducción del ganado, especialmente el ovino, debido a su contenido en fitoestrógenos, término que se aplica a determinadas sustancias estrogénicas de origen vegetal que presentan tres estructuras: esteroides, isoflavonoides y coumestanos. A este último grupo pertenece el coumestrol, principal compuesto estrogénico de la alfalfa y el fitoestrógeno más potente (Burroughs et al., 1990).

La importancia ganadera de los fitoestrógenos fue detectada en los años 40 en Australia al observar determinadas anomalías de la reproducción en ovejas alimentadas con *Trifolium subterraneum*, algunas de cuyas variedades tienen un contenido elevado de isoflavonas y cuyos desastrosos efectos sobre la fertilidad del ganado son bien conocidos. La esterilidad de las ovejas que consumían trébol subterráneo se producía por un fallo en la concepción e iba acompañado de una hiperplasia quística glandular del endometrio (Adams, 1990). Sin embargo, existe poca información sobre el contenido fitoestrogénico de las variedades de alfalfa y el efecto en la reproducción de los

animales que la pastorean; aunque parece que producen modificaciones en las características del moco cervical, alteraciones morfológicas de los órganos reproductores y desequilibrios hormonales (Valderrábano, 1992) que deberían conducir a alteraciones en la función reproductora.

En este sentido, el presente trabajo estudia el efecto del pastoreo de alfalfa sobre los siguientes parámetros reproductivos de la oveja: características del moco cervical, perfiles hormonales de LH y progesterona y morfología del aparato reproductor. Para ello se han llevado a cabo tres experiencias en diferentes estaciones y con distintos periodos de pastoreo, con el fin de valorar las posibles variaciones en el contenido en coumestrol de la alfalfa a lo largo del año y su influencia en la reproducción, y el efecto de un pastoreo prolongado.

**1.1. OBJETIVOS.**

En resumen, los objetivos del presente trabajo han sido:

1. Estudiar el efecto de un periodo corto de pastoreo de alfalfa sobre las características del moco cervical y los perfiles hormonales de LH y progesterona en dos estaciones, otoño y primavera.
2. Analizar el efecto de un pastoreo prolongado de alfalfa sobre los parámetros anteriores y sobre la morfología del aparato reproductor.
3. Estimar que cantidades de coumestrol pueden comprometer la función reproductora.

*REVISION  
BIBLIOGRAFICA*

## **2.- REVISION BIBLIOGRAFICA.**

### **2.1. COMPUESTOS ESTROGENICOS.**

#### **2.1.1. Principales compuestos estrogénicos.**

Las primeras investigaciones sobre los fitoestrógenos surgieron al producirse grandes alteraciones reproductivas en rebaños ovinos explotados en el Oeste de Australia, donde se habían sembrado con trébol subterráneo grandes extensiones de pastos naturales para mejorarlos (Shinckell, 1948).

Más tarde se observó que ocurría un fenómeno similar durante los años secos en la codorniz de California, cuando las concentraciones de fitoestrógenos estaban incrementadas en los forrajes disponibles (Leopold et al., 1976).

Los fitoestrógenos son sustancias de las plantas estructural y funcionalmente similares al 17- $\beta$  estradiol o que producen efectos estrogénicos (Fowler, 1983).

Bradbury y White (1954), aislaron del trébol subterráneo dos compuestos potencialmente estrogénicos, la genisteína y la formononetina, pertenecientes al grupo de las isoflavonas. Se presentan en la planta en forma de glicósidos conjugados solubles en agua y que son fácil y rápidamente hidrolizados por las glicosidasas cuando se rompe la estructura celular de la hoja durante la masticación (Beck, 1964).

Posteriormente se identificaron otros compuestos vegetales que han mostrado actividad estrogénica. Dentro del grupo de las isoflavonas, la daidzeína y la biochanina A (Bradbury y White, 1954), principalmente presentes en especies del género *Trifolium*,

y en el grupo de los coumestanos, el coumestrol y derivados (Bickoff et al., 1957; 1966), aislados principalmente de medicagos anuales.

Entre los fitoestrógenos se encuentran sustancias con tres estructuras químicas: esteroides, isoflavonoides y coumestanos. Dentro de los primeros se pueden citar la estrona, el estriol y el  $\beta$ -sitosterol, sustancias encontradas en la remolacha, judías, palmas y granada. En el grupo de los isoflavonoides se pueden citar la formononetina, genisteína, biochanina A, daidzeína, irigenina, orobol y afrormosina, aisladas en los géneros *Glycine*, *Lupinus*, *Medicago*, *Trifolium*, *Prunus*, etc. Finalmente, en el grupo de los coumestanos se han aislado el coumestrol, medicagol, sojagol y psoralidina, encontradas en la soja, alfalfas y tréboles principalmente (Jurado, 1983), siendo el coumestrol el fitoestrógeno más potente (Burroughs et al., 1990).

Los fitoestrógenos son producidos por numerosas leguminosas y pastos, incluyendo muchas plantas consumidas comúnmente por el hombre y el ganado. Además de la alfalfa y los tréboles se han encontrado sustancias estrogénicas en la soja, judías, zanahorias, fresas, cerezo, hinojo, lúpulo, guisante, tomate, colza... Recientemente se ha encontrado que la marihuana y el café contienen sustancias estrogénicas, de tal forma que el consumo frecuente de marihuana suprime los niveles de LH durante el ciclo menstrual humano y acorta la fase luteal y el ciclo menstrual (Sauer et al., 1983; Kitts, 1987).

### **2.1.2. Compuestos estrogénicos en la alfalfa.**

En la alfalfa se han encontrado cuatro isoflavonas (genisteína, formononetina, daidzeína y biochanina A) y el coumestrol (Hanson, 1972), aunque el coumestrol es el mayor componente estrogénico en la alfalfa, siendo la cantidad de isoflavonas

insignificante (Millington et al., 1964a; Medina Blanco et al., 1982a). Además, ya que el coumestrol es entre 30-100 veces más estrogénico que las isoflavonas, la contribución de las isoflavonas a la estrogénicidad de la alfalfa es despreciable (Guggolz et al., 1961).

Aunque los fitoestrógenos tienen únicamente una actividad estrogénica de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  veces la del  $17-\beta$  estradiol en animales de laboratorio, a menudo se encuentran en concentraciones relativamente altas en las especies pratenses y la ingestión diaria por las ovejas puede causar efectos patológicos (Cox y Braden, 1974).

### **2.1.3. Efecto de los factores medio-ambientales en los niveles estrogénicos de las leguminosas.**

Los niveles de fitoestrógenos en la planta se encuentran afectados por un gran número de factores como la localización geográfica, variedad, prácticas de cultivo, método de riego, año, estado de crecimiento y época del año (Bickoff et al., 1960; Francis y Devitt, 1969).

Medina Blanco et al. (1982b), encuentran el mayor contenido estrogénico en pastos naturales durante el período primaveral. Francis y Millington (1965), examinando varias especies de *Medicagos* encontraron que las concentraciones de coumestrol eran mucho más elevadas en hojas maduras que en hojas jóvenes.

Otros factores que afectan el contenido fitoestrogénico son la temperatura y la luminosidad, incrementándose los niveles de isoflavonas cuando hay bajas temperaturas (Rossiter y Beck, 1966) y al aumentar las horas de luz (Rossiter y Beck, 1967).

La composición química del suelo parece tener también gran importancia en el contenido de isoflavonas en los pastos. Así, las deficiencias en fósforo, nitrógeno y azufre pueden casi doblar las concentraciones de formononetina en las hojas (Rossiter, 1969; 1970). Neil y Marshall (1970), encontraron que el contenido en formononetina en trébol subterráneo abonado con bajas tasas de superfosfato, era el doble que en pastos abonados a altas tasas.

El nivel de coumestanos en la alfalfa es muy variable. Generalmente se encuentra en las plantas sanas en concentraciones que no tienen influencia sobre el animal (1-2 mg/kg) (Le Bars y Le Bars, 1984), pero en determinadas circunstancias, puede sobrepasar los 100 mg/Kg, llegando incluso a alcanzar valores superiores a 600 ppm (Jagush et al., 1977), concentración que es muy superior a la concentración mínima considerada como biológicamente activa (20-50 ppm)(Wong et al., 1971).

El coumestrol se acumula en la alfalfa sobre todo como resultado de una infección por patógenos foliares, especialmente por dos tipos de hongos: el *Pseudopeziza medicaginis*, productor de la viruela de la hoja, y el *Uromyces striatus*, productor de la roya (Loper et al., 1967). Shemesh et al. (1969), encontraron que la alfalfa infectada por *P. medicaginis*, contenía cerca de 60 veces más coumestrol que las muestras libres de lesiones macroscópicas. El contenido en coumestrol parece estar positivamente asociado con el tamaño y el número de lesiones (Loper et al., 1967).

El incremento en la concentración de coumestrol también lo producen especies de áfidos como el pulgón de la alfalfa (*Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Loper, 1968; Kain y Biggs, 1980), estando la concentración de coumestrol linealmente relacionada con el número de áfidos.

Este aumento en la concentración de coumestrol está asociado a mecanismos de defensa de los vegetales frente a patógenos foliares (Deverall, 1977). Este mecanismo de defensa puede alterar a su vez la fertilidad de los animales superiores y así, los fitoestrógenos han sido propuestos como sustancias defensivas producidas por las plantas para modular la fertilidad de los herbívoros, pudiendo jugar un papel incluso en la evolución de las especies, determinando la supervivencia o la desaparición de las mismas (Hughes, 1988a). De hecho, la sensibilidad a los fitoestrógenos es distinta según las especies animales (Fredricks et al., 1981).

Un ejemplo de como los fitoestrógenos regulan las poblaciones, se encuentra en la codorniz de California. Durante los años secos, cuando la comida era escasa, muchas hierbas contenían altos niveles de fitoestrógenos y la producción de huevos y la cría fue muy baja (Leopold et al., 1976). Esto parece ser un mecanismo natural de regulación de la población para controlar la fertilidad durante los años en que la comida fue escasa (Fowler, 1983).

En leopardos cautivos se ha encontrado que una alimentación a base de soja (que contiene fitoestrógenos) ha sido la responsable de enfermedades hepáticas e infertilidad (Setchell et al., 1987).

Los coumestanos persisten en forrajes conservados (Hanson, 1972) y consecuentemente, henos, ensilados, harinas y gránulos, pueden contener niveles elevados de coumestrol si proceden de cultivos con niveles apreciables de enfermedades foliares o ataques de áfidos.

#### **2.1.4. Metabolismo de los fitoestrógenos.**

Los fitoestrógenos sufren cambios metabólicos en el animal dando compuestos de muy diferente estrogenicidad a los compuestos originales que se encuentran en la planta.

Así, la formononetina, tiene poca o ninguna actividad estrogénica en si misma (Nilsson, 1962), pero en el rumen se transforma en equol que es estrogénico y probablemente el responsable de la enfermedad del trébol (Shutt y Braden, 1968). Por el contrario, la genisteína y la biochanina A, las cuales son estrogénicas por si mismas cuando se administran por vía parenteral, son metabolizadas en el rumen a p-etilfenol y ácido fenólico que carecen de actividad estrogénica (Braden et al., 1967). (Figura N°1).

La degradación ruminal de la genisteína y la biochanina a fenoles inactivos aumenta progresivamente durante los primeros días de pastoreo hasta que sus efectos estrogénicos resultan prácticamente despreciables. Por el contrario, la proporción de formononetina convertida en equol no cambia con el tiempo y su estrogenicidad se mantiene elevada (Lindsay y Francis, 1969); mientras que con los coumestanos, la situación parece ser intermedia (Kelly, 1972), aunque la actividad del coumestrol parece ser 15 veces la de las isoflavonas cuando se administra intrarruminalmente y 100 veces más activo cuando la administración es intramuscular (Braden et al., 1967).

La biochanina A es demetilada a genisteína y posteriormente a p-etilfenol, que no exhibe actividad estrogénica, mientras que la formononetina es primero demetilada a daidzeína y luego reducida a equol (Batterham et al., 1965).

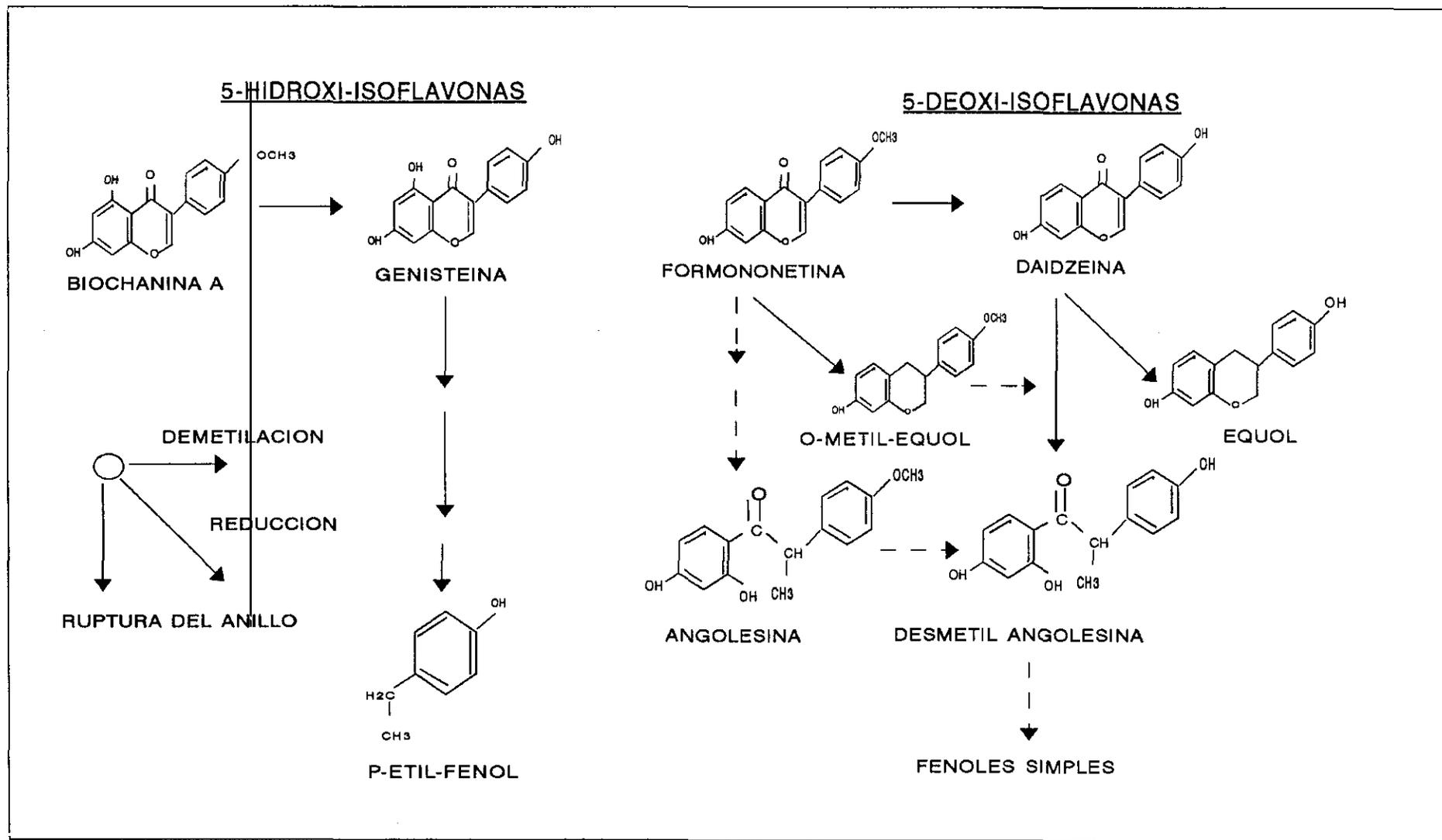


FIGURA Nº 1.- CONVERSIONES METABOLICAS DE LAS ISOFLAVONAS EN LA OVEJA.  
Las líneas discontinuas indican cambios probables. (Cox et al., 1984).

En el ganado ovino, más del 80% de la formononetina ingerida con el trébol es absorbida en el rumen en forma de equol (Shutt et al., 1970) y la mayor parte del equol absorbido es conjugado, probablemente en el hígado, para formar glucosiduronatos biológicamente inactivos, antes de ser excretados por la orina (Shutt et al., 1970), junto con una pequeña cantidad de daidzeína y desmetilangolesina (Batterham et al., 1971).

Los fitoestrógenos y sus metabolitos circulantes en el plasma se encuentran fundamentalmente en forma de glucosiduronatos y en esta forma son probablemente biológicamente inactivos (Shutt et al., 1967). Menos de un 1% están presentes en forma libre y una pequeña cantidad en forma de sulfoconjugados (Cox et al., 1984). Los sulfoconjugados y las fracciones libres representan probablemente las formas biológicamente activas del compuesto.

Sin embargo, en el caso del coumestrol, altas proporciones se presentan en forma no conjugada y sulfoconjugada (Cox y Braden, 1974).

Se han encontrado además otros metabolitos de la formononetina, como el 4'-o-metil-equol y pequeñas cantidades de angolesina. Cox y Braden (1974) encontraron que el o-metil-equol estaba presente en la orina en cantidades apreciables en 9 de 30 animales y en algunos en unos niveles próximos a los del equol.

El o-metil-equol ha sido también aislado de depósitos renales que pueden causar bloqueo del tracto urinario en machos que consumen pastos estrogénicos (Nottle & Beck, 1974). Este metabolito es de interés porque una cantidad apreciable de formononetina puede ser metabolizada por una vía alternativa que conlleva la reducción sin una demetilación previa.

Este compuesto es probablemente menos estrogénico que el equol (Nottle & Beck, 1974) y esto puede ser interesante en relación a los efectos biológicos para el ovino.

#### **2.1.5. Interacción de los fitoestrógenos con los estrógenos endógenos.**

Los fitoestrógenos tienen los requisitos estructurales para unirse a los receptores de estrógenos (Kaldas y Hughes, 1989). Por ejemplo, el equol, posee una potencia de  $10^{-3}$  veces la actividad del 17- $\beta$  estradiol y contiene sustituyentes fenilos también presentes en el 17- $\beta$  estradiol y en el dietilestilboestrol. (Figura N° 2 ).

El sustituyente que se requiere para mostrar actividad estrogénica es un grupo hidroxilo en la misma posición que el grupo hidroxilo en el anillo bencénico del 17- $\beta$  estradiol (Setchell et al., 1984). Otra similaridad estructural la cual facilita la unión de los fitoestrógenos a los receptores de estrógenos es que la distancia entre el C<sub>3</sub> y el C<sub>17</sub> en el 17- $\beta$  estradiol es igual a la que hay entre los dos grupos hidroxilo en el equol (Kaldas y Hughes, 1989).

Los fitoestrógenos son de variadas estructuras pero todos tienen grupos fenólicos, y parece que la competición de los fitoestrógenos con el estradiol por los receptores citoplasmáticos de estrógenos depende principalmente de la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 (Shutt y Cox, 1972).

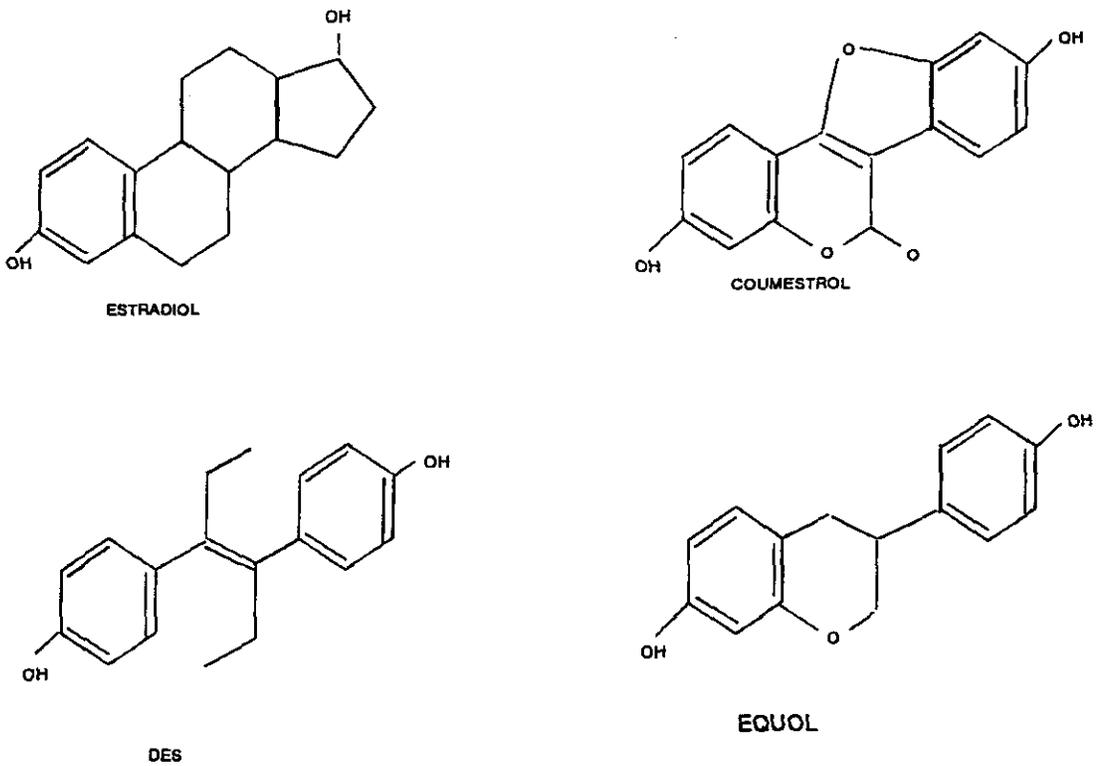


Figura N° 2: Estructura del estradiol, DES, coumestrol y equol.

Las acciones de los fitoestrógenos podrían ser estrogénicas o antiestrogénicas. En un hipoestrogenismo individual, la unión de los receptores de estrógenos a un estrógeno exógeno débil podría producir efectos estrogénicos, mientras que en presencia de estradiol 17- $\beta$ , grandes cantidades de un estrógeno débil pueden disminuir la actividad estrogénica por competición con el estradiol (Kaldas y Hughes, 1989). Por tanto, la competición entre fitoestrógenos y estrógenos es función no sólo de la afinidad, sino también de la concentración (Mathieson y Kitts, 1980).

Algunas investigaciones también han demostrado que el coumestrol compite con los receptores de estrógenos de células cancerígenas de mama en mujer, en tumores mamarios de rata y con los receptores de estrógenos del útero de ratón (Martín et al., 1978; Shutt y Cox, 1972; Nelson et al., 1984).

## **2.2. ALTERACIONES DE LA REPRODUCCION ASOCIADAS AL CONSUMO DE FITOESTROGENOS.**

Los primeros trabajos sobre la enfermedad del trébol o "clover disease", describían síndromes de distocia y prolapso uterino en ovejas que ingerían pastos estrogénicos. Una progresiva y severa infertilidad fue asociada con la enfermedad, siendo la principal alteración una hiperplasia quística glandular del endometrio (Bennets et al., 1946), lesión que es atribuible a la estimulación estrogénica producida por las isoflavonas encontradas en algunos cultivos de trébol subterráneo. Este tipo de infertilidad fue reconocido como permanente (Schinckel, 1948).

La ingestión de fitoestrógenos en el período de cubrición, puede causar también una infertilidad temporal (Morley et al., 1964), que desaparece unas semanas después de la salida de los pastos (Morley et al., 1966), y debe distinguirse de la forma permanente, la cual persiste incluso cuando las ovejas están sobre pastos no estrogénicos (Underwood y Shier, 1951). Estudios previos no siempre han distinguido entre estos dos tipos de infertilidad lo cual ha dado lugar a algunas confusiones.

### **2.2.1. Infertilidad permanente y temporal.**

Lightfoot y Wroth (1974), postularon que los estrógenos vegetales pueden causar infertilidad en las ovejas por dos mecanismos distintos, a los que llamaron infertilidad permanente y temporal:

#### **- Infertilidad permanente:**

Se caracteriza por distocias maternas, mortalidad post-natal en corderos, prolapsos uterinos, hiperplasia quística glandular del endometrio e infertilidad permanente.

Las ovejas que se alimentan varias estaciones sobre trébol estrogénico pueden sufrir una infertilidad la cual empeora progresivamente según continúa la exposición. Las ovejas afectadas pueden salir en celo, ser cubiertas y ovular normalmente, pero el transporte espermático a través del cervix está dañado por lo que la tasa de fertilización es reducida (Lightfoot et al., 1967).

#### **- Infertilidad temporal:**

Se caracteriza por una reducción en el porcentaje de ovejas en celo (Coop y Clark, 1960; Lightfoot y Wroth, 1974), una disminución en la tasa de fertilidad, una alteración en el transporte normal de los ovocitos a lo largo del oviducto y una reducción en el número de espermatozoides que alcanzan el lugar de fertilización (Morley et al., 1964; Holst y Braden, 1972; Lightfoot y Wroth, 1974).

Las alteraciones causadas por los coumestanos podrían estar más relacionadas con la infertilidad temporal, aunque hay pocos datos sobre sus efectos a largo plazo (Valderrábano, 1992). Después de 3-5 semanas de retirar a las ovejas de los pastos de alfalfa ricos en coumestanos, se observa una recuperación de sus parámetros reproductivos (Morley et al., 1966; Smith et al., 1980).

Los cambios patológicos son atribuibles a la acción de los estrógenos sobre el eje hipófisis/ovario y sobre el transporte espermático.

Existen también evidencias de una disminución de los partos gemelares (Donnelly et al., 1982), que puede ser debido a la disminución en la tasa de ovulación que se ha observado en animales que ingieren fitoestrógenos (Coop, 1977; Scales y Moss, 1977; Kelly et al., 1980; Smith et al., 1980; Ramón, 1987, Ramón et al., 1993) y en ovejas inyectadas diariamente con estradiol (Land, 1976). Smith y Jagush (1979), encontraron que niveles tan bajos de coumestanos como 25 ppm en la dieta, deprimían la tasa de ovulación de ovejas que consumían pellets de alfalfa durante 35 días, quizás porque los coumestanos ejercen sus efectos por interferencia con la liberación de FSH desde la hipófisis. Sin embargo, hay autores que no han encontrado diferencias en la tasa de ovulación (Folch et al., 1989) o incluso la han encontrado más elevada (Lightfoot et al., 1967; Adams, 1981), quizás como resultado de un desarrollo folicular alterado.

Otra causa de la disminución de los partos gemelares puede ser el incremento en la mortalidad embrionaria durante las primeras fases de la gestación (Turnbull et al., 1966; Fels y Neil, 1968; Thonson y Jagush, 1976). A este respecto Hettle y Kitts (1983) sugieren que la alteración de los perfiles de LH en la formación del cuerpo lúteo cuando

se combina con perfiles anormales de estrógenos, puede afectar la implantación y mantenimiento de la gestación durante los primeros estadios de la misma.

**COMPARACION ENTRE LA INFERTILIDAD PERMANENTE Y TEMPORAL CAUSADA POR PLANTAS ESTROGENICAS.**

(Adams, 1990)

|                        | TEMPORAL  | PERMANENTE   |
|------------------------|---|--|
| ORGANO DIANA PRINCIPAL | -ovario/hipófisis   | -cervix  |
| EFEECTO PRINCIPAL      | -menor nº de partos gemelares<br>-fallos en la concepción | -fallos en la concepción<br>-tasa de partos gemelares normal |
| TEST DIAGNOSTICO       | -cubrición en el pasto                                    | -patología del cervix  |
| TRATAMIENTO            | -extracción del pasto                                     | -ninguno   |

**2.2.2. Influencia de los fitoestrógenos en el ciclo estral y en el comportamiento sexual.**

La longitud del ciclo estral y la duración del celo, no parecen estar afectadas en ovejas con infertilidad debida a los fitoestrógenos (Obst y Seamark, 1970; Lightfoot et al., 1974; Smith, 1975); aunque otros autores han encontrado irregularidades en el ciclo, con una mayor variabilidad en la duración del ciclo estral y mayor incidencia de estros silenciosos (Ch'ang, 1961; Adams, 1981). Estas irregularidades del ciclo parecen ser debidas a infecciones del tracto genital, que son comunes en ovejas afectadas por

la enfermedad del trébol (Turnbull et al., 1966; Fels y Neil, 1968; Kaltenbach y Davies, 1970).

En cuanto al comportamiento sexual, se ha observado que en ovejas ovariectomizadas y afectadas por la enfermedad del trébol, el hipotálamo tiene una menor capacidad para estimular la liberación de LH en respuesta a un tratamiento con  $17-\beta$  estradiol (Findlay et al., 1973). Al igual que hay lugares en el hipotálamo que controlan la liberación de gonadotropinas, hay otras áreas que controlan el comportamiento sexual (Clegg y Ganong, 1960; Radford, 1967). La incidencia, momento en que comienza el estro y la duración del comportamiento estral, durante el cual la oveja acepta ser montada por el macho, están directamente relacionados con la cantidad de estrógenos a que está expuesta la oveja (Scaramuzzi et al., 1971a).

Adams (1978), realizó una experiencia con dos lotes de ovejas ovariectomizadas, uno de los cuales estaba afectado por la enfermedad del trébol, y les inyectó distintas dosis de benzoato de estradiol. Observó que había algunos signos del comportamiento, como el "flehmen" en el macho después de oler a la hembra y la depresión del tercio posterior en la oveja, que no estaban relacionados con la dosis de estrógenos recibida, y precisamente en estos parámetros no encontró diferencias entre los lotes de ovejas.

Sin embargo, las ovejas afectadas por la enfermedad del trébol, mostraron una depresión significativa en la incidencia, duración y tiempo de comienzo de los signos comportamentales que estaban directamente relacionados con la dosis de estrógenos (inmovilidad, actitud solícita con el macho, movimientos de la cola).

Por tanto, como el grado de respuesta estuvo relacionado con la dosis de benzoato de estradiol, parece que las ovejas afectadas son menos sensibles al tratamiento con estrógenos.

### **2.3. ALTERACIONES DEL MOCO CERVICAL DEBIDAS AL CONSUMO DE FITOESTROGENOS.**

#### **2.3.1. Cervix uterino.**

El cuello uterino es una estructura de tipo esfínter que se proyecta en sentido caudal hacia dentro de la vagina. Es un órgano fibroso caracterizado por una gruesa pared y una luz reducida. Presenta pocas fibras musculares lisas y gran cantidad de tejido conjuntivo (Hafez, 1987a). En la oveja mide alrededor de 4 cm. y su luz está cerrada por prominencias y depresiones recíprocas de la mucosa. No existen glándulas en el cervix, pero las células globosas pueden secretar un moco denso (Sisson y Grossman, 1982).

Esta estructura anatómica se encuentra cerrada, excepto durante el estro, momento en el cual se relaja ligeramente y permite que el esperma penetre en el útero.

La mucosa cervical está constituida por criptas mucosas primarias y secundarias, que proveen una extensa superficie secretora (Hafez, 1987b).

Existen dos tipos de células epiteliales columnares:

- células ciliares con cinocilios

- células secretoras no ciliadas.

Los cinocilios laten hacia la vagina y las células no ciliadas contienen un gran número de gránulos secretorios. La actividad secretoria máxima de estas células se presenta durante el estro.

La mucosa consta de grandes pliegues cervicales que son más numerosos y menos regulares en tamaño en la parte craneal del cuello que en la parte caudal.

Durante el estro, las células de las bases de los pliegues actúan como si tuvieran mayor capacidad de respuesta a la estimulación de los estrógenos que las células más cercanas a la luz (Heydon y Adams, 1979). Este hecho tiene implicaciones en el transporte espermático debido a que el moco que sale de las células guía a los espermatozoides a lo largo de "líneas de flujo" hacia la mucosa cerca de su origen. Una reacción más intensa de la mucosa a los estrógenos, las bases de los pliegues y las indentaciones secundarias, dará por resultado que los espermatozoides se guíen en mayor proporción a estas áreas, produciendo así la captura física de los espermatozoides. Hay resultados en los que las características reológicas del moco cervical varían en las diferentes partes de las criptas cervicales. Mediante técnicas histoquímicas, se han observado sulfomucinas en las células de los pliegues cervicales próximos a la luz, en tanto que en las células de las criptas o en las indentaciones secundarias, el moco es más abundante y se tiñe bajo la acción de las sialomucinas (Heydon y Adams, 1979).

La pared cervical está formada por tejido fibroso elástico y colágeno con pequeñas cantidades de tejido muscular liso.

#### 2.3.1.1. Funciones del cervix.

El cervix y su secreción tienen unas funciones importantes en el proceso de la reproducción:

a) En los rumiantes, el cervix tiene un papel importante como reservorio, desde el cual la migración de espermatozoides al útero y trompas continúa por un período prolongado después del apareamiento (Mattner, 1966).

b) Las propiedades físicas y reológicas del moco cervical constituyen una restricción al paso de los espermatozoides para evitar una migración espermática demasiado rápida y una prematura dispersión y pérdida de los espermatozoides (Mattner, 1966).

c) El moco cervical ha sido reconocido como un filtro biológico que restringe la migración de los espermatozoides anormales o defectuosos por el tracto reproductor femenino (Katz et al., 1990).

d) Un medio ambiente cervical favorable es esencial para la fertilidad. El metabolismo de los carbohidratos del cervix, bajo la influencia de los estrógenos, suministra energía al espermatozoide durante su migración (Bugalia et al., 1988).

Los estrógenos estimulan la secreción de glucógeno en el moco cervical (Gregoire et al., 1972) y la actividad de la fosfatasa alcalina mejora la utilización del glucógeno por el espermatozoide en el moco cervical (Smith et al., 1970). Gibbson y

Mattner (1966) encontraron abundante galactosa y aminoácidos en la fracción de glicoproteínas epiteliales del moco. Turner (1965) encontró que el espermatozoide humano podía incorporar glucosamina y sugirió que el espermatozoide era capaz de reaprovisionar sus reservas de esta forma mientras está en el tracto genital femenino.

Restall (1969) encontró que el fluido cervico-vaginal mantenía al espermatozoide con un alto nivel de actividad por un período de 6 horas, mientras que en los fluidos uterinos y tubales el porcentaje de espermatozoides móviles después de 6 horas era muy bajo. Edgar y Asdell (1960) también encontraron que los espermatozoides morían relativamente rápido en el útero y trompas.

e) La presencia de espermatozoides en el tracto genital femenino resulta en un incremento del número de leucocitos en el lumen del útero y cervix. En el cervix la mayoría de los leucocitos se sitúan en la masa central de moco. Los espermatozoides se sitúan dentro de las criptas o en las proximidades de la mucosa cervical, limitándose el contacto entre los espermatozoides y polimorfonucleares que entran en el cervix desde la luz del útero. Esta separación de los dos tipos de células juega un papel importante en la supervivencia de una adecuada población de espermatozoides en el cervix de los rumiantes (Mattner, 1968).

f) El moco cervical facilita el transporte espermático. Cuando el moco cervical y el semen se unen *in vitro*, inmediatamente se forman líneas de fase entre las dos sustancias y surgen falanges espermáticas (Hafez, 1987c). La estructura del moco cervical determina la orientación espermática (Adams, 1975).

g) Posiblemente el moco cervical intervenga en la capacitación espermática (Hunter, 1992).

Por tanto, las propiedades físicas, estructurales y reológicas del moco cervical son factores de vital importancia para el establecimiento, retención y protección de una reserva cervical de espermatozoides (Mattner, 1973).

### **2.3.2. Moco cervical.**

#### **2.3.2.1. Estructura.**

La microestructura del moco cervical ha sido estudiada por numerosas técnicas que incluyen, entre otras, resonancia magnético nuclear (Odeblad y Rudolfsson, 1973), reometría (Wolf et al., 1977) y microscopía electrónica (Chrétien et al., 1974).

El moco cervical es un hidrogel, con una fase fluida, y, más importante, una "fase gel", en la cual largas y voluminosas moléculas de glicoproteínas están unidas y cruzadas tomando una forma de retículo (Mattner, 1973; Linford, 1974).

Las propiedades físicas del moco son las de un gel elástico, y no las de una solución viscosa. Si el mucus fuera un fluido viscoso no podría realizar su función primaria, puesto que un fluido viscoso no podría hacerse anisotrópico bajo una fuerza estática. Esta anisotropía se afirma en la capacidad del moco de dirigir la migración del espermatozoide dentro de él (Gibbons y Sellwood, 1973).

La fracción de baja viscosidad es un líquido amarillento, que se aspira con facilidad en un tubo capilar; está compuesto de proteínas no mucínicas del tipo sérico (incluyen prealbúmina, lipoproteínas, albúmina,  $\beta$ -globulinas y  $\gamma$ -globulinas), sales (principalmente cloruro sódico y trazas de potasio, magnesio, cobre, calcio, fosfatos y sulfatos), lípidos y carbohidratos.

La fracción de alta viscosidad es una sustancia blanca y clara que contiene macromoléculas de mucina de origen epitelial, compuestas de glicoproteínas (particularmente del tipo sialomucina) que contienen cerca del 25% de aminoácidos y 75% de carbohidratos. La mucina está formada por una larga cadena de polipéptidos con numerosas cadenas laterales de oligosacáridos. La porción de carbohidratos consta de galactosa, glucosamina, fucosa y ácido siálico. A las glucoproteínas o glucopéptidos es a los que se les atribuye la formación del gel (Hafez, 1987a).

En el momento de la ovulación el moco cervical está constituido por macromoléculas dispuestas en unidades micelares que contienen entre 100 y 1000 cadenas de micromoléculas. Las micromoléculas de mucina presentan una estructura polipeptídica con cadenas laterales de oligosacáridos y ácido siálico (Hafez, 1987a).

Resultados obtenidos de estudios reológicos y resonancia magnético nuclear sobre mucus humano (Odeblad, 1968) indicaron que el gel puede estar dispuesto en forma de cadenas macromoleculares paralelas de 1 a 3  $\mu$  de ancho, separadas por canales de fluido de 3 a 5  $\mu$  de ancho.

Singer y Reid (1970) defienden también esta teoría por estudios microelectrónicos. Odeblad (1968) distingue dos tipos de moco cervical en la mujer:

tipo E (estrogénico), caracterizado por una disposición paralela de las micelas, el cual forma la parte principal (95%) del moco secretado durante el período ovulatorio, y el tipo G (gestación), en el cual las micelas se disgregan entre la red, formando una malla compacta. Es el tipo predominante en la fase luteal.

Una técnica más apropiada para la observación de la microestructura del moco cervical es la microscopía electrónica. Chrétien et al. (1974) observan mediante esta técnica en moco cervical de mandril (*Papio anubis*) que el alineamiento de los filamentos fue similar al observado en la mujer. Encuentran tres clases de filamentos en la fase ovulatoria:

- $\alpha$ : 2000-4000 Å, los cuales parecen constituir el principal soporte estructural.
- $\beta$ : 1000-1500 Å, menos frecuentes.
- $\gamma$ : 500-750 Å, raramente vistos.

En la fase luteal no pudieron verse los filamentos largos y en algunos lugares la trama era una red densa y extremadamente compacta. Los filamentos aparecían con extremidades glomerulares y fue imposible distinguir las clases anteriores. Estos cambios, especialmente los concernientes al tamaño de las redes, están relacionados con las variaciones cíclicas de penetrabilidad del moco cervical por el espermatozoide.

Bajo la influencia de los estrógenos las macromoléculas de glicoproteína del moco están orientadas de tal manera que los espacios entre ellas miden de 2 a 5  $\mu$ . En la fase de cuerpo lúteo, los espacios de la trama de macromoléculas se reducen poco a poco. Por tanto, en el momento del estro y de la ovulación, el gran tamaño de la malla,

permite el transporte de espermatozoides a través de la trama de filamentos y a través del conducto cervical (Hafez, 1987a).

El moco cervical ovino contiene glicoproteínas epiteliales que tienen una composición similar a las glicoproteínas aisladas del moco cervical bovino y humano (Roberts, 1976).

#### 2.3.2.2. Propiedades.

##### - Spinnbarkeit o elasticidad.

Es la capacidad de los semilíquidos de ser estirados en filamentos (Lindford, 1974), y refleja la estructura molecular del moco cervical (Adams, 1975). La medida de este parámetro puede hacerse simplemente separando el moco de un porta-objetos con un cubre-objetos y midiendo la longitud antes de la ruptura del filamento (Adams, 1977). Otra forma para determinarlo es mediante la ruptura de un tubo capilar lleno de moco, frente a una escala graduada hasta que el hilo de moco cervical se rompe (Kremer, 1965).

Este fenómeno se atribuye a las largas moléculas presentes en el moco cervical y depende de la longitud de las cadenas y de las fuerzas intermoleculares entre ellas (Vázquez, 1992). El incremento en la elasticidad del moco cervical aumenta la permeabilidad al paso del espermatozoide (Mehmood et al., 1991).

El spinnbarkeit está positivamente correlacionado con la orientación del espermatozoide (Adams, 1975) y a su vez existe una correlación positiva entre penetración espermática y fertilidad (Murase et al., 1990a).

-"Fering", arborización o cristalización.

Papanicolau en 1945 (citado por Pozo Lora, 1955) es el primero que observa el fenómeno de la cristalización y que ésta era muy típica en la máxima actividad folicular en torno a la ovulación.

Rydberg en 1948 (citado por De Vuyst et al., 1960), es quien realmente llama la atención sobre la importancia clínica de esta prueba y estudia su íntima relación con el estado hormonal.

El fenómeno de la cristalización ocurre particularmente al tiempo de la ovulación y ha sido usado para detectar la ovulación y como un índice del nivel de estrógenos circulantes. La cristalización del moco cervical ha sido observada en la vaca, oveja, cabra, yegua, coneja, primates y en la mujer.

El "ferming" aparece cuando se forman cristales de cloruro sódico o potásico alrededor de una pequeña y óptima cantidad (1-1,5%) de materia orgánica.

La arborización con formación de cristales no es específica del moco cervical y puede ocurrir en otras soluciones coloidales que contengan electrólitos. Si el contenido en proteína es demasiado alto (4-6%), como ocurre en el mucus durante la gestación, la cristalización no se produce.

Para observar la cristalización se realiza una extensión de moco sobre un porta-objetos y se deja secar al aire. Se puede observar a simple vista o sobre fondo oscuro. Un estudio completo se puede realizar a muy pocos aumentos.

El hecho de que la causa mediata de la cristalización esté determinada por las hormonas sexuales femeninas ha sido corroborado por casi todos los autores que se han ocupado del problema. Pozo Lora en 1955, comprobó en la vaca que la causa desencadenante de la cristalización era debida a la acción de los estrógenos, puesto que en la fase folicular la cristalización es más típica y extensa y culmina en el estro, fenómeno que se reproduce por la inoculación de estrógenos en la fase de anestro. La progesterona inhibe la cristalización, de donde se deduce la ausencia de cristalización típica en el anestro y gestación.

La causa inmediata de la cristalización está constituida por la composición química del moco estral. Rydberg (en De Vuyst, 1960) demostró que la "hoja de helecho" se forma por la presencia de cloruro sódico y mucina.

Pozo Lora (1955) confirma que el fenómeno de la cristalización del moco cervical de la vaca, a semejanza del mucus cervical humano, es un producto determinado por la acción de las hormonas sexuales femeninas sobre el metabolismo de los componentes del moco cervical, principalmente cloruro sódico y mucina. Su intensidad depende de la concentración del cloruro sódico y sus formas específicas de la relación de éste con la mucina y compuestos cristaloides.

De Vuyst et al. (1960), observaron que existía una correlación entre la hoja de helecho o el frotis observado y el análisis químico del moco cervical. La hoja de

helecho se observa cuando existe el contenido más bajo en materia seca, materia orgánica y cenizas, y en ese momento la materia seca tiene muchas más cenizas y menos materia orgánica que en cualquier otro momento del ciclo estral. Según este autor la hoja de helecho aparece cuando las células se ramifican y el moco está constituido principalmente por agua, sales minerales y mucoproteínas. La ausencia de hoja de helecho, con una imagen celular y arborizaciones groseras, coincide con un aumento de la materia seca, de la materia orgánica y en menor medida de las cenizas.

Otros estudios han demostrado que los espermatozoides tendrían óptimas condiciones para la penetración si el mucus tiene una materia seca de menos de un 5%. Si es mayor a un 7% la penetración espermática es pobre. Por tanto, la consistencia del moco al momento de la inseminación puede ser más importante que la cantidad (Selaive-Villaroel y Kennedy, 1983).

.- pH del moco cervical.

El pH del moco cervical es básico (sobre 8,4)(Hafez, 1987). Un moco ácido inmoviliza los espermatozoides, mientras que un pH alcalino estimula la motilidad. El pH óptimo para la migración y la supervivencia de los espermatozoides está entre 7 y 8,5 (Vázquez, 1992).

Los cambios óptimos en las propiedades del moco cervical, como un incremento en la cantidad, arborización y pH, y una disminución en la viscosidad y el contenido celular, ocurren durante el estro y la ovulación y se invierten durante la fase de cuerpo lúteo cuando se inhibe la penetración del semen en el cuello.

Las propiedades del moco cervical tienen valor clínico para:

- determinar el tiempo de la ovulación
- determinar el momento óptimo para la inseminación artificial
- reconocimiento de anovulaciones
- diagnóstico de gestación
- diagnóstico de disfunciones ováricas.

### **2.3.3. Efecto de los fitoestrógenos sobre el moco cervical.**

En 1946 Benetts et al., demostraron que la ingestión de fitoestrógenos podía ser una importante causa de infertilidad en las ovejas que pastaban trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum L.*).

Turbull et al. (1966) examinaron el transporte espermático y la supervivencia embrionaria en ovejas que habían pastado trébol rojo por 6 años, llegando a la conclusión de que la causa principal de la infertilidad observada en estas ovejas era la falta de fertilización debida a la ausencia de espermatozoides en las trompas de Falopio.

Lightfoot et al. (1967), compararon ovejas procedentes de un rebaño que había pastado sobre trébol subterráneo y presentaba la enfermedad del trébol y ovejas que habían pastado sobre avena. No encontraron diferencias en la actividad ovárica, pero si en el número de espermatozoides en los cervices de ambos lotes y por tanto el fallo en el transporte espermático fue la razón de la baja fertilidad en el rebaño con enfermedad del trébol.

Posteriormente Kaltenbach y Davies, (1970) investigan la causa de la infertilidad debida al consumo de fitoestrógenos en ovejas que habían pastado sobre distintas variedades de trébol subterráneo (con distinto contenido estrogénico) durante 5 años. Mediante laparotomía comprobaron el transporte espermático (realizando un lavado de los oviductos y contando el número de espermatozoides en el oviducto después de 22-26 horas del apareamiento), las tasas de fertilización (72 horas post-coito) y la supervivencia embrionaria a los 27-31 días. Observaron que una gran proporción de las ovejas que habían pastado sobre los cultivos de alta potencia estrogénica tenían un menor número de espermatozoides en el oviducto y la tasa de fertilización fue significativamente más baja que en las ovejas que estuvieron sobre cultivos con un bajo contenido estrogénico. No encontraron diferencias significativas en la supervivencia embrionaria entre los grupos. Consideran que una disminución en el transporte espermático es la principal causa del fallo reproductivo en las ovejas que han pastado sobre trébol subterráneo.

Smith (1971a), realizó un estudio sobre la producción de moco cervical en dos grupos de ovejas, un grupo control y otro grupo infértil con una historia previa de enfermedad del trébol. Observó que la producción de moco cervical en las ovejas infértiles era 1,5 veces mayor que en la fértiles. El incremento en el peso total del moco era casi enteramente debido a un incremento en el contenido líquido. Esto sugirió que un incremento en el peso del moco cervical era indicativo de una producción de moco más acuosa. La naturaleza más fluida del moco cervical puede resultar en una caída o fracaso de la anisotropía molecular del moco cervical (Odeblad, 1969 citado por Smith, 1971a). Esta ruptura afectaría la orientación y progresión de los espermatozoides dentro del cervix y también facilitaría el acceso de leucocitos a los espermatozoides.

Ya que el volumen de moco cervical parece estar controlado por el nivel de estrógenos circulantes, un incremento en la producción de moco en las ovejas infértiles podría ser debido a un incremento en la producción de estrógenos por el ovario y/o a un incremento de la sensibilidad del tracto reproductivo a los estrógenos (Smith, 1971b).

Croker y Shelton (1974) postularon que un excesivo contenido en humedad del moco cervical podría alterar la disposición de las micelas, manteniéndolas demasiado alejadas para permitir el alineamiento de los espermatozoides que es probablemente necesario para el establecimiento de una adecuada población de espermatozoides en el cervix.

Lindsay y Francis (1968), observaron que la producción de moco cervical en ovejas ovariectomizadas era función lineal de los estrógenos endógenos. Lightfoot et al. (1974), confirmaron los resultados previos sobre fallos del transporte espermático y reducida fertilidad en una experiencia llevada a cabo con dos grupos de ovejas, uno de los cuales tenía una reducida fertilidad debido a un prolongado pastoreo sobre trébol subterráneo. Sin embargo, la duración del celo en las ovejas afectadas fue normal. Los resultados podrían ser explicados si las ovejas de baja fertilidad debida a los fitoestrógenos tuvieran un alto nivel de producción de estrógenos, o alternativamente, si la sensibilidad cervical estuviera alterada. La primera sugerencia no tiene consistencia, puesto que la duración del celo, la cual está relacionada con la dosis de estrógenos, fue similar en ambos lotes.

Un importante hecho de sus resultados fue que algunas ovejas parecían ser resistentes al efecto de un prolongado pastoreo sobre pastos estrogénicos. Obts y Seamark (1971) sugirieron que la resistencia estaba relacionada con el tipo de

hemoglobina, aunque trabajos posteriores no han corroborado esos resultados (Lightfoot et al., 1974). Sugieren como una posible alternativa que la progesterona endógena, como resultado de sucesivas gestaciones, ofrezca una protección frente a los fitoestrógenos. Anteriormente Lindsay y Francis (1969) ya habían observado que la administración de progesterona inhibía la respuesta del moco cervical a los pastos estrogénicos.

Adams en 1976a comparó dos grupos de ovejas que habían pastado cultivos de alto y moderado contenido estrogénico con un lote control que no había sido alimentado con estas sustancias. Observó que el spinnbarkeit del moco cervical fue menor cuanto mayor era el contenido en fitoestrógenos. En un estudio posterior se comprobó que el moco cervical de ovejas ovariectomizadas tratadas con 100  $\mu\text{g}$  de benzoato de estradiol tenía un bajo spinnbarkeit (Adams y Tang, 1979) y parece ser análogo al bajo spinnbarkeit visto en el moco cervical de mujeres hiperestrogénicas y en ovejas después de un pastoreo prolongado en pastos estrogénicos.

Adams y Tang (1986) realizaron una experiencia administrando distintas dosis de benzoato de estradiol a dos grupos de ovejas ovariectomizadas, uno de los cuales había pastado sobre trébol subterráneo durante tres años y era infértil. La cantidad de moco cervical en las ovejas control se incrementó con dosis crecientes de benzoato de estradiol, mientras que el máximo spinnbarkeit del moco ocurrió a una dosis intermedia de benzoato de estradiol; por el contrario, ni la cantidad ni el spinnbarkeit varió con la dosis de estrógeno en las ovejas infértiles. Cuando las ovejas se trataron con dosis repetitivas de benzoato de estradiol la producción de moco declinó en el grupo control después del 5º día, pero no fue detectado ningún cambio en las afectadas. Por tanto, ni la cantidad ni la duración de la estimulación estrogénica afectó al moco cervical

producido por las ovejas con enfermedad del trébol. Estos animales produjeron más moco que los controles en ausencia de estimulación estrogénica. Parece que esto es debido a una producción autónoma de moco cervical. El spinnbarkeit no se incrementó porque la capacidad del cervix para responder a los estrógenos está disminuida.

Esto había sido postulado por el mismo autor (Adams, 1976a) sugiriendo que la infertilidad de las ovejas afectadas por la enfermedad del trébol era debida a una incapacidad de los órganos diana a dar una respuesta continuada a los estrógenos, y por tanto, los estrógenos endógenos son incapaces de preparar al cervix para producir un mucus con un spinnbarkeit normal en el estro.

Los casos de infertilidad casi siempre van acompañados de cambios morfológicos en el cervix: pliegues más cortos y con mayor cantidad de estroma, incremento de la cantidad de lámina propia bajo los pliegues, alteración de la lámina propia con presencia de glándulas tubulares y el endocervix llega a parecerse al endometrio (Adams, 1986).

Valderrábano et al. (1988) encontraron en el epitelio del cervix de ovejas alimentadas con alfalfa una hiperplasia de las células secretoras del cervix y una modificación de la composición química del moco cervical, con una prevalencia de mucopolisacáridos neutros lo que sugiere una disminución en la cantidad de radicales ácidos, lo que ha sido relacionado con una disminución en la viscosidad del mucus cervical (Hamana et al., 1971), dificultando el transporte espermático (Barberan et al., 1990).

#### **2.4. ALTERACIONES HORMONALES ASOCIADAS AL CONSUMO DE FITOESTROGENOS.**

Muchos estudios sobre el efecto de los fitoestrógenos se han concentrado únicamente en los cambios en el tracto reproductor. No obstante, hay indicaciones de que también interfieren en los mecanismos de feed-back envueltos en la liberación de gonadotropinas uniéndose competitivamente a los receptores de estradiol de la hipófisis y el hipotálamo (Mathieson y Kitts, 1980).

Adams (1976b) observó en ovejas ovariectomizadas unilateralmente y afectadas por fitoestrógenos que el ovario remanente no sufría una hipertrofia ovárica compensadora, lo cual implica que existe una alteración en el balance hormonal del eje hipotálamo-hipófisis.

Por tanto, alguno de los efectos de los fitoestrógenos sobre la función ovárica parecen ser el resultado de acciones indirectas sobre la secreción de hormonas gonadotrópicas (Fredricks et al., 1981).

En este contexto, se han propuesto para los fitoestrógenos acciones agonistas y antagonistas del estradiol 17- $\beta$ , dependiendo tales acciones de la dosis ingerida (Leavitt y Wright, 1965; Folman y Pope, 1966).

### 2.4.1. Gonadotropinas.

Estudios sobre la liberación de LH después de un tratamiento con estradiol 17- $\beta$  en ovejas ovariectomizadas han demostrado que el hipotálamo de ovejas afectadas por fitoestrógenos tiene una sensibilidad reducida a la estimulación por el estradiol 17- $\beta$  y no se produce un pico normal de LH en respuesta a la estimulación estrogénica (Findlay et al., 1973).

Esta reducida respuesta del eje hipotálamo-hipófisis al estradiol 17- $\beta$  podría estar relacionada con cambios en el número o afinidad o ambos, de los receptores citoplasmáticos del estradiol 17- $\beta$  en la hipófisis (Tang y Adams, 1978a).

Si un pastoreo prolongado en pastos estrogénicos causa una menor respuesta del eje hipotálamo-hipófisis al estradiol 17- $\beta$ , entonces los niveles plasmáticos basales de gonadotropinas podrían ser más altos que los normales, debido a una reducción en el efecto de feed-back negativo del estradiol (Scaramuzzi et al., 1971b).

Hearnshaw et al., (1977), demostraron que la ingestión de trébol estrogénico provoca un incremento agudo en la concentración de LH en ovejas ovariectomizadas. Hettle y Kitts (1983), observaron que la concentración que correspondía al pico de LH era mayor en ovejas que consumían alfalfa estrogénica que en ovejas controles, aunque el pico ocurría más tarde en las ovejas que consumían fitoestrógenos.

El incremento en LH estimularía al ovario para secretar más estradiol y se establecería un nuevo equilibrio en el cual fueran producidos altos niveles plasmáticos de gonadotropinas y estradiol (Rodger et al., 1980).

Los datos sugieren, por tanto, que los fitoestrógenos actúan a nivel del SNC y de la hipófisis alterando la secreción de gonadotropinas (Kaldas y Hughes, 1989).

Tanto en ovejas ovariectomizadas (Montgomery et al., 1985) como en ovejas enteras (Adams, 1981) afectadas por la enfermedad del trébol, la mejor explicación para el daño en la secreción de gonadotropinas fue una acción SNC/hipotálamo. En particular, en ovejas afectadas, el pico de LH podría no ser logrado por la administración exógena de estradiol 17- $\beta$  (consistente con la pérdida del feed-back positivo), pero la secreción de LH en respuesta a la GnRH exógena fue normal (Adams, 1981), sugiriendo un efecto no hipofiseal.

Sin embargo, trabajos más recientes han demostrado que una exposición aguda a fitoestrógenos (coumestrol y genisteína) alteraban la liberación de LH inducida por GnRH en ratas ovariectomizadas, sugiriendo que la hipófisis es también un lugar de acción de los fitoestrógenos (Hughes, 1988b).

#### **2.4.2. Interacción entre los efectos reproductivos de los fitoestrógenos y el fotoperíodo.**

El mecanismo regulador de la función reproductiva se encuentra a nivel de hipotálamo en el generador de pulsos; este a su vez mediatiza su secreción de GnRH a través del "feed-back" de los esteroides gonadales, con lo cual cierra su ciclo, y esto finalmente se traduce en que las variaciones estacionales afectan a la pulsatilidad de la LH (López- Sebastián, 1989a).

Durante la fase luteal del ciclo, la LH se segrega a pulsos de baja frecuencia, no superiores a un pulso cada 3-4 horas. En este momento la progesterona actúa como un inhibidor de la secreción de LH. Cuando se produce la luteolisis, los pulsos se incrementan, pudiendo llegar a alcanzar una frecuencia de un pulso cada hora, lo que provoca un mayor estímulo en el desarrollo folicular, alcanzándose el estadio de folículo preovulatorio; éste, mediante su alta secreción de estradiol, da lugar a la descarga preovulatoria de LH por un efecto de feed-back positivo sobre el hipotálamo e hipófisis (Karsch, 1984). Así, la transición de unas épocas de anoestro a otras de actividad reproductiva, se basa en las variaciones de la sensibilidad del hipotálamo al feed-back negativo que ejerce el estradiol sobre la secreción de GnRH.

Durante el período de transición de días cortos a días largos, los cambios en el fotoperíodo se traducen en un incremento de la sensibilidad del hipotálamo a los esteroides gonadales; el aumento de esta sensibilidad cuando se produce el último ciclo de la estación favorable provocará que los propios incrementos en el nivel de estradiol anulen la descarga preovulatoria de LH. Cuando se produce la transición hacia la estación favorable, la potencia del estradiol como inhibidor de la LH disminuye y se establece de nuevo la ciclicidad. Por tanto, cuando la respuesta al estradiol es baja, el nivel de secreción de LH permite el mantenimiento de la ciclicidad, mientras que cuando la respuesta es alta, la actividad cíclica se suprime (López-Sebastián, 1989a).

La progesterona y el estradiol modulan la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH. El estradiol disminuye la amplitud de los pulsos pero no la frecuencia, así como la elevación del pico de LH resultado de la administración de GnRH, mientras que la progesterona disminuye la frecuencia de los pulsos de LH sin reducir su amplitud o la respuesta a la GnRH (Goodman y Karch, 1980), así mismo, el estradiol contribuye a

incrementar la frecuencia de los pulsos durante la fase folicular del ciclo (Karsch et al., 1983).

Durante la estación reproductora, un incremento en la concentración de coumestrol en la dieta resultó en una disminución en la amplitud de los pulsos de LH, pero no afectó la frecuencia de los pulsos o la concentración de FSH. Este descenso que se observa con un incremento de la concentración de coumestrol en la dieta es consistente con el efecto del estradiol durante la estación reproductora (Montgomery et al., 1985).

Se han estudiado las interacciones entre los efectos reproductivos de la exposición a fitoestrógenos y el fotoperíodo. En ovejas normales y enteras, la frecuencia de los pulsos de LH y las concentraciones plasmáticas de LH son más altas durante la estación reproductora que durante el anoestro. En ovejas afectadas por la enfermedad del trébol, la frecuencia de los pulsos de LH y la concentración de LH durante la estación reproductora son cercanas a las de ovejas normales. En contraste, durante el anoestro, estos parámetros se mantienen al mismo nivel que en estación reproductora en las ovejas afectadas (Chamley et al., 1981; 1985), demostrando una disminución en la sensibilidad del hipotálamo al feed-back negativo del estradiol.

Así, durante el anoestro, los niveles medios de LH fueron más bajos en ovejas normales que en afectadas [ $0,45 \pm 0,41$  (n=31) versus  $0,82 \pm 0,73$  (n=48) ng/ml  $P<0,01$ ], mientras que en estación reproductora el nivel medio de LH se elevó a  $1,23 \pm 0,65$  ng/ml (n=76), pero no hubo ningún cambio en las ovejas afectadas por la enfermedad del trébol (Chamley et al., 1981).

### 2.4.3. Estrógenos.

Los problemas causados por los estrógenos de origen vegetal se deben a su elevada concentración en el plasma sanguíneo de los animales que ingieren las plantas, comparada con la de estrógenos endógenos (Valderrábano, 1992). A concentración elevada, un estrógeno vegetal débil puede ejercer en el animal un efecto importante y producir un desequilibrio hormonal (Mathieson y Kitts, 1980) aunque su actividad sea sólo de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  veces la del estradiol.

Los estrógenos vegetales pueden actuar como antiestrógenos compitiendo, al unirse con las proteínas receptoras de los tejidos sensibles al estrógeno, con los estrógenos endógenos más activos que se encuentran en una proporción mucho menor en el plasma sanguíneo (Shutt y Cox, 1972; Shemesh et al., 1972; Newsome y Kitts, 1977).

Newsome y Kitts (1977), en un estudio sobre los efectos de los fitoestrógenos de la alfalfa (principalmente coumestrol y genisteína) sobre los niveles de estrógenos endógenos en ovejas, observaron que las ovejas controles tenían más altos y más variables niveles plasmáticos de estrógenos endógenos que las ovejas que comieron alfalfa, sugiriendo que la estimulación del ovario por las gonadotropinas está reducida por la presencia de fitoestrógenos en el plasma.

#### **2.4.4. Progesterona.**

En condiciones normales, los niveles de progesterona comienzan a elevarse a partir del tercer día del ciclo, incrementándose hasta los días 8-9 y manteniéndose aproximadamente durante 5 días, declinando sobre los días 14-15, para alcanzar un bajo nivel sobre el día antes del estro (Thorburn et al., 1969).

Después de la ovulación, el cuerpo lúteo formado comienza a segregar progesterona, siendo esta la responsable de la preparación del útero para la anidación y el mantenimiento posterior del embrión, hasta aproximadamente el día 60 de gestación, cuando la secreción de progesterona de origen placentario es capaz de soportar por si misma la gestación (López Sebastián, 1989b).

Los resultados de los estudios sobre la producción de progesterona en ovejas que ingieren fitoestrógenos, muestran una importante diferencia endocrinológica entre los dos tipos de infertilidad, temporal y permanente, de tal manera que la forma temporal está marcada por un cambio en la producción de progesterona, lo que no ocurre en la permanente.

En este sentido, Obst y Seamark (1970; 1975), en un estudio realizado con ovejas que presentaban infertilidad temporal, observaron que el período de función del cuerpo lúteo (determinado por la concentración de progesterona en plasma periférico) era de 2 a 3 días más corto en ovejas sobre pastos estrogénicos que en las controles, siendo las concentraciones aproximadamente iguales hasta el día 12 del ciclo cuando la progesterona en el grupo estrogénico cayó a los niveles del estro. Esta alteración en

la función del cuerpo lúteo ha sido observada también por otros autores (Hearnshaw et al., 1972; Adams et al., 1981).

Sin embargo, no se encuentran diferencias entre los niveles de producción de progesterona entre ovejas controles e infértiles con tipo permanente de infertilidad debida a la ingestión de fitoestrógenos (Smith, 1975).

En cuanto a las concentraciones de progesterona durante la gestación, varios estudios indican que los niveles son similares a los de ovejas controles hasta aproximadamente el día 90 de gestación, a partir del cual, los niveles de progesterona en ovejas que ingieren fitoestrógenos son significativamente más bajos (Obst et al., 1972; Obst y Seamark, 1975).

Por tanto, los resultados sugieren que cuando se establece la gestación, la función luteal no está afectada por la ingestión de fitoestrógenos, sin embargo, en el último tercio de la gestación, la ingestión de fitoestrógenos parece reducir los niveles de progesterona plasmática (Obst y Seamark, 1971).

## **2.5. ALTERACIONES ANATOMOPATOLOGICAS ASOCIADAS AL CONSUMO DE FITOESTROGENOS.**

### **2.5.1. Lesiones anatomopatológicas asociadas a la forma permanente de infertilidad.**

#### 2.5.1.1. Aparato reproductor.

##### -Ovario.

Kelly et al. (1976a), describieron anormalidades foliculares en los ovarios de ovejas que consumían pellets de alfalfa con un contenido en coumestanos de 1000 ppm. Observaron un mayor número de folículos, en algunos de ellos la formación antral fue deficiente y muchos tenían signos de atresia temprana. La rete ovárica pareció ser más activa que en las controles y el lumen contenía más células desprendidas. Las muestras histológicas del ovario indicaron que su estructura folicular era anormal y similar a la encontrada cuando los ovarios se someten a una excesiva cantidad de estrógenos exógenos (Goldenberg et al., 1972).

Adams (1976b), describe cambios ováricos similares a los observados en animales con exceso de estrógenos (Goldenberg et al., 1972), con un número excesivo de folículos de talla media y pequeña, en muchos de los cuales la formación antral era deficiente. Estas anormalidades estaban acompañadas por una atresia temprana de los folículos, observando un desarrollo folicular anormal y una hiperplasia de la rete ovárica.

Se han descrito anormalidades en la ovulación que pueden ser debidas a acciones directas de los fitoestrógenos sobre el ovario. Así, la administración de sitosterol a ovejas inhibió el desarrollo folicular (El Samannoudy et al., 1980). Se observó que los folículos mostraban degeneración con hemorragias intrafoliculares y desarrollo de ovocitos con inclusiones lipídicas.

Por otra parte, la actividad de dos enzimas ováricas parece estar influenciada por los fitoestrógenos. Bajas dosis de fitoestrógenos inhiben la 17,20 liasa en las células de la granulosa de los bóvidos (Kaplanski et al., 1981) lo que podría alterar la capacidad de esteroidogénesis del folículo o del cuerpo lúteo y por otro lado, la fosfatasa alcalina en los ovarios está afectada por la exposición a fitoestrógenos (El Samannoudy et al., 1980).

Los ovarios de las ovejas sometidas a una dieta de alfalfa durante nueve meses, presentaban un peso significativamente menor que un grupo control sobre rye-grass (Barberan et al., 1990). Los ovarios eran más pequeños (tanto en peso como en longitud), aunque no encontraron diferencias en la actividad ovárica ni lesiones histopatológicas significativas.

Así mismo, se ha descrito la presencia de quistes intraepiteliales en el oviducto (Adams, 1976c; Barberan et al., 1990).

-Útero.

Un pronunciado efecto de los fitoestrógenos es un incremento del peso uterino (Bennetts et al., 1967; Kelly et al., 1976b).

En ovejas con infertilidad debida a una prolongada exposición a pastos estrogénicos hay un marcado incremento en la actividad de algunas enzimas uterinas, así como en la síntesis de proteínas y glicoproteínas (Tang y Adams, 1981; 1986).

Estas observaciones indican que el aumento de peso uterino es debida a una hipertrofia más que a un simple edema. Al mismo tiempo los bajos niveles de lípidos en el útero sugieren una inhibición de la síntesis o un incremento de la utilización de los lípidos dentro de éste órgano (El Samannoudy et al., 1980). Por tanto, los fitoestrógenos pueden afectar a diferentes enzimas en distinta forma, estimulando la actividad de algunas mientras bloquean la acción de otras (Kaldas y Hughes, 1989).

La infertilidad inducida por los fitoestrógenos o por los estrógenos sintéticos está asociada con la hiperplasia quística glandular del endometrio (Barret et al., 1965) y existe una relación entre severidad de ésta lesión e infertilidad (Underwood et al., 1959; Davies y Nairn, 1964).

Barret (1965), sugiere un mecanismo por el cual la hiperplasia puede causar esterilidad. Los quistes endometriales incrementan su número y tamaño hasta un punto que es incompatible con la supervivencia del feto posiblemente por una disminución en la eficacia de los cotiledones.

Rizzoli y Moran, (1977), observaron cambios histopatológicos en la mucosa uterina relacionados con una prolongada ingestión de trébol altamente estrogénico. La lesión era una hiperplasia endometrial correspondiente a un hiperestrogenismo. El aumento de espesor endometrial fue consecuencia de una hipertrofia glandular en las áreas intercarunculares. Las glándulas eran anchas y tortuosas y el epitelio tenía varias capas de células columnares dispuestas desordenadamente. El estroma estaba marcadamente edematoso y con una proliferación del tejido conectivo caruncular.

En corderas sometidas a un pastoreo de alfalfa durante nueve meses se ha observado edema periglandular y miometral, endometritis subaguda con neutrofilia e infiltración linfocítica de la lámina propia y partículas necróticas intraepiteliales (Valderrábano et al., 1988; Barberan et al., 1990).

Otras alteraciones descritas son hidropesía uterina (Turnbull et al., 1966; Adams et al., 1981), y una alta incidencia de piometras (Turnbull, 1966; Fels y Neil, 1968). Esta mayor incidencia de piometras es debida a que el hiperestrogenismo causa un daño funcional en el cervix permitiendo el paso de bacterias al útero (Fels y Neil, 1968).

Los síntomas más espectaculares de infertilidad permanente debida a un prolongado consumo de pastos estrogénicos son el prolapso uterino y la distocia (Clark, 1965), aunque han declinado en incidencia.

La patogénesis de la distocia no es bien conocida. Bennetts et al. (1946) sugirieron que la distocia resultaba de una inercia uterina primaria, sin embargo,

Maxwell (1970), sospechó que la distocia era debida a un fallo en la dilatación de la vulva y que la inercia uterina era secundaria.

Gardiner y Nairn, (1969), observaron en ovejas con enfermedad del trébol que el prolapso uterino estaba asociado con el stress y la hiperplasia de las glándulas adrenales.

Adams y Nairn, (1983), en una experiencia para definir las características de la distocia en dos rebaños de ovejas expuestos a pastos altamente estrogénicos, encontró también un aumento de tamaño de las adrenales, eliminando la teoría de Bennetts al no encontrar evidencias directas de una inercia uterina primaria, observando además esfuerzos expulsivos indicados por la ruptura del útero y separación de la pelvis, y lesiones y edemas en los corderos, unido a una falta de dilatación del cervix.

#### -Cervix.

Los cambios más severos debidos al consumo de fitoestrógenos ocurren a nivel del cervix.

Los pliegues cervicales se hacen más anchos y llegan a fusionarse, hay un incremento en la cantidad de lámina propia que además presenta un mayor contenido celular (Adams, 1986) y se observa un desarrollo de glándulas tubulares similares a las glándulas uterinas (Heydon y Adams, 1977).

En ovejas normales, la parte caudal del cervix está revestida con un epitelio escamoso estratificado y la parte craneal contiene células ciliadas (Lightfoot y Adams, 1979). En ovejas sometidas a una exposición prolongada a fitoestrógenos hay una escasa proporción de epitelio escamoso estratificado y aparece una capa simple de células columnares (Lightfoot y Adams, 1979).

En función de todos estos cambios, parece que la exposición crónica a plantas estrogénicas estimula la transformación del cervix hacia una estructura de tipo uterino, tomando una apariencia de endometrio (Adams, 1986).

Cambios similares se producen en otras especies al administrar estrógenos durante la organogénesis (Forsberg, 1969). Después del período de organogénesis el papel arquitectural de los estrógenos normalmente se pierde (Adams, 1990), aunque parece que la oveja tiene una habilidad para manifestar una respuesta morfológica al estradiol durante la vida adulta (Adams, 1986). Sin embargo, Chilton et al., (1980) encontraron que los estrógenos juegan un papel significativo en el mantenimiento de la citoarquitectura y actividad de biosíntesis del epitelio endocervical.

En ovejas sometidas a fitoestrógenos se incrementa la síntesis de proteínas y glicoproteínas (Tang y Adams, 1978b) y el número de receptores para estrógenos en el cervix. Así, los estrógenos exógenos no solo ocupan los lugares de unión disponibles, sino que además estimulan la producción local de más sitios de unión (Tang y Adams, 1978a). Este hecho hace a los tejidos más sensibles a la acción estrogénica y por tanto si la exposición a estrógenos continua, las alteraciones cervicales pueden llegar a ser muy exageradas (Kaldas y Hughes, 1989).

Se han descrito también alteraciones a nivel del epitelio vaginal, con una mayor queratinización y síntesis queratohialina en las capas parabasales (Barberan et al., 1990), y un fallo en la respuesta a la estimulación estrogénica (Adams, 1976a).

Otros cambios observados sugieren que los fitoestrógenos afectan la diferenciación sexual en ovejas afectadas. Los genitales externos se masculinizan (Adams, 1990), con un incremento en la cantidad de tejido sobre el clítoris, resultando en un estrechamiento del orificio vaginal. También se ha observado un incremento en la longitud del clítoris. Es posible que las isoflavonas tengan una ligera actividad androgénica en adicción a su efecto estrogénico. Una explicación alternativa puede ser el incremento en tamaño y función de la glándula adrenal en ovejas expuestas a estos pastos, ya que los andrógenos secretados por una glándula adrenal anormal son una causa de virilización.

El prolapso uterino está relacionado con otra manifestación de la enfermedad del trébol, conocida como "high-tail" (Adams, 1976c), en la cual la base de la cola parece estar elevada debido a una rotación de la pelvis. es el resultado de una relajación de los ligamentos pelvianos y de una pérdida de la tensión normal o firmeza de los tejidos en la región pelviana (Beck y Gardiner, 1965).

En cuanto a los machos, la fertilidad y la producción de semen en moruecos que han estado consumiendo pastos estrogénicos durante varios años no parecen afectadas. Sin embargo, los carneros presentan un aumento de tamaño de los pezones y en ocasiones puede haber producción de leche (Braden et al., 1964; Millington et al., 1964 a y b).

La glándula bulbouretral y las vesículas seminales presentan un ligero aumento de peso con el pastoreo prolongado de forrajes estrogénicos que parece ser debido a la acumulación de secreción en las luces de los adenómeros y/o conductos excretores (Barberan y Valderrábano, 1989).

Las plantas estrogénicas producen un incremento del estroma fibroso de las vesículas seminales similar al causado por el dietilestilboestrol (Noteboom et al., 1961).

#### 2.5.1.2. Otras alteraciones

El ganado ovino mantenido sobre pastos estrogénicos, en particular trébol subterráneo, o animales inyectados o implantados con estrógenos, pueden presentar una incidencia de obstrucciones urinarias fatales de hasta un 10%.

La hipersecrección y descamación de células epiteliales observada en las glándulas accesorias (Barberan y Valderrábano, 1989), junto con la producción de sedimentos, conteniendo fitoestrógenos, en los riñones (Nottle y Beck, 1974), es la causa principal de la obstrucción del proceso uretral (Jubb et al., 1985).

Se han encontrado también alteraciones morfológicas en las glándulas tiroides y adrenales, que presentan un aumento de tamaño (Gardiner y Nairn, 1969; Hearnshaw et al., 1972; Ramón, 1987), y en la glándula mamaria, que presenta gran desarrollo glandular y actividad secretora en corderas vacías (Valderrábano et al., 1988; Ramon et al., 1987).

Así mismo, se han descrito también alteraciones a nivel del sistema nervioso central. Gardiner y Nairn, (1969), encontraron hiperplasia neuronal y astrogliosis en el hipotálamo de ovejas que pastaban trébol estrogénico. hipófisis.

Faber y Hughes, (1991), han demostrado que la exposición en etapas tempranas del desarrollo a estrógenos medio-ambientales, altera la respuesta post-puberal de la hipófisis a la GnRh y androgeniza el núcleo de diferenciación sexual.

## **2.6. MEDIDAS DE CONTROL.**

En los pasados 30 años, el control de la enfermedad del trébol ha estado basado principalmente en medidas agronómicas, entre ellas las dirigidas a sustituir las especies de más actividad estrogénica por otras variedades libres de fitoestrógenos.

La aplicación continua de fertilizantes de fosfato ha ayudado a prevenir la acumulación de formononetina en los pastos (Rossiter, 1970).

Otras medidas alternativas para controlar los efectos en los animales derivados del consumo de forrajes fitoestrogénicos incluyen:

- Selección genética de ovejas resistentes a la enfermedad del trébol (Croker et al., 1989):

Parece que hay animales resistentes a la enfermedad del trébol (Lightfoot, 1974) y que este tipo de resistencia está asociada al tipo de hemoglobina (Obst y Seamark, 1971), aunque éste punto no parece estar muy claro.

.- Alteración del metabolismo de los fitoestrógenos en el animal (Cox y Braden, 1974), mediante la manipulación de los microorganismos del rumen para obtener formas que metabolicen los estrógenos vegetales hacia otros compuestos menos activos.

.- Inmunización frente a los fitoestrógenos:

Se ha demostrado que los animales pueden ser inmunizados contra los fitoestrógenos (Bauminger et al., 1969). Se han conseguido anticuerpos específicos contra los fitoestrógenos inmunizando animales contra derivados fitoestrogénicos conjugados a polipéptidos sintéticos o a seroalbúmina bovina (Cox et al., 1972). Concretamente ha sido posible bloquear la acción de la genisteína o del equol, estimada mediante la respuesta uterina a la relación RNA/DNA (una respuesta típica de los estrógenos) que se mantuvo mucho más débil en animales inmunizados. Sin embargo, los efectos estrogénicos sobre el útero no se vieron reducidos cuando las ovejas inmunizadas se mantuvieron sobre pastos estrogénicos. A pesar de los elevados títulos de anticuerpos encontrados en las ovejas inmunizadas, el peso del útero fue mucho mayor que el de ovejas mantenidas sobre pastos no estrogénicos. La falta de protección de las ovejas inmunizadas en el pasto puede haber sido debida a una incapacidad de los anticuerpos para neutralizar las grandes cantidades de estrógenos derivados de las plantas durante el período de exposición (Cox et al., 1984).

La posibilidad de inmunizar animales contra estrógenos vegetales se halla en un estado avanzado de desarrollo y muestra el camino hacia métodos de reducir otros trastornos en los animales de pastoreo debidos a constituyentes vegetales (Valderrábano, 1992). La inmunización contra esteroides, resuelve en parte, la reducción de la fecundidad resultante de la ingestión de coumestanos aunque no ha sido efectiva contrarrestando los efectos de las isoflavonas cuando los animales pastaban trébol en la cubrición (Little et al., 1984).

***MATERIAL  
Y METODOS***

### **3.- MATERIAL Y METODOS.**

#### **3.1.- EXPERIENCIAS:**

Todas las experiencias se han llevado a cabo en la finca "El Encin", perteneciente al Servicio de Investigación Agraria de la Comunidad de Madrid y situada en el término municipal de Alcalá de Henares. La finca se encuentra en el Km. 38 de la carretera Nacional II, a 40°31' de latitud Norte, 3°7' de longitud oeste y a una altitud aproximada de 610 m. s.m. Según la clasificación bioclimática de Gaussen, el clima de dicha finca puede considerarse como "templado medio", los inviernos son moderados con temperaturas medias del mes más frío de 5,1°C. La precipitación media anual es de 470 mm. distribuidos entre otoño y primavera.

#### **3.1.1.- EXPERIENCIA 1ª.- OTOÑO DE 1991.**

##### **Animales:**

Se controlaron un total de 28 ovejas distribuidas en dos grupos:

- Grupo problema: constituido por 14 ovejas de raza Manchega. Eran ovejas adultas, secas, con un peso medio de 50 Kg al inicio de la experiencia y un período de post-parto previo de cinco meses. Este grupo se introdujo en parcelas de alfalfa "Tierra de Campos" de 1 Ha. aproximadamente, donde pastaron hasta el final de la tercera experiencia (un período de un año), controlándose en esta primera experiencia durante un período de 2 meses.

- Grupo control: constituido por 14 ovejas de raza Manchega. Eran ovejas adultas, secas, con un peso medio de 50 Kg al comienzo de la experiencia y un período de post-parto previo de cinco meses. Este grupo se mantuvo en semiestabulación, en una nave con una superficie de aproximadamente 1 m<sup>2</sup>/oveja y un

parque exterior de ejercicio de 2 m<sup>2</sup>/oveja. La alimentación estuvo compuesta de cebada (200 gr/animal/día) y una ración de volumen a base de heno de veza-avena (550 gr/animal/día) y paja de cereal (550 gr/animal/día). Para el racionamiento de los animales se siguieron las recomendaciones del INRA (1988).

El agua, bloques de sal y correctores vitamínicos minerales se encontraron a libre disposición de los animales.

Previamente al inicio de la experiencia todos los animales fueron desparasitados y se observó que ciclaban normalmente mediante la introducción de machos enmandilados.

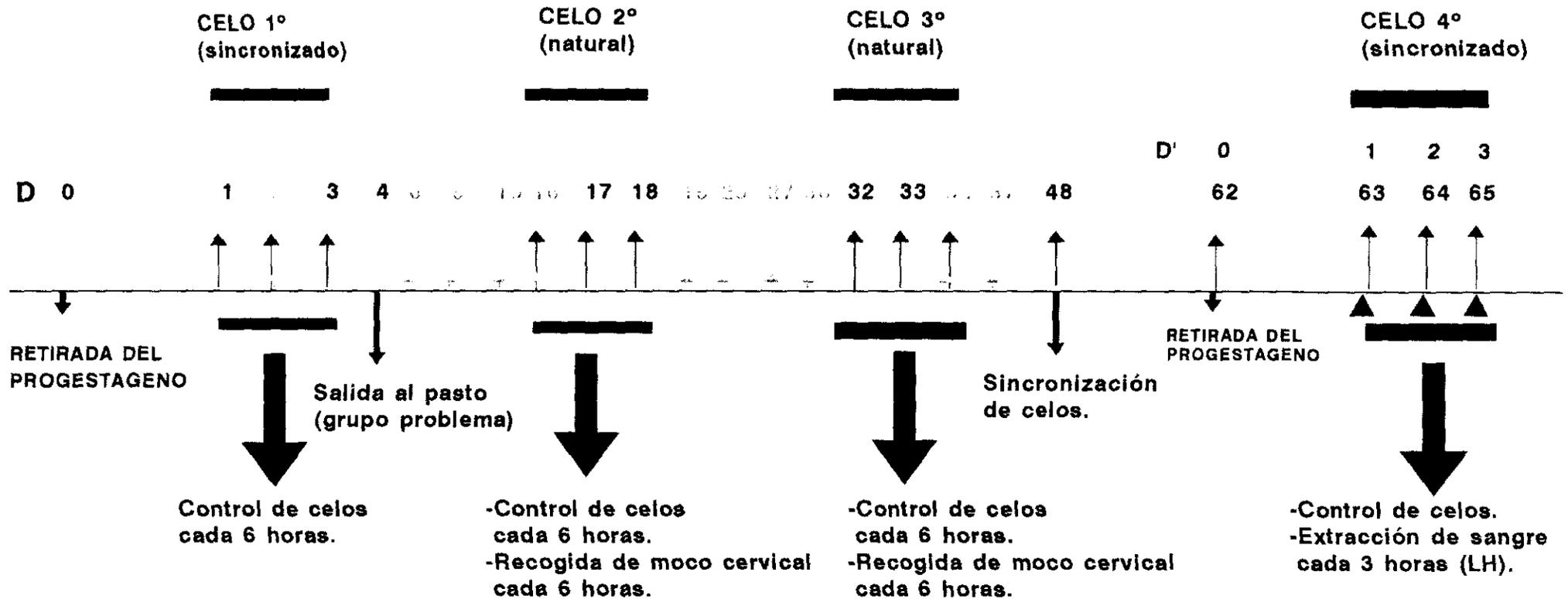
### **Diseño experimental:**

#### **3.1.1.1.- Control de los celos y recogidas de moco cervical.**

Al inicio de la experiencia y con el fin de agrupar los celos, se colocaron esponjas intravaginales de 30 mg. de FGA (Chronogest, Intervet). A los 14 días se retiraron las esponjas y a las 24 horas de la extracción de la esponja comenzó la detección de celos con machos enmandilados (1 morueco por cada 7 ovejas), y se realizó la observación y recuento de ovejas en celo cada 6 horas, hasta 72 horas después de la retirada del progestágeno. De las 28 ovejas salieron en celo 12 en cada grupo, puesto que alguna perdió la esponja y otras no manifestaron síntomas de celo.

Después de la detección de celos, el grupo problema salió a las parcelas de alfalfa.

# PRIMERA EXPERIENCIA.- OTOÑO 1991



D: Días desde la extracción de la primera esponja.

D': Días desde la extracción de la segunda esponja.

▲ Extracciones de sangre para medir LH (cada 3 h.)

† Extracciones de sangre para medir progesterona

Los dos grupos de animales se controlaron durante los dos celos siguientes, que fueron naturales, y se siguió la metodología descrita por Selaive-Villaruel y Kennedy (1983): en los días previstos de presentación del celo, se introdujeron los machos enmandilados en cada grupo (1 morueco por cada 6 ovejas). Los signos de celo se observaron cada 6 horas desde las 9:00 hasta las 21:00 y hasta el final del celo.

El moco cervical se comenzó a recoger nada más evidenciado el estro, y a partir de entonces cada 6 horas hasta el final del celo.

Para la toma de moco cervical, se examinó el cervix con un espéculo vaginal después de limpiar la vulva. El moco cervical se aspiró con una pipeta graduada (5 ml.) mediante una pera de aspiración.

Después de la recogida, se introdujo en criotubos (Nunc Cryotubes) y se mantuvo congelado en nitrógeno líquido hasta su análisis, puesto que la congelación del moco cervical en nitrógeno líquido no afecta a su estructura (Murase y Braun, 1990).

Las determinaciones realizadas sobre el moco cervical fueron: volumen, spinnbarkeit, grado de arborización, presión osmótica y penetración espermática, y se describen en el apartado de análisis del moco cervical.

#### **3.1.1.2.- Recogida de muestras de sangre.**

En ambos grupos de ovejas se recogieron muestras de sangre dos días por semana desde la extracción de la esponja hasta el final de la experiencia para determinar las concentraciones plasmáticas de progesterona.

Además, pasadas dos semanas desde el último celo natural, se volvieron a colocar esponjas para determinar el pico preovulatorio de LH, en ambos grupos, tomándose como referencia para iniciar las recogidas de sangre el momento de la extracción de la esponja. Se tomaron muestras de sangre cada tres horas desde 24 horas después de la extracción de la esponja hasta 24 horas después de la salida en celo.

La toma de muestras de sangre se realizó por punción en la vena yugular, recogándose en tubos de 5 ml. con heparina sódica y a vacío (Vacutainer), siendo centrifugada inmediatamente a 3.500 r.p.m. durante 20 minutos y almacenado el plasma en tubos de poliestireno cerrados herméticamente, que permanecieron en congelador a -20°C hasta el momento del análisis.

La determinación de las concentraciones de LH y progesterona se realizó siguiendo las técnicas de análisis radioinmunológico que se describen en el apartado correspondiente a análisis hormonales.

### **3.1.1.3.- Toma de muestras del pasto.**

Las ovejas del grupo problema se sometieron a un pastoreo rotacional en 7 parcelas de alfalfa "Tierra de Campos", de aproximadamente 1 Ha., divididas mediante pastor eléctrico.

Con el fin de estimar la disponibilidad de alfalfa, en cada una de las parcelas donde las ovejas pastaron, se cortaron 10 muestras del pasto de 0,1 m<sup>2</sup> de superficie, obtenidas mediante el lanzamiento de un marco de 0,33 cm. de lado (aproximadamente 0,1 m<sup>2</sup>), siguiendo un recorrido predefinido.

En el laboratorio se separaron manualmente las muestras, diferenciándose entre malas hierbas y alfalfa. Las muestras se secaron en estufa a 85°C durante 48 horas, para obtener M.S.

Seguidamente, las muestras se molieron en un molino Culatti, al que se adaptó un tamiz de 1 mm. para homogeneizar la muestra. Posteriormente se almacenaron hasta su análisis. La técnica empleada para determinar el contenido en coumestrol de la alfalfa se describe en el apartado de análisis del contenido en coumestrol de la alfalfa, realizándose también análisis de las malas hierbas así como de la dieta del grupo control y de los pellets de alfalfa con que se alimentó el lote problema cuando no hubo disponibilidad de alfalfa en las parcelas.

### **3.1.2.- EXPERIENCIA 2ª.- PRIMAVERA DE 1992.**

#### **Animales:**

Se controlaron un total de 28 ovejas distribuidas en dos grupos:

- Grupo problema: constituido por 14 ovejas de raza Manchega. Eran ovejas adultas, secas, y con un peso medio de 56 Kg al inicio de la experiencia. Este grupo se introdujo en el mes de Abril en parcelas de alfalfa "Tierra de Campos" de 1 Ha. aproximadamente, donde pastaron hasta el final de todas las experiencias (nueve meses), controlándose durante un período de dos meses desde su entrada en las parcelas.

- Grupo control: constituido por 14 ovejas de raza Manchega, adultas, secas, y con un peso medio de 55 Kg al comienzo de la experiencia. Este grupo se mantuvo en semiestabulación en una nave con una superficie de aproximadamente 1 m<sup>2</sup>/oveja y un parque exterior de ejercicio de 2 m<sup>2</sup>/oveja. La alimentación estuvo

compuesta de cebada (200 gr/animal/día) y una ración de volumen a base de heno de veza-avena (550 gr/animal/día) y paja de cereal (550 gr/animal/día).

El agua, bloques de sal y correctores vitamínico-minerales se encontraron a libre disposición de los animales.

Previamente al inicio de la experiencia, todos los animales fueron desparasitados y se observó que ciclaban normalmente mediante la introducción de machos recelas.

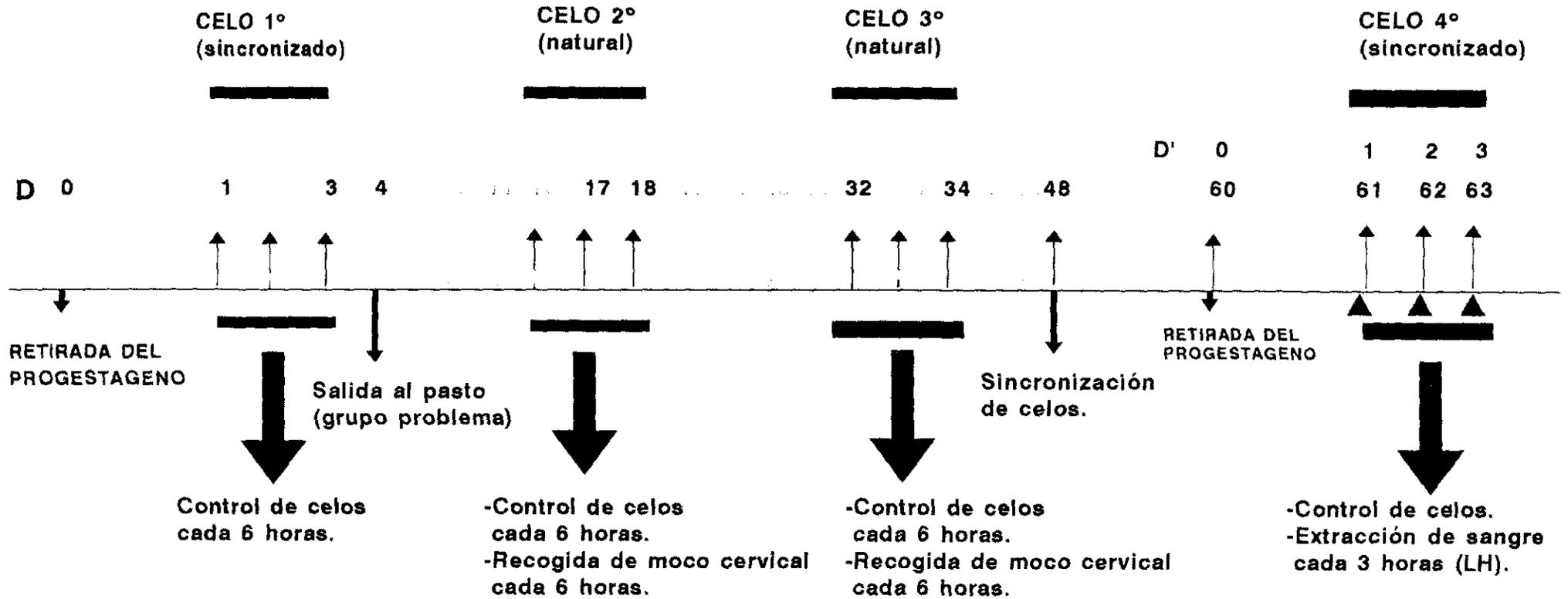
### **Diseño experimental:**

#### **3.1.2.1.- Control de celos y recogida de moco cervical.**

Igual que en la primera experiencia, se sincronizaron los celos de ambos grupos de animales con esponjas intravaginales de 30 mg. de FGA, para agrupar los celos. Las esponjas se extrajeron a los 12 días, comenzando la detección de celos a las 24 horas con machos enmandilados (1 morueco por cada 7 ovejas), realizándose la observación y el recuento de ovejas en celo cada 6 horas hasta las 72 horas después de la extracción de la esponja. De las 28 ovejas salieron en celo 10 en el grupo control y 8 en el problema.

Después de la detección de celos, el grupo problema salió a las parcelas de alfalfa, y se siguió la misma metodología que en la primera experiencia, realizándose un seguimiento durante dos celos consecutivos, tomándose muestras de moco cervical.

## SEGUNDA EXPERIENCIA.- PRIMAVERA 1992.



D: Días desde la extracción de la primera esponja.

D': Días desde la extracción de la segunda esponja.

▲ Extracciones de sangre para medir LH (cada 3 h.)

○ Extracciones de sangre para medir progesterona

### **3.1.2.2.- Recogida de muestras de sangre.**

En ambos grupos de ovejas se recogieron muestras de sangre dos días por semana desde la extracción de la esponja hasta el final de la experiencia, para determinar las concentraciones plasmáticas de progesterona.

Al igual que en la primera experiencia, pasadas dos semanas desde el último celo natural, se volvieron a colocar esponjas, para determinar el pico de LH en ambos grupos, y la metodología seguida fue la misma de la primera experiencia.

### **3.1.2.3.- Toma de muestras del pasto.**

También se determinó el contenido en coumestrol de la alfalfa durante los meses de primavera y ya hasta el final de todas las experiencias. El método seguido para la realizar el muestreo del pasto fue el mismo descrito en la primera experiencia.

## **3.1.3.- EXPERIENCIA 3ª.- OTOÑO DE 1992.**

### **Animales:**

Se controlaron un total de 28 ovejas (que fueron las mismas de la primera experiencia) después de haber estado el grupo problema aproximadamente un año sobre las parcelas. Los meses en que no se dispuso de alfalfa en las parcelas, recibieron una alimentación a base de pellets de alfalfa (1,5 Kg/animal/día).

**Diseño experimental:**

**3.1.3.1.- Control de celos y recogida de moco cervical.**

Fue igual que en la primera y segunda experiencia, y se inició agrupando los celos mediante la sincronización con esponjas intravaginales de 30 mg. de FGA, que se retiraron a los 14 días, saliendo en celo 12 animales en el grupo problema y 13 animales en el grupo control.

Se realizó un seguimiento durante dos celos, durante los cuales se realizaron las recogidas de moco cervical y se tomaron los datos sobre duración de celos.

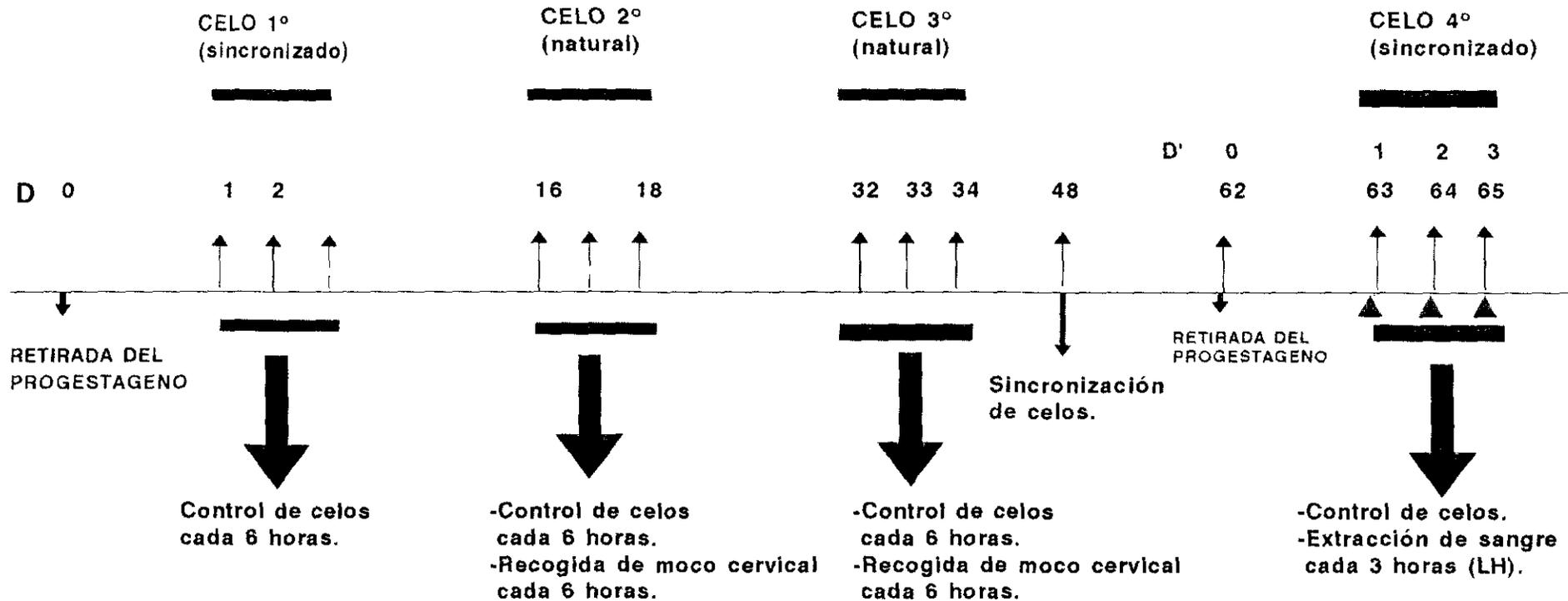
**3.1.3.2.- Recogida de muestras de sangre.**

Igual que en las experiencias anteriores, se recogió sangre dos días por semana desde la extracción de la esponja hasta el final de la experiencia, para determinar las concentraciones plasmáticas de progesterona y se siguió la misma metodología para las recogidas de LH que en la primera y segunda experiencia.

**3.1.3.3. Recogida de muestras para el estudio anatomopatológico del aparato reproductor.**

Una vez que finalizaron las tomas de sangre para analizar LH en esta última experiencia, se sacrificaron en el matadero de Alcalá de Henares, todas las ovejas que pastaron alfalfa y 8 controles (4 de cada estación), para realizar el estudio anatomopatológico del aparato reproductor. Se recogió el tracto genital y se realizó la inspección macroscópica. Se tomaron muestras de ovario, útero y vagina y se fijaron

## TERCERA EXPERIENCIA.- OTOÑO 1992.



D: Días desde la extracción de la primera esponja.

D': Días desde la extracción de la segunda esponja.

▲ Extracciones de sangre para medir LH (cada 3 h.)

▲ Extracciones de sangre para medir progesterona

Sacrificio de las 28 ovejas de los lotes de alfalfa y 8 controles.

en formol al 10% y líquido de Bouin. El estudio histológico se describe en el apartado 3.4.

### 3.2. ANALISIS DEL MOCO CERVICAL.

#### Material y métodos.

En las muestras de moco cervical se determinó: volumen, spinnbarkeit, grado de arborización, presión osmótica y grado de penetración espermática.

**Volumen:** El moco cervical se recogió en pipetas graduadas de 5 ml., anotándose en cada toma el volumen recogido y posteriormente se depositó en tubos colectores cónicos graduados (10 ml.).

**Spinnbarkeit:** El moco cervical se depositó sobre un portaobjetos. Con otro portaobjetos se realizó presión sobre el moco cervical y posteriormente se separaron ambos portas hasta que el hilo de moco cervical se rompió. La distancia vertical a la cual se produce la ruptura fue medida mediante una regleta graduada (Adams, 1977).

**Arborización:** El grado de arborización se midió en un rango de 0-3 (según el número de ramificaciones), basado en el sistema descrito por Alliston et al. (1958). Se realizó una fina extensión sobre un portaobjetos con el moco cervical y se examinó, tras secado a temperatura ambiente, en un microscopio de campo claro (Zeiss mod. Universal R., equipado con cámara fotográfica Winder M-35), con el objetivo de 10x. (LAMINA I).

**Presión osmótica:** La presión osmótica del moco cervical fue medida mediante el osmómetro Advanced mod. 3 MO.

**Penetración espermática:** Para realizar esta determinación, se recogió semen de morueco manchego mediante vagina artificial (mod. I.M.V.). El semen fue inmediatamente llevado al laboratorio mediante una caja de transporte que se mantuvo a 37°C. Se observó la motilidad masal de los eyaculados mediante la técnica reseñada por Evans y Maxwell (1989), la cual consiste en colocar en un portaobjetos limpio y atemperado a 37°C, una gota de semen sin diluir y observar dicha preparación en un microscopio de campo claro con el objetivo de 10x, inmediatamente después de ser recogido el semen.

Posteriormente el semen se diluyó con citrato sódico en la proporción 1:4.

Para determinar el grado de penetración espermática se realizaron dos técnicas:

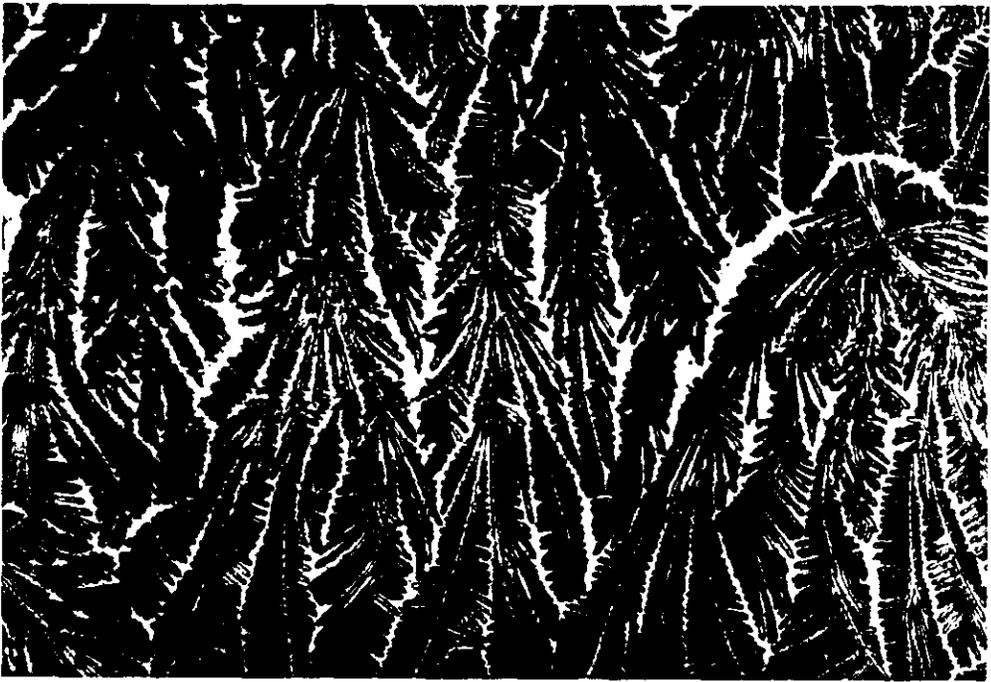
- 1.- Test de penetración sobre un portaobjetos.
- 2.- Sistema del tubo capilar.

#### 1.- Test de penetración sobre un portaobjetos.

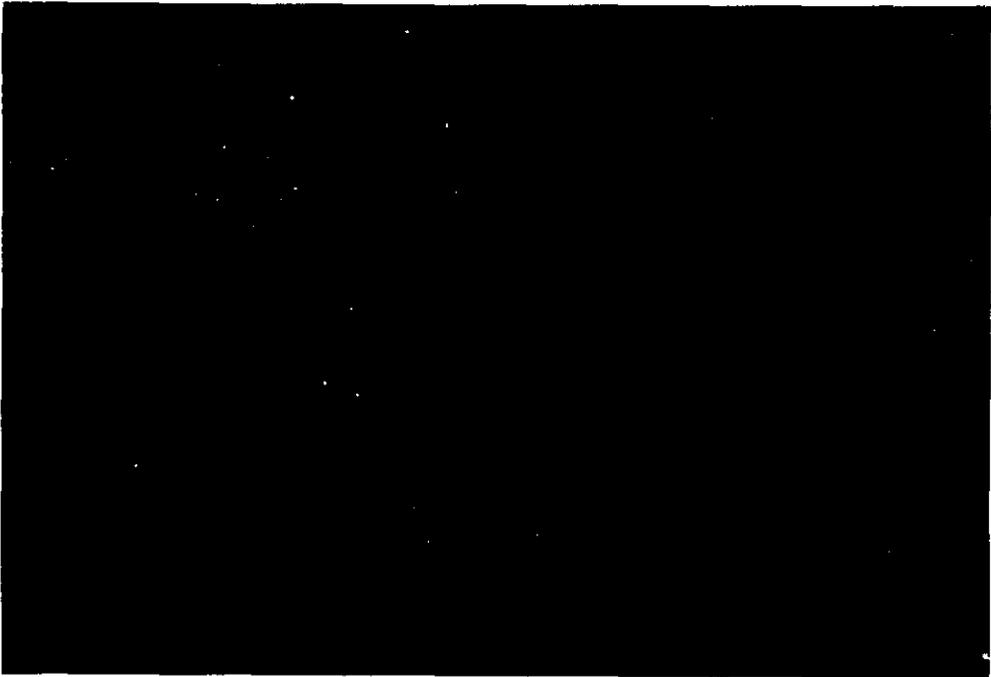
Es el método más simple para observar la penetración espermática en moco cervical (Overstreet, 1986). Se realizó según el procedimiento descrito por Gaddum-Rosse et al., (1980), con alguna modificación (Vázquez, 1992): el moco cervical se colocó sobre un portaobjetos y sobre ellos un cubreobjetos. A lo largo de uno de los bordes del cubre se depositó el semen. Posteriormente se incubó a 37°C durante 30 minutos y se observó con un microscopio de campo claro a 400 aumentos, (LAMINA II) midiéndose la distancia recorrida por los espermatozoides en cm.

#### 2.- Sistema del tubo capilar:

La distancia recorrida por los espermatozoides es medida en tubos capilares llenos de moco cervical. Sobre este sistema hay descritas varias técnicas entre



**A**



**B**



**C**

**LAMINA I:** Arborización del moco cervical.

A: x 10 B: x 40 (lote de alfalfa)

C: x 40 (lote control)

LAMINA II



**A**



**B**

**LAMINA II:** Espermatozoides en moco cervical ovino.

A: x 40 (lote de alfalfa)

B: x 40 (lote control)

las que existen pocas variaciones (Kremer, 1965; Moghissi et al., 1982; Matousek et al., 1989).

Nosotros seguimos el método descrito por Moghissi et al., (1982): un tubo capilar de 200  $\mu$ l y 10 cm. de longitud (Blaubrand) fue llenado con moco cervical y sellado por uno de sus extremos, mientras que el otro extremo se situó sobre un vial que contenía 0,5 ml. de semen diluido. Se incubó durante 30 minutos. Posteriormente el tubo capilar fue extraído del vial y se observó la penetración del semen en la columna del moco en microscopio de campo claro a 400 aumentos, midiendo la distancia recorrida en cm.

### **3.3.- ANALISIS HORMONALES.**

#### **3.3.1.- PROGESTERONA.**

##### **Material y Método.**

Se realizó mediante una técnica de análisis radioinmunológico descrita por López Sebastián et al. (1984). Las muestras se realizaron por doble.

**3.3.1.1.- Técnica de extracción:** la progesterona, contenida en un volumen de plasma de 200  $\mu$ l, fue extraída con 3 ml. de hexano (N-Hexano, Merck) mediante agitación en un agitador vibrador, durante 60 segundos. Después de congelar y separar las fases acuosa y orgánica, esta última, que contenía la progesterona, fue recuperada en tubos de borosilicato de 5 ml., y el contenido fue evaporado en corriente de nitrógeno.

**3.3.1.2.- Reacción inmunológica:** a cada uno de los tubos que contenía la progesterona en forma de residuo seco, se añadieron 200  $\mu$ l de tampón fosfato (0,04

M a pH=7,0), 100  $\mu$ l de antisuero antiprogesterona a la dilución de 1/1.400 y 100  $\mu$ l de progesterona radioactiva (1,2,6,7 Progesterona H<sup>3</sup>, Amersham) (85-110 ci/mmol), con 10.000 c.p.m. aproximadamente. A continuación, se agitaron todos los tubos y se incubaron a 4°C durante 24 horas.

**3.3.1.3.- Separación de las fracciones:** se añadieron a cada tubo 500  $\mu$ l de la solución de carbón dextrano (250 mg. de carbón activo (Norit A) y 10 mg. de dextrano (Dextrano T70, Pharmacia) en 200 ml. de tampón PBS) y después de 15 minutos de contacto a 4°C, se centrifugaron a 4.500 r.p.m. durante 20 minutos en centrífuga refrigerada (Sorvall). Se recuperó el sobrenadante y se pasaron a viales de polipropileno, añadiendo 6 ml. de líquido de centelleo a cada vial.

Después de agitarlos, se midió la radioactividad de la fracción ligada en el contador de centelleo líquido (Contador  $\beta$  Tricarb, Packard) a temperatura ambiente.

**3.3.1.4.- Análisis de los resultados:** una vez conocidas las c.p.m., se calculó el porcentaje de B/B<sub>0</sub> en cada una de las muestras problema, y se realizó la transformación log B/B<sub>0</sub> llevando el valor obtenido a la curva patrón, para obtener de este modo las concentraciones de progesterona en ng/ml para cada muestra.

La concentración mínima detectada fue de 16 pg/ml. El porcentaje de recuperación fue superior al 86% $\pm$ 3,2% y los coeficientes de variación intra e interanálisis fueron respectivamente 10,8 % y 13,3 %.

### 3.3.2.- LH:

Las concentraciones plasmáticas de LH se determinaron mediante una técnica de análisis radioinmunológico, descrita por Gómez Brunet (1989) y desarrollada en el Laboratorio de Radioinmunoanálisis del Departamento de Reproducción Animal del I.N.I.A.

#### Material y Método.

*3.3.2.1. Marcaje y purificación de LH.- Método de radioiodinación enzimática:* A los tubos que contenían 2  $\mu\text{g}$  de NIAMDD LH pura, diluidos en 10  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada de NIAMDD-O-LH, se añadieron los siguientes reactivos: 10  $\mu\text{l}$  de tampón acetato 0,2 M pH = 5,4, 10  $\mu\text{l}$  de solución INa radioactiva (0,5 mci de  $\text{I}^{125}$ ), 10  $\mu\text{l}$  de una solución de lactoperoxidasa, y 10  $\mu\text{l}$  de una solución de peróxido de hidrógeno a la concentración de  $1 \times 10^{-4}$ . Esta mezcla se agitó durante un minuto aproximadamente y se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de la solución IK-BSA para parar la reacción.

La mezcla final de la reacción se hacía pasar por una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia), previamente equilibrada con PBS 0,05 M a pH=7,5 y saturada con 2 ml de solución de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) al 10 % en el mismo tampón PBS 0,05 M., con el fin de separar el  $\text{I}^{125}$  libre de la hormona LH marcada.

La elución se realizó con tampón PBS (0,05 M pH=7,5), recuperando fracciones de 0,5 ml en tubos de poliestireno, a los que previamente se habían añadido unas gotas de la solución BSA-PBS.

La hormona utilizada en el análisis siempre fue previamente purificada por columna de Sephadex G-100 (Farmacia), saturada con PBS-BSA. La elución se realizó también con PBS (0,05 M a pH=7,5), recogiendo fracciones de 0,5 ml.

En los análisis se utilizaron las fracciones que presentaban una mayor capacidad de unión al anticuerpo en ausencia de hormona fría.

**3.3.2.2.- Análisis de LH:** El anticuerpo específico antiLH, se utilizó a la dilución 1/500.000 en tampón PBS-BSA con suero de conejo a 1/400. La hormona marcada se diluyó en tampón PBS-BSA, de manera que cada tubo contenía 10.000 c.p.m. en los 100  $\mu$ l añadidos.

Después de una preincubación de 24 horas a 4°C entre el anticuerpo y la hormona fría, se añadían las 10.000 c.p.m. de la hormona marcada y tras una breve agitación se incubaron a 4°C durante 72 horas.

Seguidamente, se añadieron 200  $\mu$ l del suero de morueco anti- $\delta$  globulinas de conejo, (SMALL) a la dilución 1/70 en tampón PBS-BSA y se sometieron a una segunda incubación durante 24 horas a 4°C, con el fin de que precipitase el complejo hormona-anticuerpo. Con posterioridad se añadieron a todos los tubos, 2 ml de tampón PBS-BSA e inmediatamente se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos; se eliminó el sobrenadante y se midió la radioactividad (c.p.m.) de los precipitados en un contador de centelleo sólido.

**3.3.2.3.- Cálculo de los resultados:** Se prepararon las curvas patrón, con los valores en c.p.m. obtenidos en cada uno de los tubos que contenían concentraciones conocidas de la hormona. En estas curvas, cada punto relacionaba el logit B/B<sub>0</sub> con el logaritmo neperiano de la dosis Ln (ng de LH), de modo que  $\text{logit } B/B_0 = \text{Ln } B/B_0 / 1 - B/B_0$ , donde B = c.p.m. de hormona marcada unida al anticuerpo en cada punto de la

curva patrón,  $B_0 =$  c.p.m. de la hormona marcada unida al anticuerpo en ausencia de hormona fría. (Puntos cero).

La sensibilidad del análisis fue de 0,3 ng/ml y los coeficientes de variación intraanálisis fueron de 11,7 %.

### 3.4. TECNICA HISTOLOGICA.

**3.4.1. Fijación e inclusión:** Las muestras fueron fijadas en formol al 10% y líquido de Bouin (75% de ácido pícrico a saturación + 25% formalina comercial). Tras la fijación se tallaron e introdujeron en "cassettes" de plástico y se lavaron en agua corriente durante 2-4 horas.

Para incluir las muestras se utilizó un procesador automático de tejidos "Shandon-Elliot Bench SCE 0400". La inclusión fue en parafina sintética "Histotec pastillas" (Merck) con punto de fusión 56°C. La formación de los bloques se realizó en una consola Tissue-Tek (Cryo, Dispensing y Thermal Console; Miles Scientific).

**3.4.2. Corte:** Una vez confeccionados, los bloques de parafina fueron cortados en un microtomo de rotación Leitz modelo 1516 de cuchillas desechables, con un grosor de 3-5  $\mu\text{m}$ .

Las secciones obtenidas eran depositadas en superficie caliente a una temperatura aproximada de 37-40°C, para favorecer la eliminación de pliegues. A continuación se recogieron las muestras mediante portas, desengrasados previamente en alcohol éter y secados en estufa a 37°C, durante 12 horas.

**3.4.3. Tinción:** Se utilizaron las técnicas convencionales para el diagnóstico histopatológico en el laboratorio de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Madrid.

**3.4.4. Iconografía:** Para las microfotografías se utilizó película Kodak Ektachrome 64 de Tungsteno y un microscopio Olympus AH-3 (Vanox AHB53), con sistema autofocus y dos cámaras incorporadas.

### **3.5. ANALISIS DEL CONTENIDO EN COUMESTROL.**

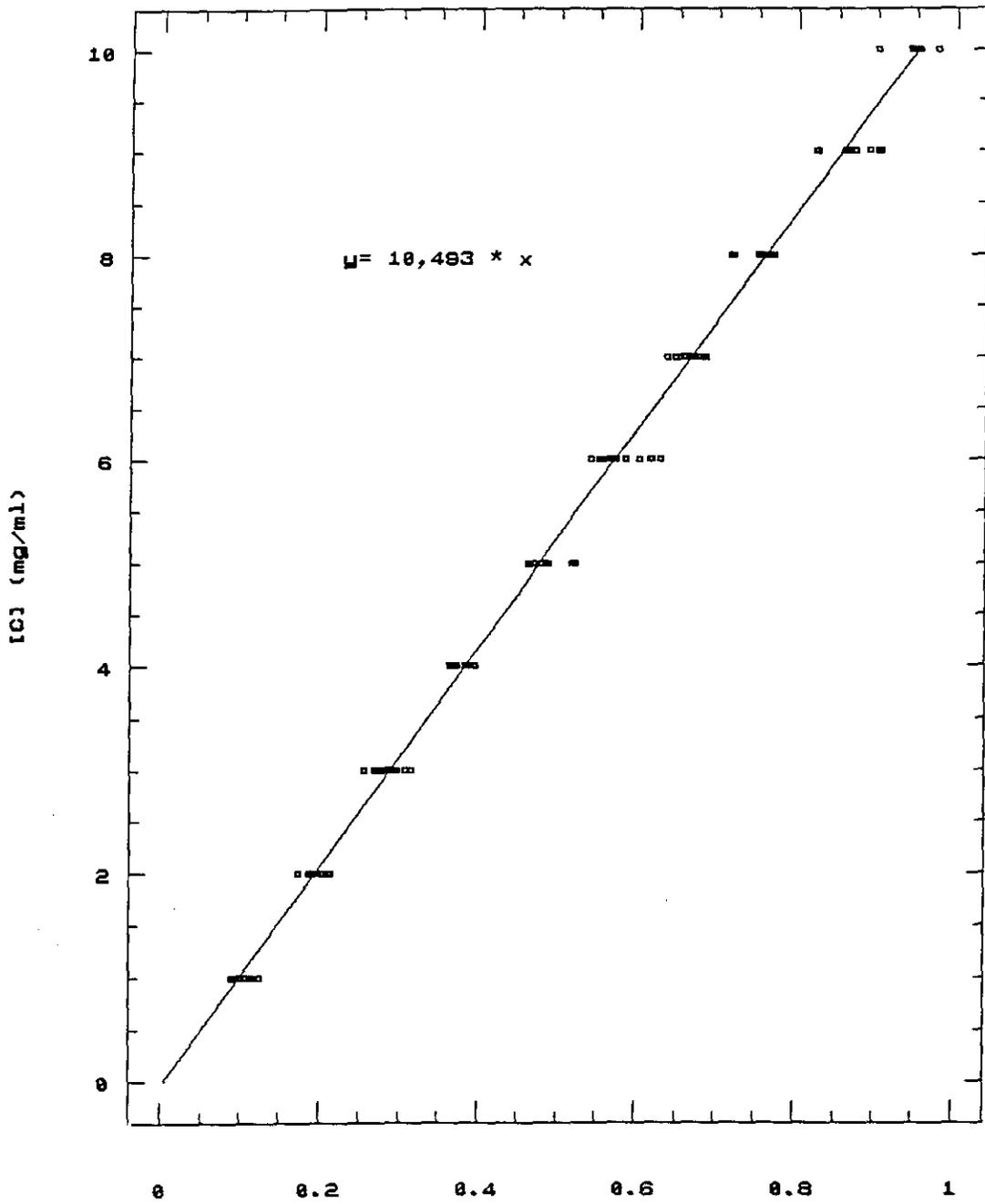
El contenido en coumestrol de la alfalfa y de la vegetación espontánea de las parcelas, así como de la dieta de las ovejas controles y de los pellets de alfalfa que consumieron las ovejas los meses que no hubo disponibilidad de alfalfa en las parcelas, se realizó según el método descrito por Le Bars y Le Bars (1984), con algunas modificaciones.

En primer lugar, se realizó la determinación de la curva patrón determinando el espectro de absorción de una disolución de 100 mg/l de coumestrol (Eastman Kodak Company, ref.: 9362) en etanol al 85%. El valor máximo de absorbancia correspondió a una longitud de onda de 347 nm. Para este valor de  $\lambda$  se determinó la absorbancia en un intervalo de concentraciones de 1 a 10 mg/l, para el cual la relación entre estos dos parámetros es de tipo lineal.

Para cada una de estas disoluciones se realizaron 10 medidas de absorbancia. Posteriormente todos estos valores fueron ajustados por mínimos cuadrados a la ecuación  $Y = bx$ . La ecuación de la recta (figura N°3) fue la siguiente:

$$Y = 10,493x$$
$$(r^2 = 0,99; p < 0,001)$$

Figura N°3: Relación entre la concentración de coumestrol  
y la absorbancia a 347 nm



A

donde Y es la concentración de coumestrol en mg/l, y x es la absorbancia para una  $\lambda = 347$  nm.

El análisis de las muestras (realizado por triplicado), constó de las siguientes fases:

**1. Extracción con disolventes orgánicos:** 5 gr. de la muestra se depositaron en un matraz erlenmeyer y se rehidrataron con 50 ml de agua destilada durante 30'. Posteriormente se añadieron 100 ml de metanol, sometiéndose a agitación durante una hora, transcurrida la cual se filtraba, obteniéndose el extracto metanólico.

En una ampolla de decantación (500ml), se añadieron 100 ml de carbonato de sodio a 50 ml del extracto metanólico. Posteriormente, se realizaron 3 extracciones sucesivas por cloroformo (50, 30 y 20 ml) eliminando cada vez la fase inferior, mientras que la fase acuosa se acidificó hasta un pH de 4-5 mediante ácido sulfúrico al 50%. Una vez conseguido el pH, se efectuaron 3 extracciones con éter dietílico (50 ml), recuperando cada vez la fase superior (extracto etéreo).

Con el fin de deshidratar la muestra, añadimos al extracto etéreo sulfato magnésico anhidro (aproximadamente 0,5 gr).

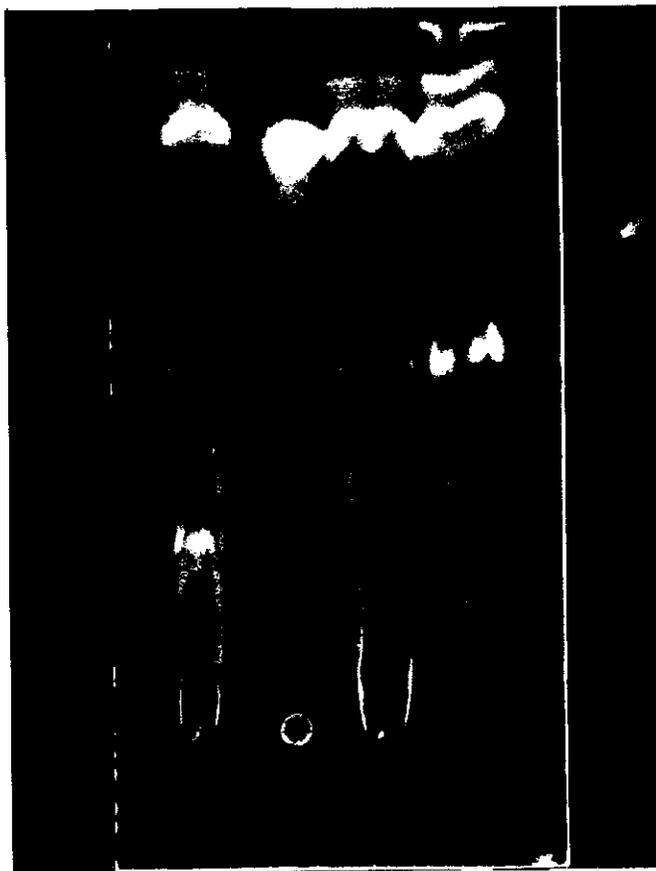
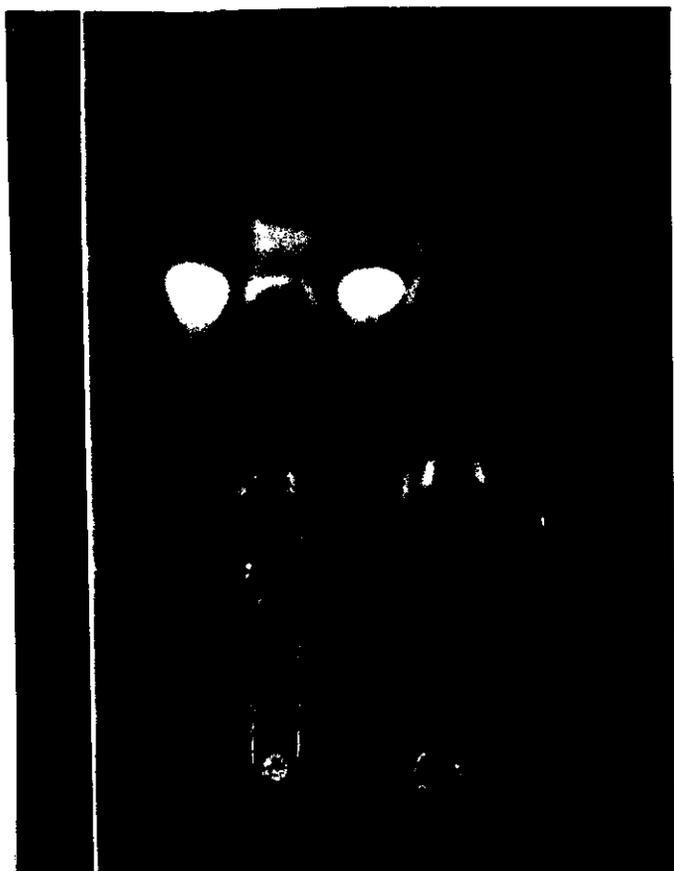
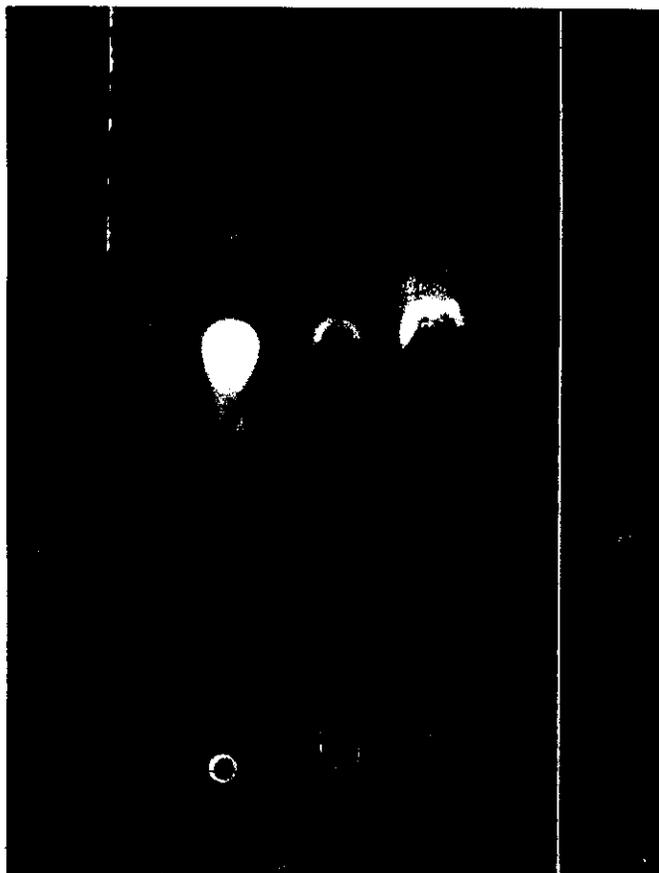
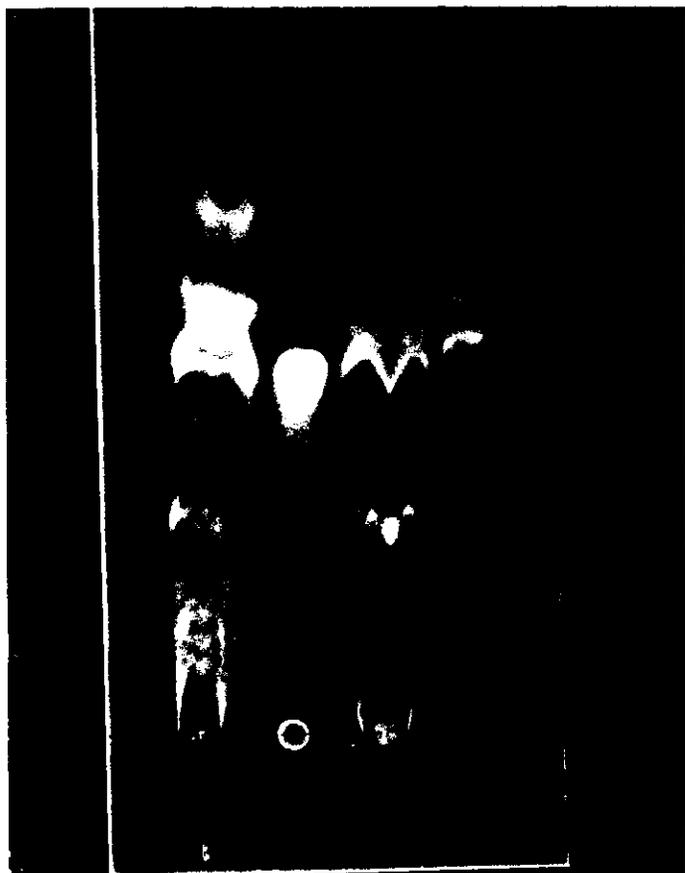
**2. Concentración a vacío con rotavapor y evaporación del disolvente hasta sequedad:** El extracto etéreo se concentró mediante un rotavapor hasta obtener un volumen de aproximadamente 2 ml y posteriormente se llevó a sequedad, mediante corriente de nitrógeno en aparato de vidrio Kuderna. El extracto seco se recogió arrastrando las paredes con 200  $\mu$ l de etanol al 85%.

**3. Purificación por cromatografía en capa fina:** Se tomaron 50  $\mu$ l del extracto anterior y se pincharon progresivamente en una placa de cromatografía (silica-gel 60,

10x20 cm, espesor 0,2 mm), desarrollándose en cámara cerrada con una mezcla de cloroformo-acetona (3/2), durante aproximadamente 40'.

La banda de coumestrol se identificó bajo luz u.v. (366 nm)(LAMINA III). Esta mancha se raspaba y se recogía en un tubo, añadiendo 5 ml de etanol al 85%. Después de centrifugación a 10.000 G, el sobrenadante era recogido para cuantificación por espectrofotometría (PYE-UNICAM SP-8-100 u.v.vis.) a 347 nm frente a etanol al 85% como blanco, llevando el valor obtenido a la recta patrón y transformando el resultado en mg/KgMS.

LAMINA III



**LAMINA III:** Placas de cromatografía donde se observa la mancha de coumestrol del patrón (P) y de distintas muestras de alfalfa (luz u.v. 366 nm).

### 3.6. ANALISIS ESTADISTICO.

El efecto del pastoreo de alfalfa sobre los parámetros estudiados en el moco cervical (volumen, arborización, presión osmótica, spinnbarkeit y penetración espermática) y sobre la duración del celo, se realizó, en cada experiencia mediante un análisis de varianza de una vía.

La influencia de la estación y del tiempo de pastoreo sobre las variables anteriores se realizó por medio de un análisis de varianza para valorar la existencia de interacciones entre el factor tipo de alimentación y la estación, y entre el factor tipo de alimentación y tiempo de pastoreo, según los siguientes modelos:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + TP_{ij} + C_k + TC_{ik} + PC_{jk} + TPC_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

donde Y: variable en estudio

$\mu$ : media general

T: efecto fijo del tipo de dieta.

P: efecto fijo del tiempo de pastoreo.

C: efecto fijo del celo.

$TP_{ij}$ ,  $TC_{ik}$ ,  $PC_{jk}$  y  $TPC_{ijk}$ : interacciones entre los efectos.

$\epsilon$ : error residual.

El modelo para ver la influencia de la estación y el tipo de dieta fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + E_j + TE_{ij} + C_k + TC_{ik} + EC_{jk} + TEC_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

donde Y: variable en estudio.

$\mu$ : media general

T: efecto fijo del tipo de alimentación

E: efecto fijo de la estación

C: efecto fijo del celo.

$TE_{ij}$ ,  $TC_{ik}$ ,  $EC_{jk}$  y  $TEC_{ijk}$ : interacciones entre los efectos.

$\epsilon$  : error residual.

Al observarse que ni el celo ni sus interacciones fueron significativas, se realizaron dos modelos reducidos que son los siguientes:

- para el tipo de alimentación y tiempo de pastoreo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + TP_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

- para tipo de alimentación y estación:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + E_j + TE_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

El análisis de varianza se realizó de acuerdo al sistema BMDP (BMDP, Statistical Software).

La comparación de las concentraciones máximas de LH en el pico preovulatorio, las horas transcurridas desde la extracción del progestágeno al pico preovulatorio y los niveles basales de LH, se realizó mediante un análisis de varianza para el factor tratamiento en cada experiencia, según el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Posteriormente, se llevaron a cabo dos análisis de varianza de doble vía, para valorar la existencia de interacciones entre el factor tipo de alimentación y la estación y entre el factor tipo de alimentación y el tiempo de pastoreo.

Los modelos fueron los siguientes:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + TP_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

$$y_{ijk} = \mu + T_i + E_j + TE_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

donde:

y: variable dependiente (nivel basal de LH, concentración máxima en el pico preovulatorio y horas transcurridas desde la extracción del progestágeno al pico de LH).

$\mu$ : media general.

T: efecto fijo del tipo de dieta, con dos niveles (alfalfa y dieta exenta de fitoestrógenos).

P: efecto fijo del tiempo de pastoreo, que engloba el posible efecto del acostumbramiento al coumestrol y el efecto del año propiamente dicho.

E: efecto fijo de la estación, que podría reflejar la influencia del fotoperíodo y las posibles variaciones estacionales del contenido en coumestrol de la alfalfa.

$TP_{ij}$ : interacción tipo de dieta-pastoreo.

$TE_{ij}$ : interacción tipo de dieta-estación.

$\epsilon$ : error residual correspondiente a cada observación.

El grado de significación de las diferencias detectadas en cada grupo fue establecido mediante el test de significación mínima de Fisher.

El análisis estadístico que se aplicó a las concentraciones plasmáticas de LH en el pico preovulatorio, fue un análisis de regresión no lineal, cuyo modelo matemático es una campana de Gauss. El modelo, de tipo exponencial, es el siguiente:

$$LH = A + B \frac{1}{S\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{(x-M)^2}{2S^2}\right\}$$

donde:

- A: asíntota para  $x = \pm \infty$
- B: parámetro relacionado con el área bajo la curva.
- M: abscisa del pico (máximo).
- S: desviación típica.
- x: hora.

El análisis estadístico que se realizó sobre las concentraciones plasmáticas de progesterona, fue un análisis de regresión lineal, cuyo modelo matemático es la ecuación de una parábola

$$y = b_0 + b_1x + b_2x^2$$

donde:

- y: niveles plasmáticos de progesterona.
- x: días de muestreo desde la retirada del progestágeno.
- b: coeficientes de la ecuación de la parábola.

El ajuste se realizó por separado para cada ciclo, analizándose dos ciclos en cada experiencia. La comparación de modelos estadísticos se realizó mediante un análisis de paralelismo, utilizando las sumas de cuadrados residuales (ANOVA).

## *RESULTADOS*

**4.- RESULTADOS.****4.1.- DISPONIBILIDAD DE PASTO Y CONTENIDO EN COUMESTROL.**

Los valores de disponibilidad media de alfalfa para los distintos periodos de pastoreo se exponen en la tabla 1.

**TABLA 1.- Disponibilidades medias de alfalfa en los distintos periodos de pastoreo.**

|           | AÑO 1991 |                | AÑO 1992 |                |
|-----------|----------|----------------|----------|----------------|
|           | Kg MS/Ha | gr/Kg P.V./día | Kg MS/Ha | gr/Kg P.V./día |
| PRIMAVERA | –        | –              | 1236     | 73,57          |
| VERANO    | –        | –              | 862      | 55,12          |
| OTOÑO     | 926      | 71,83          | 1161     | 69.85          |

No existieron diferencias significativas dependientes del tipo de dieta en los pesos y condición corporal de las ovejas a lo largo de las experiencias. Sin embargo, el segundo año de estudio las ovejas de todos los lotes tuvieron un peso y una condición corporal significativamente mayor ( $P < 0,001$ ) que al inicio de todas las experiencias (tablas 2, 3, 4 y 5).

**TABLA 2.- Pesos medios (Kg) de las ovejas de los lotes de otoño al inicio de la experiencia y después de un año de estudio.**

|          | CONTROL          | ALFALFA          | $\mu \pm E.S.M.$   |
|----------|------------------|------------------|--------------------|
| AÑO 1991 | $50 \pm 1,55$    | $50 \pm 1,61$    | $50 \pm 1,50^A$    |
| AÑO 1992 | $60,46 \pm 2,52$ | $68,89 \pm 2,72$ | $66,46 \pm 1,39^B$ |

A,B  $p < 0,001$

**TABLA 3.-** Condición corporal media de las ovejas de los lotes de otoño al inicio de la experiencia y después de un año de estudio.

|          | CONTROL         | ALFALFA         | $\mu \pm \text{E.S.M.}$ |
|----------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| AÑO 1991 | $1,87 \pm 0,15$ | $1,89 \pm 0,10$ | $1,92 \pm 0,8^A$        |
| AÑO 1992 | $2,82 \pm 0,09$ | $2,92 \pm 0,22$ | $2,98 \pm 0,79^B$       |

A,B  $P < 0,001$

**TABLA 4.-** Pesos medios de las ovejas de los lotes de primavera al inicio y al final de todas las experiencias.

|              | CONTROL         | ALFALFA         | $\mu \pm \text{E.S.M.}$ |
|--------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| PESO INICIAL | $55 \pm 1,25$   | $56 \pm 1,75$   | $55,5 \pm 1,40^A$       |
| PESO FINAL   | $67,08 \pm 2,5$ | $68,52 \pm 2,7$ | $67,8 \pm 1,60^B$       |

A,B  $P < 0,001$

**TABLA 5.-** Condición corporal media de las ovejas de los lotes de primavera al inicio y al final de todas las experiencias.

|              | CONTROL         | ALFALFA         | $\mu \pm \text{E.S.M.}$ |
|--------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| C.C. INICIAL | $1,7 \pm 0,18$  | $1,85 \pm 0,15$ | $1,77 \pm 0,7^A$        |
| C.C. FINAL   | $2,95 \pm 0,08$ | $2,5 \pm 0,07$  | $2,72 \pm 0,6^B$        |

A,B  $P < 0,001$

El contenido en coumestrol de la alfalfa varió a lo largo de los meses de estudio, presentando un valor medio global de  $19,76 \pm 2,79$  mg/Kg MS. No se encontró coumestrol en la dieta de las ovejas controles y sólo trazas en la vegetación espontánea de las parcelas. Los pellets de alfalfa que consumió el lote problema cuando no hubo disponibilidad de alfalfa en las parcelas, presentaron un contenido en coumestrol de 18 mg/Kg MS.

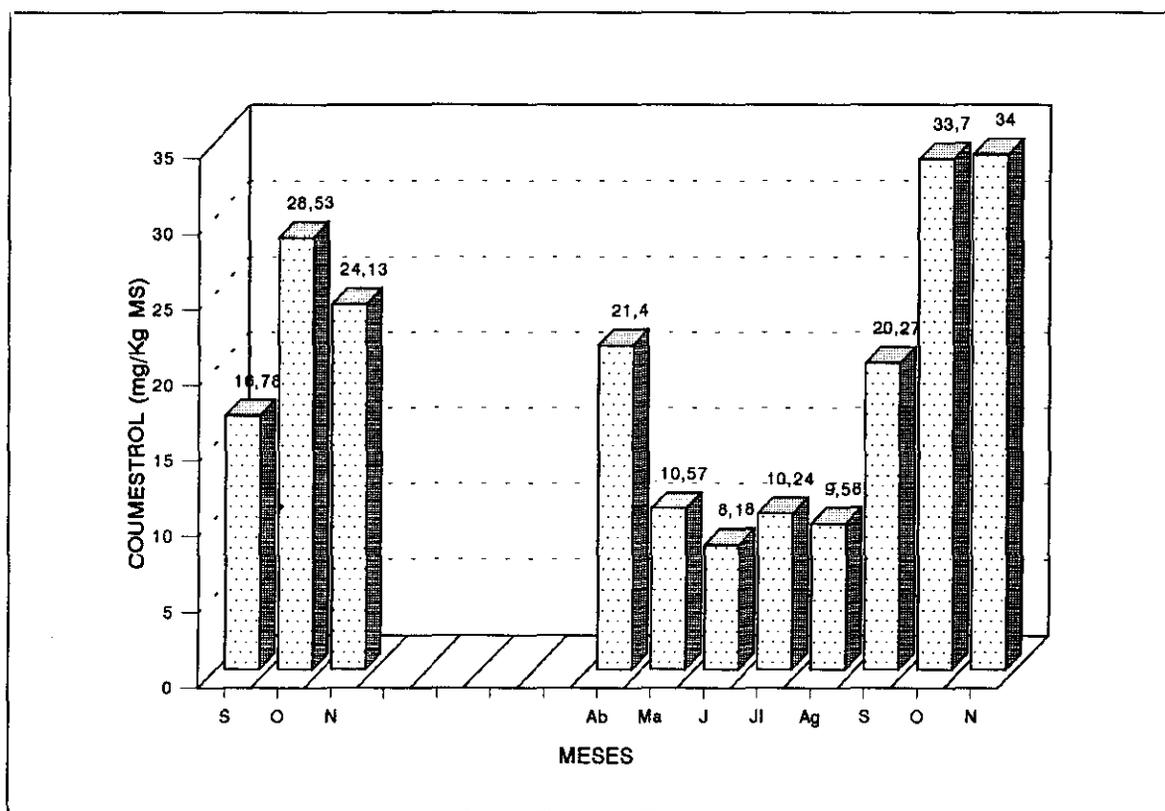
El contenido en coumestrol de las parcelas de alfalfa para cada mes de muestreo se expone en la tabla 6.

**TABLA 6.-** Contenido en coumestrol de la alfalfa en los meses de estudio. (mg/Kg MS).

| MESES           | COUMESTROL |
|-----------------|------------|
| SEPTIEMBRE 1991 | 16,78      |
| OCTUBRE 1991    | 28,53      |
| NOVIEMBRE 1991  | 24,13      |
| ABRIL 1992      | 21,40      |
| MAYO 1992       | 10,57      |
| JUNIO 1992      | 8,18       |
| JULIO 1992      | 10,24      |
| AGOSTO 1992     | 9,58       |
| SEPTIEMBRE 1992 | 20,27      |
| OCTUBRE 1992    | 33,7       |
| NOVIEMBRE 1992  | 34         |

Como se observa en la tabla 6, el contenido más bajo en coumestrol de la alfalfa se produjo en los meses de Mayo, Junio, Julio y Agosto, y el máximo se alcanzó en Octubre y Noviembre de 1992 (figura nº4).

Figura 4: Contenido en coumestrol de la alfalfa en los meses de estudio.



## 4.2.- EFECTO DEL PASTOREO DE ALFALFA SOBRE LAS CARACTERISTICAS DEL MOCO CERVICAL.

### 4.2.1.- Experiencias 1, 2 y 3.

#### - Experiencia 1. Pastoreo corto en otoño de 1991.

Los resultados medios obtenidos en relación con el efecto del pastoreo corto de alfalfa en otoño sobre los parámetros analizados en el moco cervical (volumen, spinnbarkeit, grado de arborización, presión osmótica y penetración espermática), así como la duración del celo, se exponen en la tabla 7.

**TABLA 7.-** Resultados obtenidos en la 1ª experiencia. Otoño 1991. (media ± E.S.M.).

|                              | CONTROL                  | ALFALFA                  |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| DURACION CELO (h)            | 33,25 ± 1,65             | 30,0 ± 1,49              |
| VOLUMEN (ml)                 | 1,09 ± 0,29 <sup>a</sup> | 2,05 ± 0,33 <sup>b</sup> |
| SPINNBARKEIT (cm)            | 4,18 ± 0,62 <sup>A</sup> | 1,83 ± 0,32 <sup>B</sup> |
| ARBORIZACION                 | 1,88 ± 0,29              | 1,78 ± 0,26              |
| P. OSMOTICA (mOsm/Kg)        | 244,11 ± 13,58           | 271,78 ± 12,23           |
| P. ESPERMATICA (capilar)(cm) | 3,66 ± 0,32              | 3,86 ± 0,28              |
| P. ESPERMATICA (porta)(cm)   | 2,55 ± 0,22              | 2,77 ± 0,16              |

Distintos superíndices en la misma fila indican diferencias significativas.

a,b p<0,05

A,B p<0,001

Como se observa en la tabla 7, sólo existieron diferencias significativas en el volumen de moco cervical, con una mayor producción de moco en las ovejas que consumieron alfalfa (2,05 vs 1,09 ml.;  $p < 0,05$ ) y en el spinnbarkeit del moco cervical que fue mayor en el grupo control (4,18 vs 1,83 cm.;  $p < 0,001$ ).

Tampoco existieron diferencias en el número de animales en celo en cada lote de ovejas a lo largo de la experiencia. Del total de los 28 animales, respondieron al tratamiento de sincronización 24 (12 ovejas en cada lote), y siguieron ciclando hasta el final de la experiencia.

- Experiencia 2. Pastoreo corto en primavera de 1992.

Los resultados medios obtenidos en relación con el efecto de un pastoreo corto de alfalfa en primavera sobre los parámetros analizados en el moco cervical y sobre la duración del celo se exponen en la tabla 8.

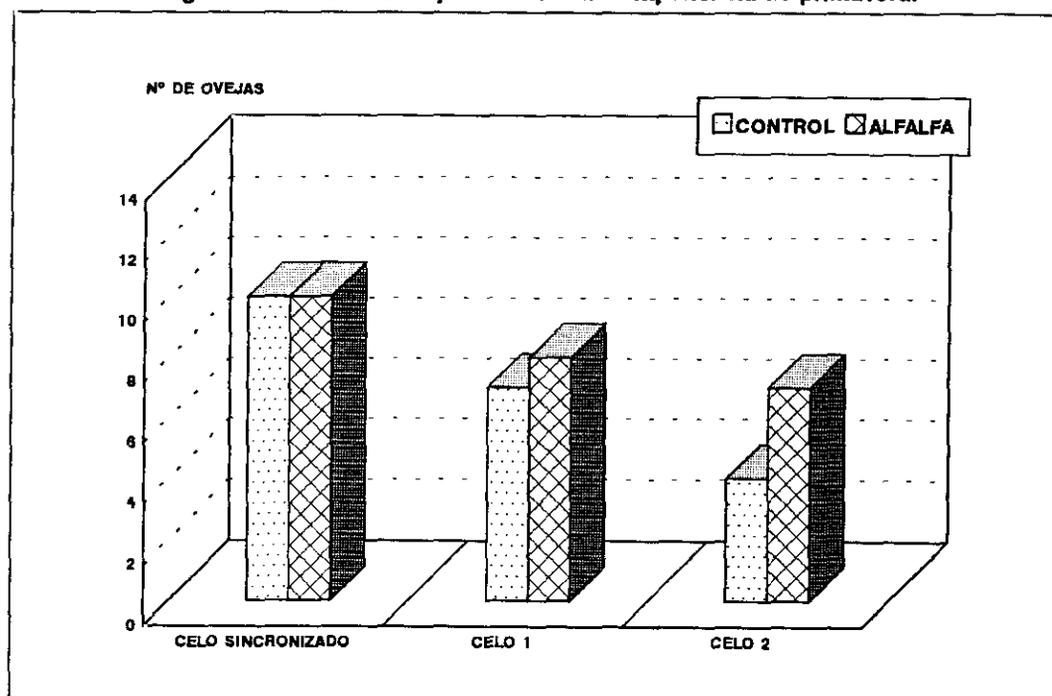
**TABLA 8.-** Resultados de la 2ª experiencia. Primavera 1992. (media  $\pm$  E.S.)

|                              | CONTROL          | ALFALFA         |
|------------------------------|------------------|-----------------|
| DURACION CELO (h)            | 30,54 $\pm$ 1,50 | 32,0 $\pm$ 1,72 |
| VOLUMEN (ml)                 | 0,93 $\pm$ 0,27  | 1,87 $\pm$ 0,41 |
| SPINNBARKEIT (cm)            | 3,92 $\pm$ 0,43  | 3,44 $\pm$ 0,69 |
| ARBORIZACION                 | 2,11 $\pm$ 0,42  | 2,36 $\pm$ 0,27 |
| P. OSMOTICA (mOsm/Kg)        | 252 $\pm$ 33,33  | 299 $\pm$ 18,51 |
| P. ESPERMATICA (capilar)(cm) | 2,43 $\pm$ 0,34  | 2,9 $\pm$ 0,19  |
| P. ESPERMATICA (porta)(cm)   | 2,08 $\pm$ 0,31  | 2,25 $\pm$ 0,13 |

Como se observa en la tabla 8, no hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados entre los dos grupos de ovejas. No obstante, existió una tendencia en el lote de alfalfa a presentar un mayor volumen de moco cervical que el lote control ( $p < 0,1$ ).

En cuanto al número de animales en celo, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (debido al número de animales), se observó una tendencia del lote de alfalfa a presentar más animales en celo que el lote control, a lo largo de los ciclos de estudio (figura N° 5). Del total de las 28 ovejas, respondieron al tratamiento de sincronización 20 animales (10 en cada lote). El número de animales en celo en cada ciclo se expone en la tabla 9.

Figura 5: Número de ovejas en celo en la experiencia de primavera.



**TABLA 9.-** Número de animales en celo en cada ciclo.

|                      | CONTROL | ALFALFA |
|----------------------|---------|---------|
| CELO SINCRONIZADO    | 10      | 10      |
| 1 <sup>er</sup> CELO | 7       | 8       |
| 2 <sup>o</sup> CELO  | 4       | 7       |

- Experiencia 3. Pastoreo prolongado. Otoño de 1992.

Los resultados obtenidos en relación con el efecto de un pastoreo prolongado de alfalfa (1 año) sobre los parámetros analizados en el moco cervical y sobre la duración del celo se exponen en la tabla 10.

**TABLA 10.-** Resultados obtenidos en la 3<sup>a</sup> experiencia. (media  $\pm$  E.S.)

|                              | CONTROL                      | ALFALFA                      |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| DURACION CELO (h)            | 40,38 $\pm$ 1,31             | 36,28 $\pm$ 1,62             |
| VOLUMEN (ml)                 | 1,20 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup> | 2,28 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup> |
| SPINNBARKEIT (cm)            | 4,57 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup> | 2,26 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup> |
| ARBORIZACION                 | 2,40 $\pm$ 0,24              | 1,65 $\pm$ 0,27              |
| P. OSMOTICA (mOsm/Kg)        | 292,57 $\pm$ 7,85            | 291,94 $\pm$ 5,53            |
| P. ESPERMATICA (capilar)(cm) | 3,23 $\pm$ 0,53              | 2,30 $\pm$ 0,21              |
| P. ESPERMATICA (porta)(cm)   | 1,83 $\pm$ 0,20              | 2,27 $\pm$ 0,27              |

Distintos superíndices en la misma fila indican diferencias significativas; a,b p<0,005.

Como puede observarse en la tabla 10, existieron diferencias significativas en el volumen de moco cervical, con una mayor producción de moco en el grupo de alfalfa ( $p < 0,005$ ) y en el spinnbarkeit, que fue mayor en el lote control ( $p < 0,005$ ).

En cuanto al número de animales en celo, no hubo diferencias significativas entre los dos lotes a lo largo de la experiencia. Del total de las 28 ovejas, respondieron al tratamiento de sincronización 25 (13 en el lote control y 12 en el lote de alfalfa). En la tabla 11 se expone el número de animales en celo en cada ciclo.

**TABLA 11.-** Número de animales en celo en cada ciclo.

|                      | CONTROL | ALFALFA |
|----------------------|---------|---------|
| CELO SINCRONIZADO    | 13      | 12      |
| 1 <sup>er</sup> CELO | 13      | 11      |
| 2 <sup>o</sup> CELO  | 13      | 10      |

Por tanto, en las tres experiencias el lote de alfalfa mostró un mayor volumen de moco cervical, con un reducido spinnbarkeit (figuras N° 6 y N° 7).

Figura 6: Volumen de moco cervical en los dos lotes de ovejas en las tres experiencias.

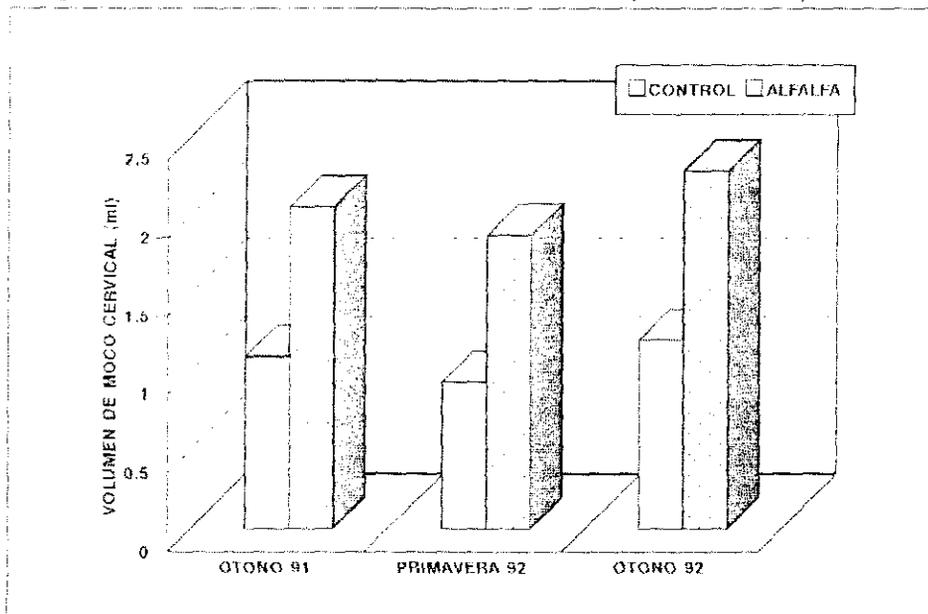
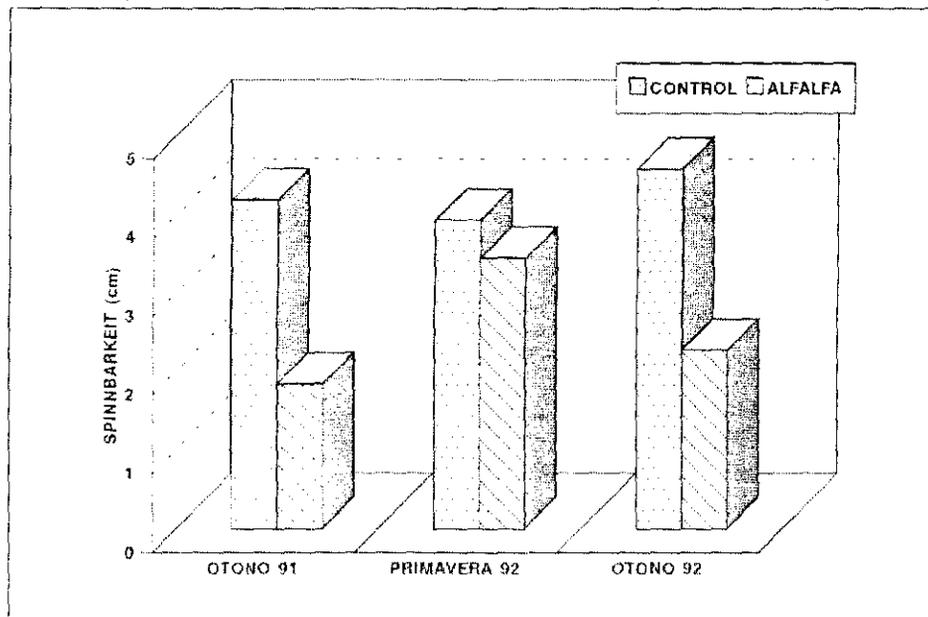


Figura 7: Spinnbarkeit del moco cervical de los dos lotes de ovejas en las tres experiencias.



#### 4.2.2.- Efecto del pastoreo de alfalfa y la estación sobre el moco cervical.

Se realizó un análisis de varianza para los factores tipo de alimentación (alfalfa y control) y estación (otoño de 1991 y primavera de 1992), con el fin de determinar posibles interacciones entre ambos factores, hallando en primer lugar un efecto del tipo de alimentación sobre el volumen de moco cervical y sobre el spinnbarkeit. El volumen producido por el lote que pastoreó alfalfa fue significativamente superior ( $p < 0,01$ ) al producido por el grupo control independientemente de la estación, y siendo respectivamente 1,98 y 1,04 ml (tabla 12).

**TABLA 12.-** Volumen (ml) de moco cervical en los lotes control y alfalfa para las dos estaciones.

|         | OTOÑO 1991              | PRIMAVERA 1992          | MEDIA $\pm$ ESM              |
|---------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| CONTROL | 1,09 $\pm$ 0,29<br>n=24 | 0,93 $\pm$ 0,27<br>n=11 | 1,04 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup> |
| ALFALFA | 2,05 $\pm$ 0,33<br>n=24 | 1,87 $\pm$ 0,41<br>n=15 | 1,98 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup> |

a,b'  $p < 0,01$

Así mismo, existe un efecto del tipo de alimentación sobre el spinnbarkeit del moco cervical, que no experimentó variación con la estación, y fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) en el lote control (4,09 cm.) que en el lote de alfalfa (2,35 cm.) (tabla 13).

**TABLA 13.-** Spinnbarkeit (cm) del moco cervical de ambos lotes en las dos estaciones.

|         | OTOÑO 1991              | PRIMAVERA 1992          | MEDIA $\pm$ ESM              |
|---------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| CONTROL | 4,18 $\pm$ 0,62<br>n=18 | 3,92 $\pm$ 0,43<br>n=9  | 4,09 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup> |
| ALFALFA | 1,83 $\pm$ 0,32<br>n=23 | 3,44 $\pm$ 0,69<br>n=11 | 2,35 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup> |

a,b p&lt;0,05

Sin embargo, aunque la estación no fue significativa para las características estudiadas en el moco cervical, si lo fue en la penetración espermática (independientemente del tipo de alimentación), que fue siempre superior en otoño que en primavera, en las dos pruebas realizadas sobre este parámetro (tablas 14 y 15).

**TABLA 14.-** Penetración espermática (cm) en el moco cervical de los dos lotes de ovejas en las dos estaciones, mediante la prueba del tubo capilar.

|               | OTOÑO                        | PRIMAVERA                    |
|---------------|------------------------------|------------------------------|
| CONTROL       | 3,66 $\pm$ 0,32<br>n=12      | 2,43 $\pm$ 0,34<br>n=8       |
| ALFALFA       | 3,86 $\pm$ 0,33<br>n=12      | 2,90 $\pm$ 0,19<br>n=9       |
| $\mu \pm$ ESM | 3,77 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup> | 2,67 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup> |

a,b p&lt;0,005

**TABLA 15.-** Penetración espermática (cm) en el moco cervical de los dos lotes de ovejas en las dos estaciones, mediante la prueba del porta.

|                      | OTOÑO                   | PRIMAVERA               |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| CONTROL              | 2,55 ±0,22<br>n=18      | 2,08 ±0,37<br>n=7       |
| ALFALFA              | 2,77 ±0,16<br>n=23      | 2,25 ±0,13<br>n=10      |
| $\mu \pm \text{ESM}$ | 2,67 ±0,13 <sup>a</sup> | 2,18 ±0,16 <sup>b</sup> |

a,b  $p < 0,05$

Ni el tipo de alimentación ni la estación fueron significativas para el resto de las variables.

#### 4.2.3.- Efecto de la dieta y del tiempo de pastoreo sobre el moco cervical.

Se realizó un análisis de varianza para los factores tipo de alimentación (alfalfa y control) y tiempo de pastoreo: otoño de 1991 (2 meses) y otoño de 1992 (1 año), resultando la interacción no significativa.

El volumen de moco cervical y el spinnbarkeit resultaron afectados sólo por el tipo de alimentación, independientemente del año. Las ovejas del grupo de alfalfa tuvieron un volumen de moco cervical significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que las del grupo control (2,18 ml vs 1,14 ml) (tabla 16), mientras que el spinnbarkeit del moco cervical fue siempre significativamente superior ( $p < 0,001$ ) en el lote control que en el lote de alfalfa, con independencia del año de estudio (4,38 cm vs 2,03) (tabla 17).

**TABLA 16.-** Volumen de moco cervical en ambos lotes de ovejas en el primer y segundo otoño.

|         | OTOÑO 1991              | OTOÑO 1992              | $\mu \pm \text{ESM}$         |
|---------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| CONTROL | 1,09 $\pm$ 0,29<br>n=24 | 1,20 $\pm$ 0,04<br>n=26 | 1,14 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup> |
| ALFALFA | 2,05 $\pm$ 0,33<br>n=24 | 2,28 $\pm$ 0,07<br>n=21 | 2,18 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup> |

a,b p<0,05

**TABLA 17.-** Spinnbarkeit del moco cervical en ambos lotes de ovejas en el primer y segundo otoño.

|         | OTOÑO 1991              | OTOÑO 1992              | $\mu \pm \text{ESM}$         |
|---------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|
| CONTROL | 4,18 $\pm$ 0,62<br>n=18 | 4,57 $\pm$ 0,56<br>n=20 | 4,38 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup> |
| ALFALFA | 1,83 $\pm$ 0,38<br>n=23 | 2,26 $\pm$ 0,49<br>n=20 | 2,03 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup> |

a,b p<0,001

No hubo diferencias significativas dependientes del tipo de alimentación ni del año en el resto de las variables.

### 4.3.- EFECTO DEL PASTOREO DE ALFALFA SOBRE LOS PERFILES HORMONALES DE LH Y PROGESTERONA.

#### 4.3.1. Experiencias 1, 2 y 3.

.- Experiencia 1. Pastoreo corto en otoño de 1991.

**LH:**

La curva de regresión que tipifica el perfil de descarga preovulatoria de LH, se ajusta al modelo matemático campana de Gauss. En la tabla 18 se exponen las estimas de los parámetros del modelo.

**TABLA 18.-** Estimaciones de los parámetros del modelo de regresión.

|         | A    | S    | M     | B      |
|---------|------|------|-------|--------|
| CONTROL | 1,47 | 2,04 | -0,05 | 173,28 |
| ALFALFA | 1,39 | 1,74 | 0,38  | 141,56 |

El análisis de regresión indicó que no existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dos curvas, por lo que el perfil de secreción de LH de los dos lotes se ajusta a la siguiente ecuación:

$$LH = 1,53 + 33,51 e^{-\frac{(x-0,12)^2}{0,58}}$$

cuyos parámetros, junto con la desviación típica asintótica se exponen a continuación:

| A              | S              | M              | B               | r <sup>2</sup> |
|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| 1,53<br>(0,42) | 0,54<br>(0,29) | 0,12<br>(0,14) | 45,23<br>(3,70) | 0,60***        |

\*\*\*  $p < 0,001$

En la figura 8 se representa el perfil de secreción de ambos lotes según el análisis de regresión, ajustando a la hora cero la concentración máxima de LH determinada en el pico.

Se detectaron picos preovulatorios de LH en el 90% de las ovejas del lote control y en el 70% del lote de alfalfa. Como se observa en la tabla 19, no existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las concentraciones plasmáticas de LH en el pico preovulatorio entre ambos lotes (lote de alfalfa 33,08 ng/ml; lote control 36,38 ng/ml), así como tampoco en el nivel basal (alfalfa 0,65 ng/ml; control 1,09 ng/ml), ni en el intervalo comprendido entre la retirada del progestágeno y el pico preovulatorio de LH (alfalfa 51 horas; control 58,1 horas).

**TABLA 19.-** Concentraciones basales de LH (ng/ml), concentraciones máximas en el pico preovulatorio (ng/ml) e intervalos comprendidos entre la retirada del progestágeno y el pico preovulatorio de LH (horas).

|                    | CONTROL      | ALFALFA      |
|--------------------|--------------|--------------|
| [LH] basal (ng/ml) | 1,09 ± 0,32  | 0,65 ± 1,6   |
| [LH] max. (ng/ml)  | 36,38 ± 8,79 | 33,08 ± 7,33 |
| Horas              | 58,1 ± 2,50  | 51 ± 3,40    |

En la figura N° 9 se representan los perfiles medios de descarga preovulatoria de LH en ambos lotes de ovejas, ajustando a la hora cero las concentraciones plasmáticas máximas de LH en el pico preovulatorio.

Figura 8: Perfil de descarga preovulatoria de LH según el modelo de regresión estimado para los dos lotes de ovejas.

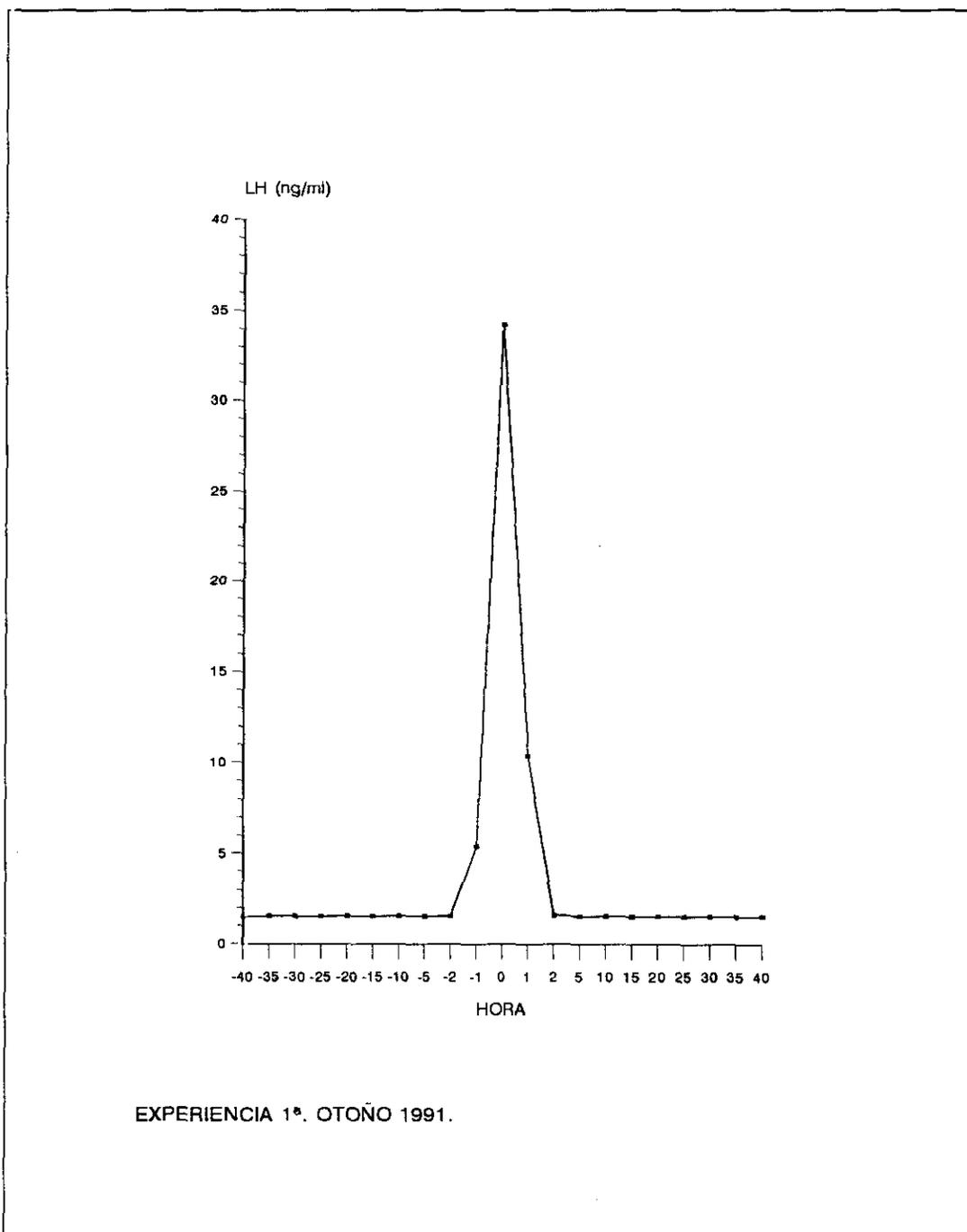
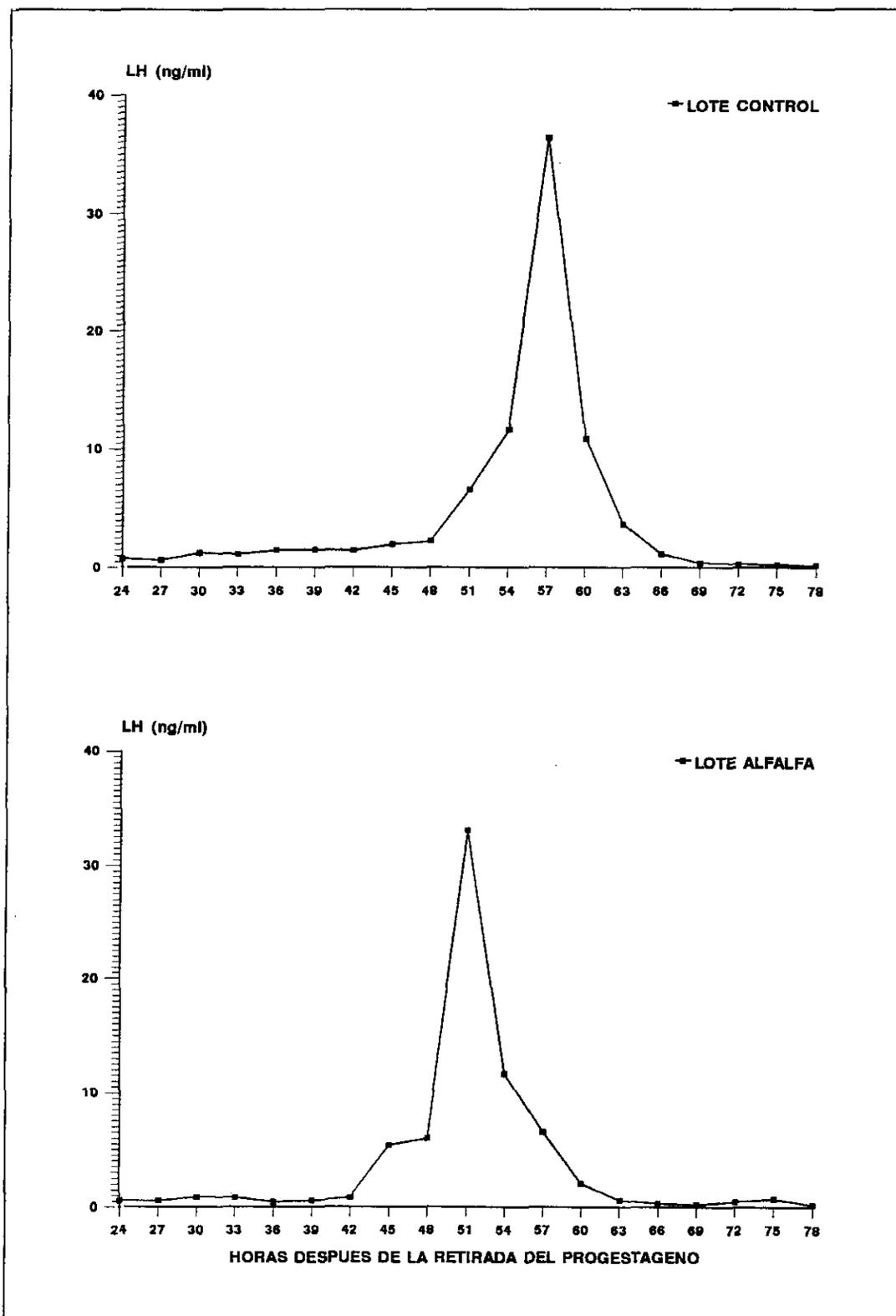


Figura 9: Perfiles medios de descarga preovulatoria de LH en los lotes alfalfa y control.



.- Progesterona:*1.- Primer ciclo:*

El modelo matemático al que se ajustan los valores de las concentraciones de progesterona correspondientes a los días 2, 6, 9, 13, 16 y 19 después de la retirada del progestágeno en el análisis de regresión, es la ecuación de una parábola. Los parámetros del modelo se exponen en la tabla 20.

**TABLA 20.-** Parámetros de la ecuación de regresión.

|         | $b_0$               | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|---------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|
| CONTROL | -0,5138<br>(0,0415) | 0,2837<br>(0,0071) | -0,0123<br>(0,0014) | 0,57*** |
| ALFALFA | -0,5664<br>(0,0374) | 0,2738<br>(0,0064) | -0,0120<br>(0,0013) | 0,58*** |

\*\*\*  $p < 0,001$ 

Las coordenadas de máximo fueron las siguientes:

|         | X (días) | Y (concentración $P_3$ ) |
|---------|----------|--------------------------|
| CONTROL | 11,53    | 1,12                     |
| ALFALFA | 11,4     | 0,99                     |

Las curvas fueron paralelas, lo que significa que la evolución en el tiempo del patrón de secreción de ambos lotes fue semejante, pero existieron diferencias significativas en cuanto al desplazamiento de las dos curvas, es decir, los términos independientes de las dos ecuaciones fueron distintos.

De esto se deduce que los valores alcanzados en el máximo por ambos grupos son también significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Durante el primer ciclo, el grupo control tuvo un nivel de secreción significativamente superior al grupo de alfalfa, aunque el máximo se alcanzó en los dos lotes al mismo tiempo.

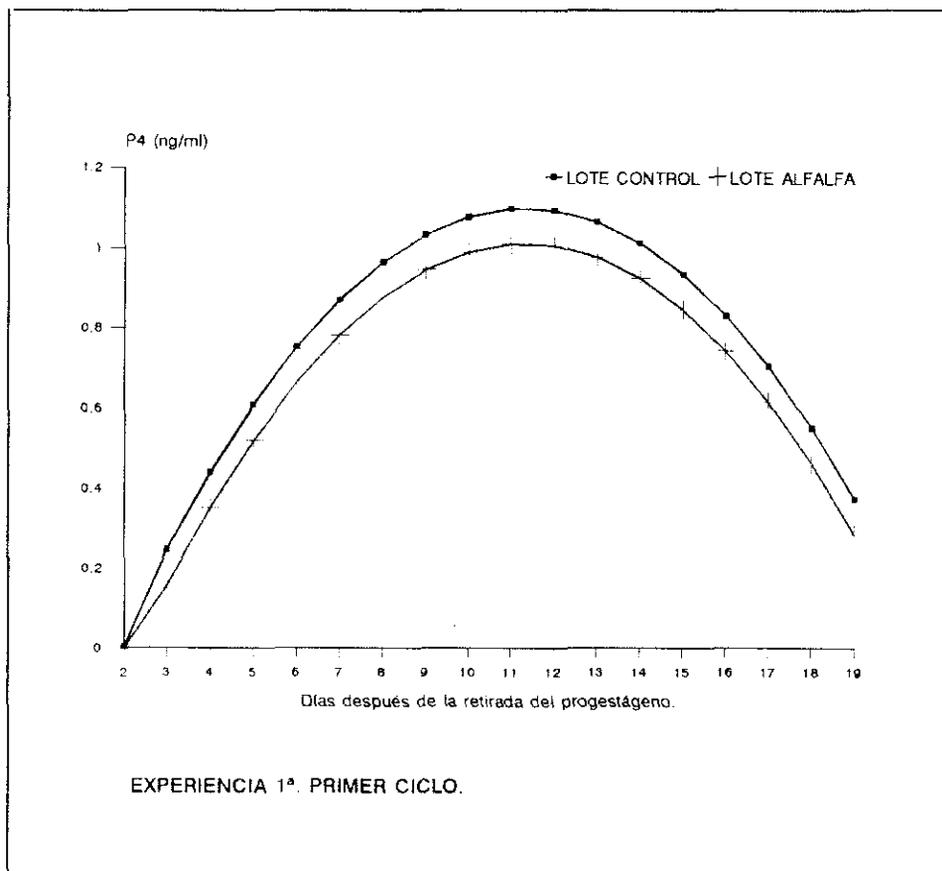
El ajuste definitivo se realiza mediante las dos curvas siguientes:

$$P_4(\text{control}) = -0,4778 + 0,2785x - 0,0123x^2$$

$$P_4(\text{alfalfa}) = -0,5664 + 0,2785x - 0,0123x^2$$

donde  $x$  toma los valores en días desde la extracción del progestágeno. En la figura N° 10 se representan los perfiles de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.

Figura 10: Perfiles de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



En el primer ciclo, la media de las concentraciones plasmáticas de progesterona de los 6 días, así como la correspondiente a cada uno de los días de muestreo, son siempre superiores en el lote control (tabla 21).

**TABLA 21.-** Concentraciones medias de progesterona plasmática (ng/ml) en los días 2, 6, 9, 13, 16 y 19 después de la retirada del progestágeno.

|                       | CONTROL     | ALFALFA     |
|-----------------------|-------------|-------------|
| P <sub>4</sub> Día 2  | 0,16 ± 0,02 | 0,11 ± 0,03 |
| P <sub>4</sub> Día 6  | 0,48 ± 0,06 | 0,33 ± 0,07 |
| P <sub>4</sub> Día 9  | 0,98 ± 0,11 | 0,81 ± 0,06 |
| P <sub>4</sub> Día 13 | 1,5 ± 0,09  | 1,2 ± 0,10  |
| P <sub>4</sub> Día 16 | 1,19 ± 0,10 | 0,92 ± 0,09 |
| P <sub>4</sub> Día 19 | 0,24 ± 0,05 | 0,11 ± 0,02 |
| P <sub>4</sub> (μ)    | 0,76 ± 0,06 | 0,58 ± 0,05 |

### 2. Segundo ciclo:

El modelo matemático al que se ajustan los valores de las concentraciones de progesterona correspondientes a los días 23, 27, 30, 34 y 37 después de la retirada del progestágeno en el análisis de regresión, es la ecuación de una parábola. Los parámetros del modelo se exponen en la tabla 22.

TABLA 22.- Parámetros de la ecuación de regresión.

|         | $b_0$               | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|---------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|
| CONTROL | -8,2172<br>(0,0473) | 0,6565<br>(0,0076) | -0,0116<br>(0,0014) | 0,51*** |
| ALFALFA | -6,8312<br>(0,0401) | 0,5377<br>(0,0065) | -0,0094<br>(0,0012) | 0,48*** |

\*\*\*  $p < 0,001$ 

Las coordenadas del máximo fueron las siguientes:

|         | X (días) | Y (concentración $P_4$ ) |
|---------|----------|--------------------------|
| CONTROL | 28,29    | 1,08                     |
| ALFALFA | 28,6     | 0,85                     |

Las dos curvas fueron paralelas, lo que implica que la evolución en el tiempo del patrón de secreción para ambos grupos de ovejas fue semejante. Sin embargo, las curvas están desplazadas, ya que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los valores de  $b_0$ . El nivel de secreción de progesterona fue significativamente mayor para el grupo control durante todo el período estudiado, aunque ambos lotes alcanzaron el máximo nivel al mismo tiempo.

Por tanto las ecuaciones definitivas son:

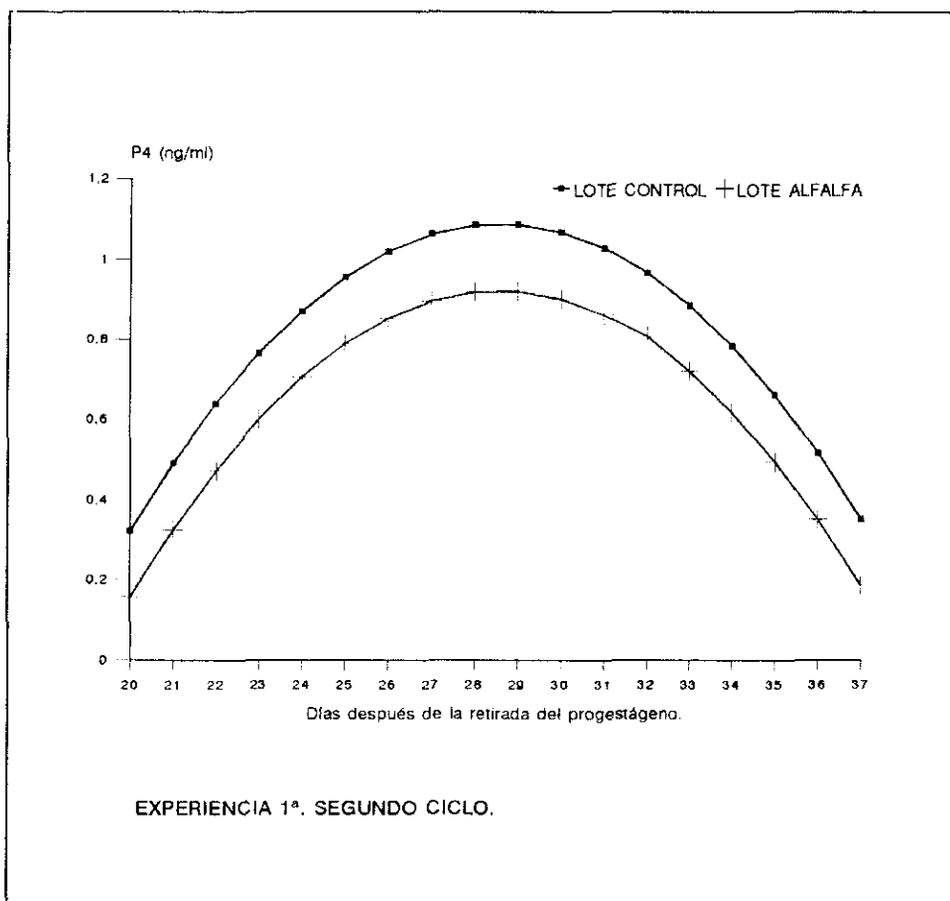
$$P_{4(\text{control})} = -7,4072 + 0,5945x - 0,04x^2$$

$$P_{4(\text{alfalfa})} = -7,5736 + 0,5945x - 0,04x^2$$

donde x toma los valores en días desde la retirada del progestágeno.

En la figura N° 11 se representan los perfiles de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.

Figura 11: Perfiles de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



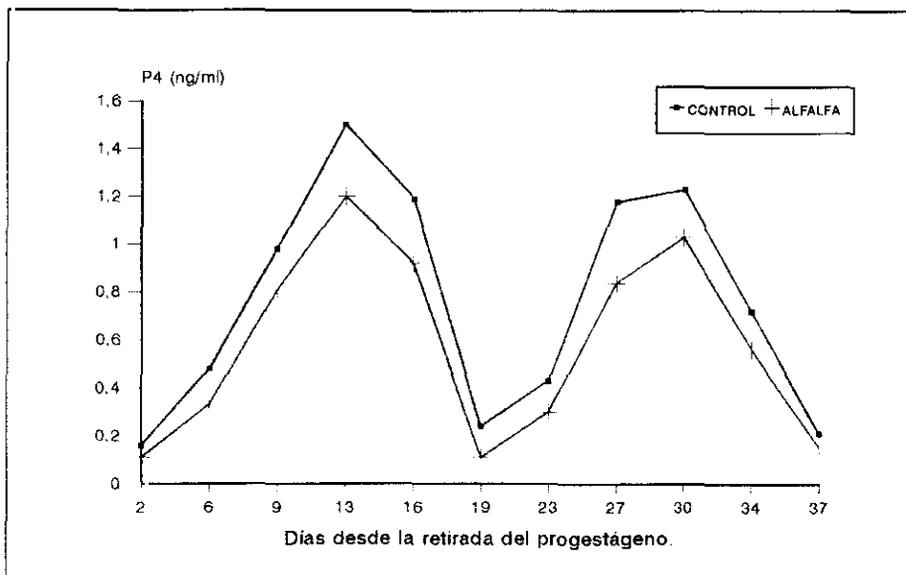
En el segundo ciclo, la media de las concentraciones de los cinco días, así como la correspondiente a cada día de muestreo, son siempre superiores en el lote control (tabla 23).

**TABLA 23.-** Concentraciones medias de progesterona plásmatica (ng/ml) de los días 23, 27, 30, 34 y 37 desde la retirada del progestágeno.

|                       | CONTROL     | ALFALFA     |
|-----------------------|-------------|-------------|
| P <sub>4</sub> Día 23 | 0,43 ± 0,06 | 0,3 ± 0,06  |
| P <sub>4</sub> Día 27 | 1,18 ± 0,12 | 0,84 ± 0,09 |
| P <sub>4</sub> Día 30 | 1,23 ± 0,11 | 1,03 ± 0,11 |
| P <sub>4</sub> Día 34 | 0,72 ± 0,17 | 0,56 ± 0,16 |
| P <sub>4</sub> Día 37 | 0,21 ± 0,02 | 0,15 ± 0,04 |
| P <sub>4</sub> (μ)    | 0,75 ± 0,13 | 0,57 ± 0,10 |

En la figura 12 se representa la evolución de las concentraciones plasmáticas de progesterona a lo largo de los dos ciclos del otoño de 1991.

Figura 12: Evolución de las concentraciones plasmáticas de progesterona a lo largo de los dos ciclos del otoño de 1991.



- Experiencia 2.- Pastoreo corto en primavera.

LH:

El análisis de regresión de las concentraciones plasmáticas de LH durante el período de descarga preovulatoria, indica que los perfiles de secreción son diferentes para los dos lotes de ovejas (figura 13). Ambos se ajustan al modelo matemático campana de Gauss. Las estimas de los parámetros del modelo se exponen en la tabla 24, junto con la desviación típica asintótica.

**TABLA 24.-** Estimaciones de los parámetros del modelo de regresión.

|         | A              | S               | M              | B                | r <sup>2</sup> |
|---------|----------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|
| CONTROL | 1,13<br>(1,27) | 0,61<br>(0,06)  | 0,08<br>(0,28) | 93,83<br>(13,48) | 0,68***        |
| ALFALFA | 1,35<br>(0,60) | -0,41<br>(0,03) | 0,30<br>(0,23) | -29,83<br>(4,29) | 0,66***        |

\*\*\* p<0,001

Las ecuaciones de regresión para los perfiles de descarga preovulatoria en cada uno de los lotes son las siguientes:

$$LH_{(control)} = 1,13 + 60,76 e^{-\frac{(x-0,08)^2}{0,76}}$$

$$LH_{(alfalfa)} = 1,35 + 28,73 e^{-\frac{(x-0,31)^2}{0,34}}$$

Sin embargo, como se aprecia en la tabla 25, no existieron diferencias significativas entre los dos grupos de estudio para ninguno de los tres parámetros

estudiados. El grupo control tuvo una concentración máxima de LH en el pico preovulatorio considerablemente mayor que el lote de alfalfa (61,67 ng/ml vs 30,54 ng/ml), pero esta diferencia no resultó estadísticamente significativa debido al escaso número de animales que presentaron pico de LH en el lote control y la variabilidad que existió en las concentraciones, lo que hace que tenga un error standard alto. Se detectaron picos de LH en un 28% de ovejas del lote control y en un 57% en el lote de alfalfa.

**TABLA 25.-** Concentraciones basales de LH (ng/ml), concentraciones máximas en el pico preovulatorio (ng/ml) e intervalos comprendidos entre la retirada del progestágeno y el pico preovulatorio de LH.

|             | CONTROL       | ALFALFA      |
|-------------|---------------|--------------|
| [LH] basal  | 0,26 ± 0,4    | 0,59 ± 0,22  |
| [LH] máxima | 61,67 ± 22,12 | 30,54 ± 7,84 |
| Horas       | 61,5 ± 6,76   | 60,5 ± 4,41  |

En la figura 14 se representan los perfiles medios de descarga preovulatoria de LH en los dos grupos, ajustando a la hora cero las concentraciones plasmáticas máximas de LH en el pico preovulatorio.

Figura 13:Perfiles de descarga preovulatoria de LH según los modelos de regresión en los dos lotes de ovejas.

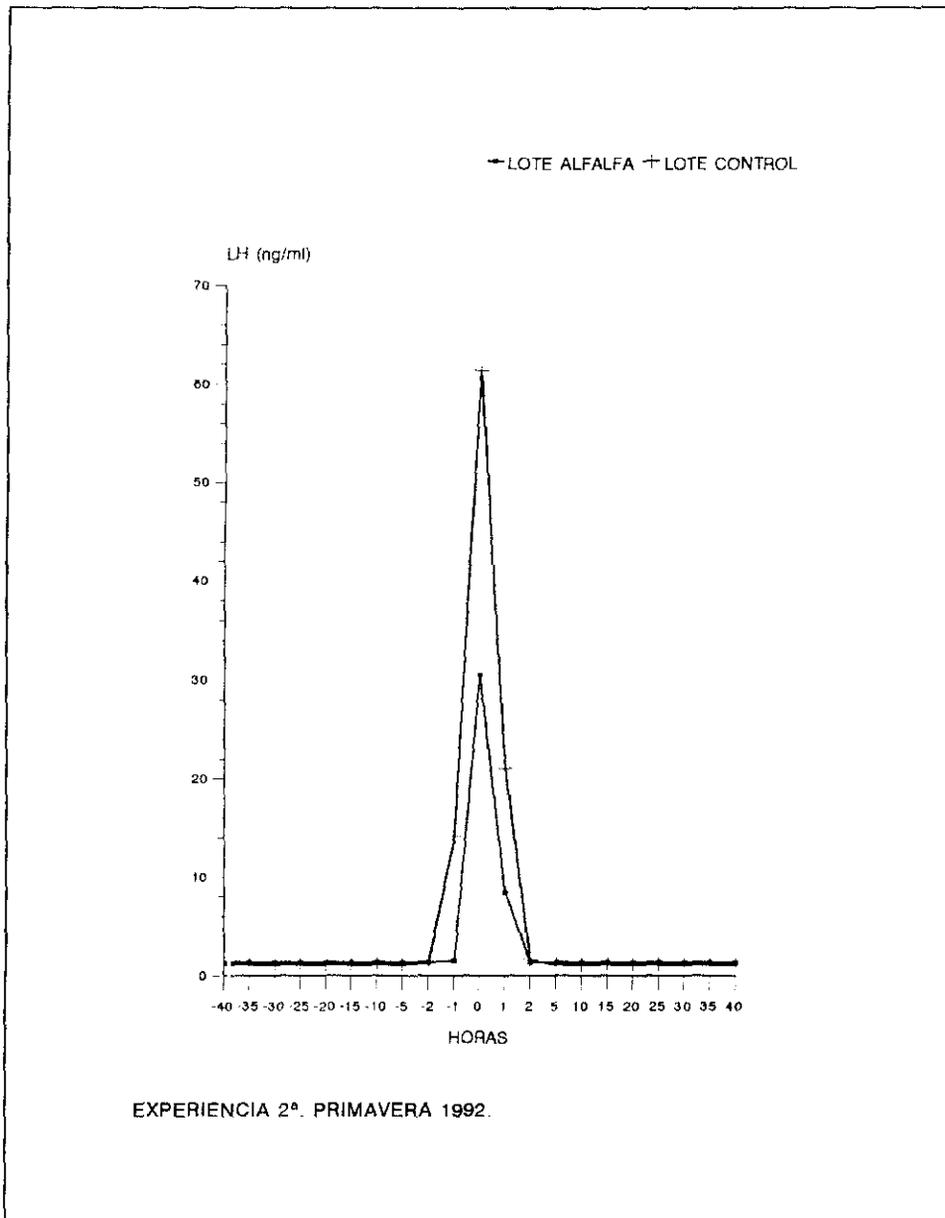
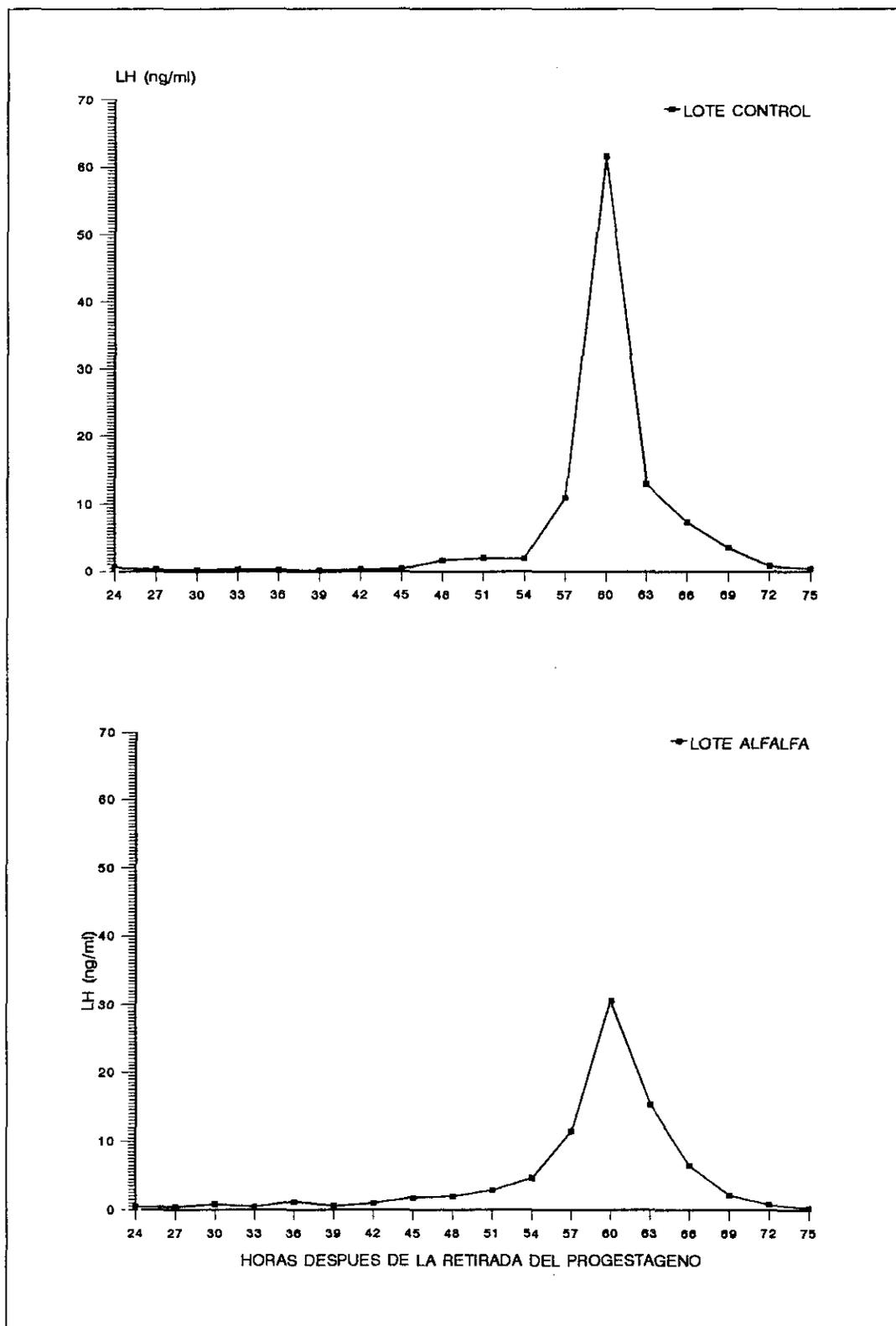


Figura 14: Perfiles medios de descarga preovulatoria de LH en los lotes alfalfa y control.



.- Progesterona:

*1.- Primer ciclo:*

El modelo matemático al que se ajustan los valores de las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes a los días 2, 5, 11, 16, 19 y 23 después de la retirada del progestágeno en el análisis de regresión, es la ecuación de una parábola. Los parámetros del modelo se exponen en la tabla 26.

**TABLA 26.-** Parámetros de la ecuación de regresión.

|         | $b_0$               | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|---------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|
| CONTROL | -0,3928<br>(0,0536) | 0,1606<br>(0,0076) | -0,0062<br>(0,0012) | 0,56*** |
| ALFALFA | -0,2603<br>(0,0326) | 0,1197<br>(0,0046) | -0,0045<br>(0,0007) | 0,40*** |

\*\*\*  $p < 0,001$

Las coordenadas de máximo fueron las siguientes:

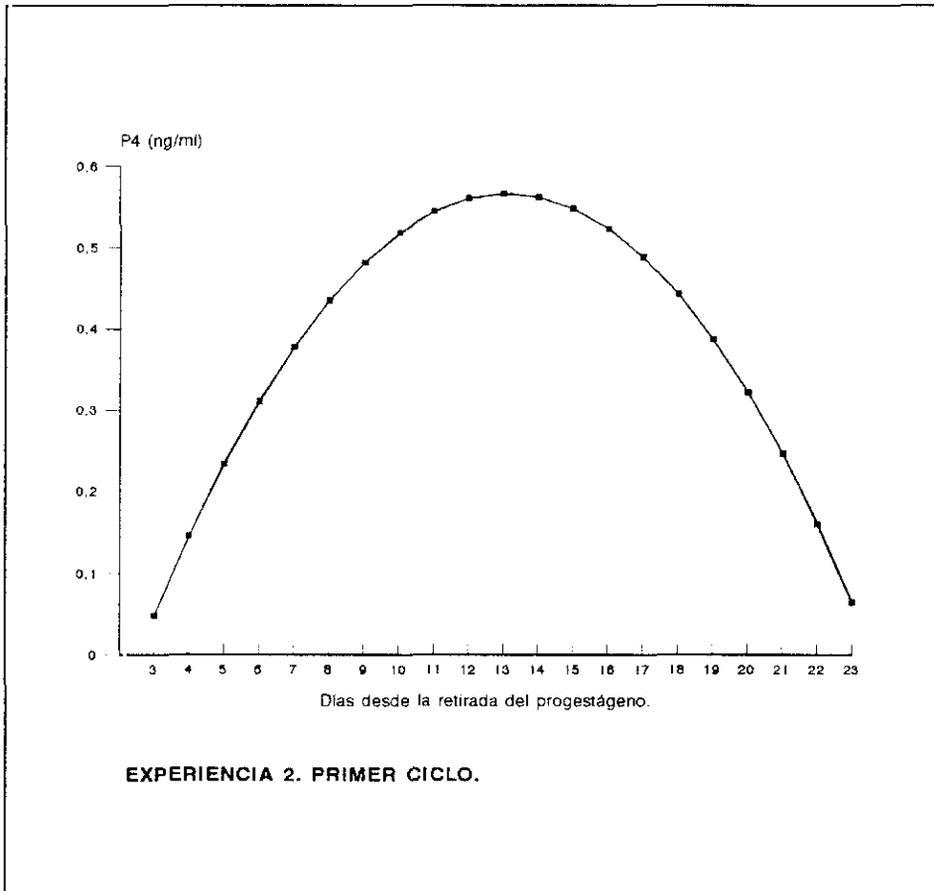
|         | X (días) | Y (concentración $P_4$ ) |
|---------|----------|--------------------------|
| CONTROL | 12,95    | 0,64                     |
| ALFALFA | 13,3     | 0,54                     |

Las curvas resultaron paralelas y además el desplazamiento entre ambas no fue significativo, por lo que el perfil de secreción de progesterona se ajusta en los dos lotes a la siguiente ecuación (figura 15).

$$P_4 = -0,3056 + 0,1334x - 0,0051x^2$$

donde x toma los valores en días desde la retirada del progestágeno

Figura 15: Perfil de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



En la tabla 27 se expone la media de las concentraciones de los 7 días, así como la correspondiente a cada día de muestreo.

**TABLA 27.-** Concentraciones medias de progesterona plasmática (ng/ml) correspondientes a los días 2, 5, 9, 11, 16, 19 y 23 desde la retirada del progestágeno.

|                       | CONTROL     | ALFALFA     |
|-----------------------|-------------|-------------|
| P <sub>4</sub> Día 2  | 0,03 ± 0,03 | 0,05 ± 0,04 |
| P <sub>4</sub> Día 5  | 0,04 ± 0,04 | 0,09 ± 0,06 |
| P <sub>4</sub> Día 9  | 0,46 ± 0,09 | 0,34 ± 0,07 |
| P <sub>4</sub> Día 11 | 0,71 ± 0,07 | 0,62 ± 0,03 |
| P <sub>4</sub> Día 16 | 0,9 ± 0,13  | 0,84 ± 0,13 |
| P <sub>4</sub> Día 19 | 0,13 ± 0,06 | 0,16 ± 0,07 |
| P <sub>4</sub> Día 23 | 0,06 ± 0,05 | 0,14 ± 0,01 |
| P <sub>4</sub> (μ)    | 0,34 ± 0,13 | 0,3 ± 0,11  |

*2.- Segundo ciclo:*

El modelo matemático al que se ajustan los valores de las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes a los días 26, 30, 33 y 37 después de la retirada del progestágeno en el análisis de regresión, es la ecuación de una parábola. Los parámetros del modelo se exponen en la tabla 28.

**TABLA 28.-** Parámetros de la ecuación de regresión.

|         | b <sub>0</sub>      | b <sub>1</sub>     | b <sub>2</sub>      | r <sup>2</sup> |
|---------|---------------------|--------------------|---------------------|----------------|
| CONTROL | -5,5907<br>(3,5547) | 0,4260<br>(0,2168) | -0,0072<br>(0,0032) | 0,56***        |
| ALFALFA | -6,8127<br>(0,0567) | 0,5025<br>(0,0108) | -0,0084<br>(0,0022) | 0,30**         |

\*\*\* p<0,001

\*\* p<0,01

Las coordenadas del máximo fueron las siguientes:

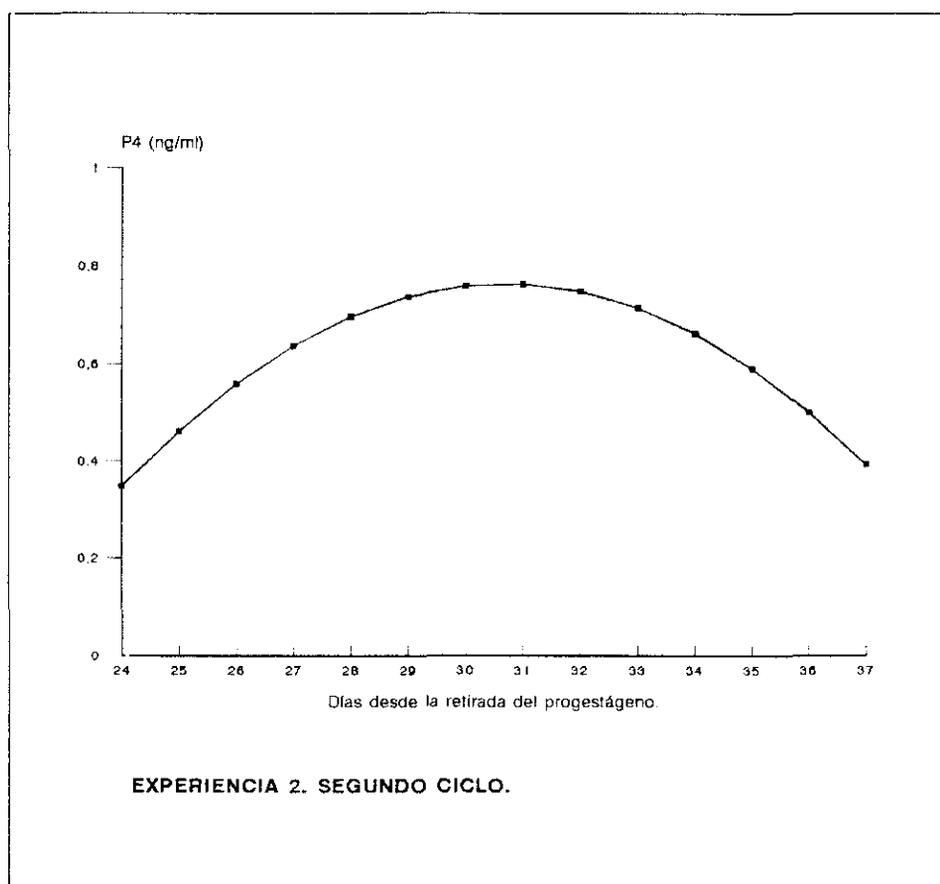
|         | X (días) | Y (concentración P <sub>4</sub> ) |
|---------|----------|-----------------------------------|
| CONTROL | 29,58    | 0,70                              |
| ALFALFA | 29,91    | 0,70                              |

Las curvas resultaron paralelas y el desplazamiento entre ambas no fue significativo, por lo que el perfil de secreción de progesterona se ajusta en los dos lotes a la siguiente ecuación:

$$P_4 = -7,9951 + 0,5708x - 0,0093x^2$$

El perfil de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal se representa en la figura 16.

Figura 16: Perfil de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



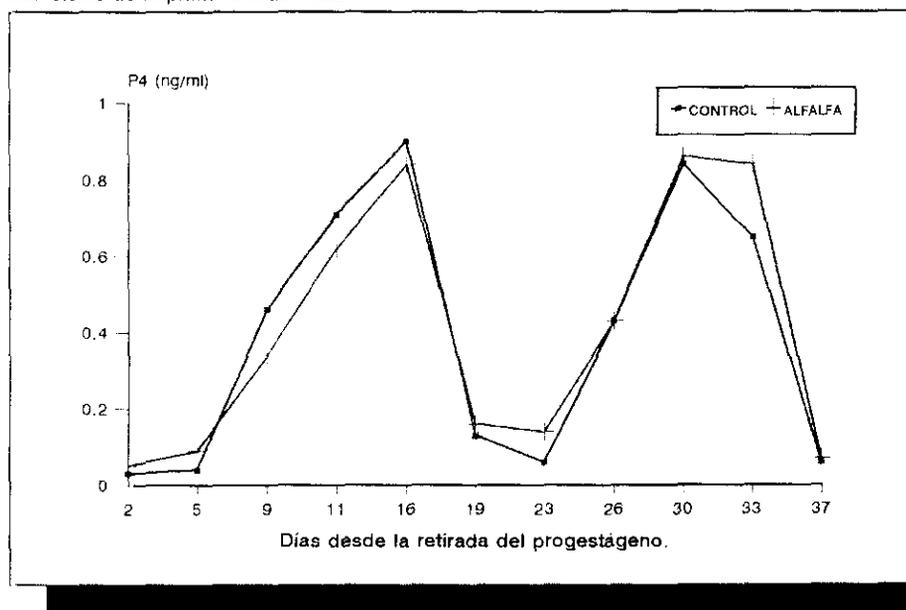
En la tabla 29 se expone la media de las concentraciones de los 4 días, así como la correspondiente a cada día de muestreo.

**TABLA 29.-** Concentraciones medias de progesterona plasmática (ng/ml) correspondientes a los días 26, 30, 33 y 37 desde la retirada del progestágeno.

|                          | CONTROL   | ALFALFA   |
|--------------------------|-----------|-----------|
| P <sub>4</sub> Día 26    | 0,43±0,12 | 0,43±0,05 |
| P <sub>4</sub> Día 30    | 0,84±0,21 | 0,86±0,12 |
| P <sub>4</sub> Día 33    | 0,65±0,13 | 0,84±0,09 |
| P <sub>4</sub> Día 37    | 0,06±0,02 | 0,07±0,01 |
| P <sub>4</sub> ( $\mu$ ) | 0,50±0,15 | 0,55±0,15 |

Por tanto, en primavera no existieron diferencias significativas en los perfiles de secreción de progesterona entre los lotes control y alfalfa. En la figura 17 se representa la evolución de las concentraciones plasmáticas de progesterona a lo largo de los dos ciclos de la primavera de 1992.

Figura 17: Evolución de las concentraciones plasmáticas de progesterona a lo largo de los dos ciclos de la primavera de 1992.



- Experiencia 3.- Pastoreo largo (otoño de 1992).

LH:

La curva de regresión que tipifica el perfil de descarga preovulatoria de LH, se ajusta al modelo matemático campana de Gauss. En la tabla 30 se exponen los parámetros del modelo.

**TABLA 30.-** Estimaciones de los parámetros del modelo de regresión.

|         | A    | S    | M    | B      |
|---------|------|------|------|--------|
| CONTROL | 2,25 | 2,01 | 0,52 | 289,15 |
| ALFALFA | 2,60 | 2,46 | 0,64 | 281,41 |

El perfil de descarga preovulatoria de LH fue igual para ambos lotes de ovejas (figura 18), no existiendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambas curvas, por lo que el perfil de secreción de los dos lotes se ajusta a la siguiente ecuación:

$$LH = 2,56 + 51,54 e^{-\frac{(x-0,56)^2}{0,42}}$$

cuyos parámetros junto con la desviación típica asintótica se exponen a continuación:

| A              | B               | M              | S              | r <sup>2</sup> |
|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| 2,56<br>(0,93) | 59,32<br>(6,46) | 0,56<br>(0,15) | 0,46<br>(0,03) | 0,55***        |

\*\*\*  $p < 0,001$

Se detectó pico de LH en un 93% de las ovejas controles y en un 86% de las ovejas del lote de alfalfa. Según se aprecia en la tabla 31, no existieron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales para ninguno de los tres parámetros estudiados.

Figura 18: Perfil de descarga preovulatoria de LH según el modelo de regresión estimado para los dos lotes de ovejas.

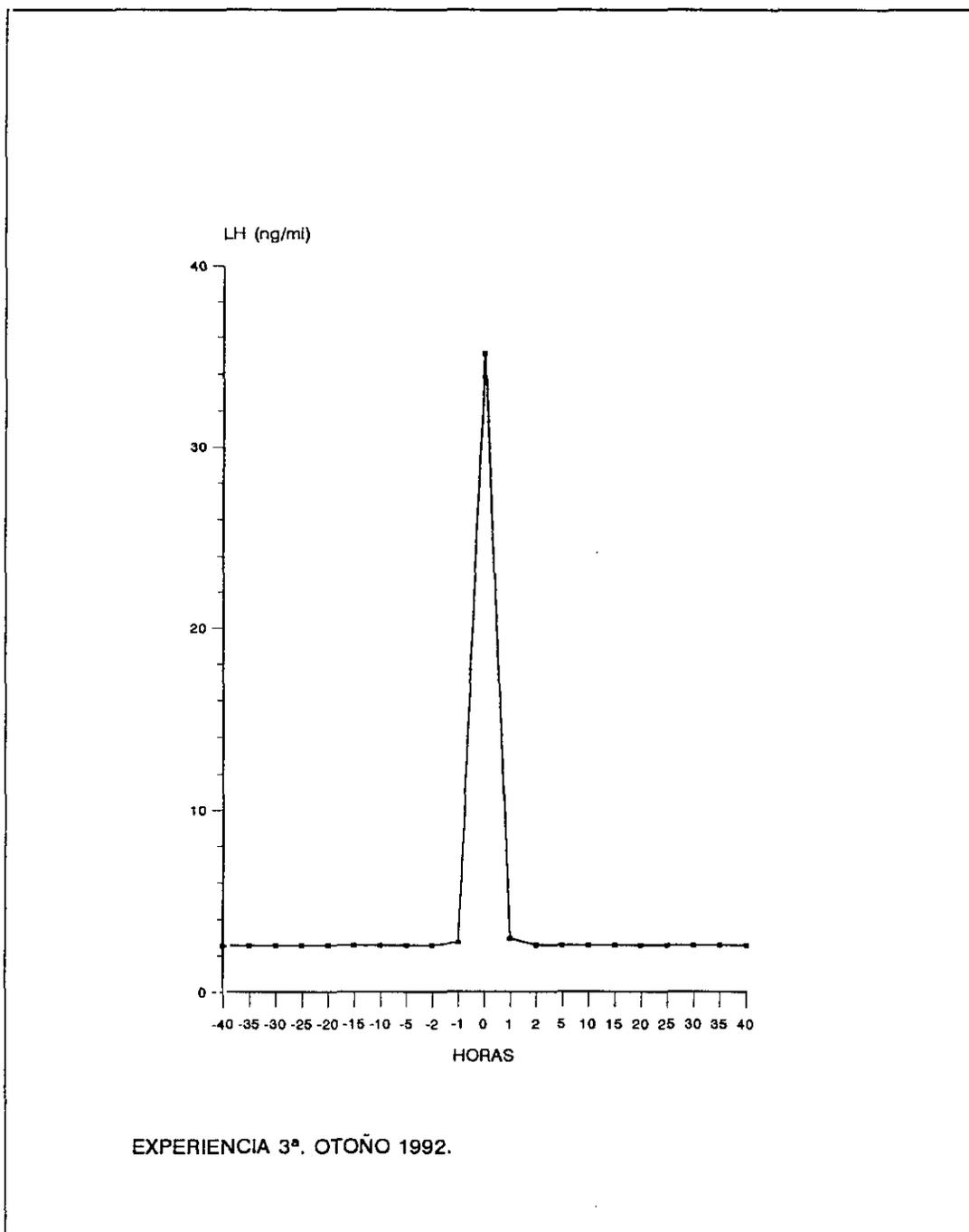
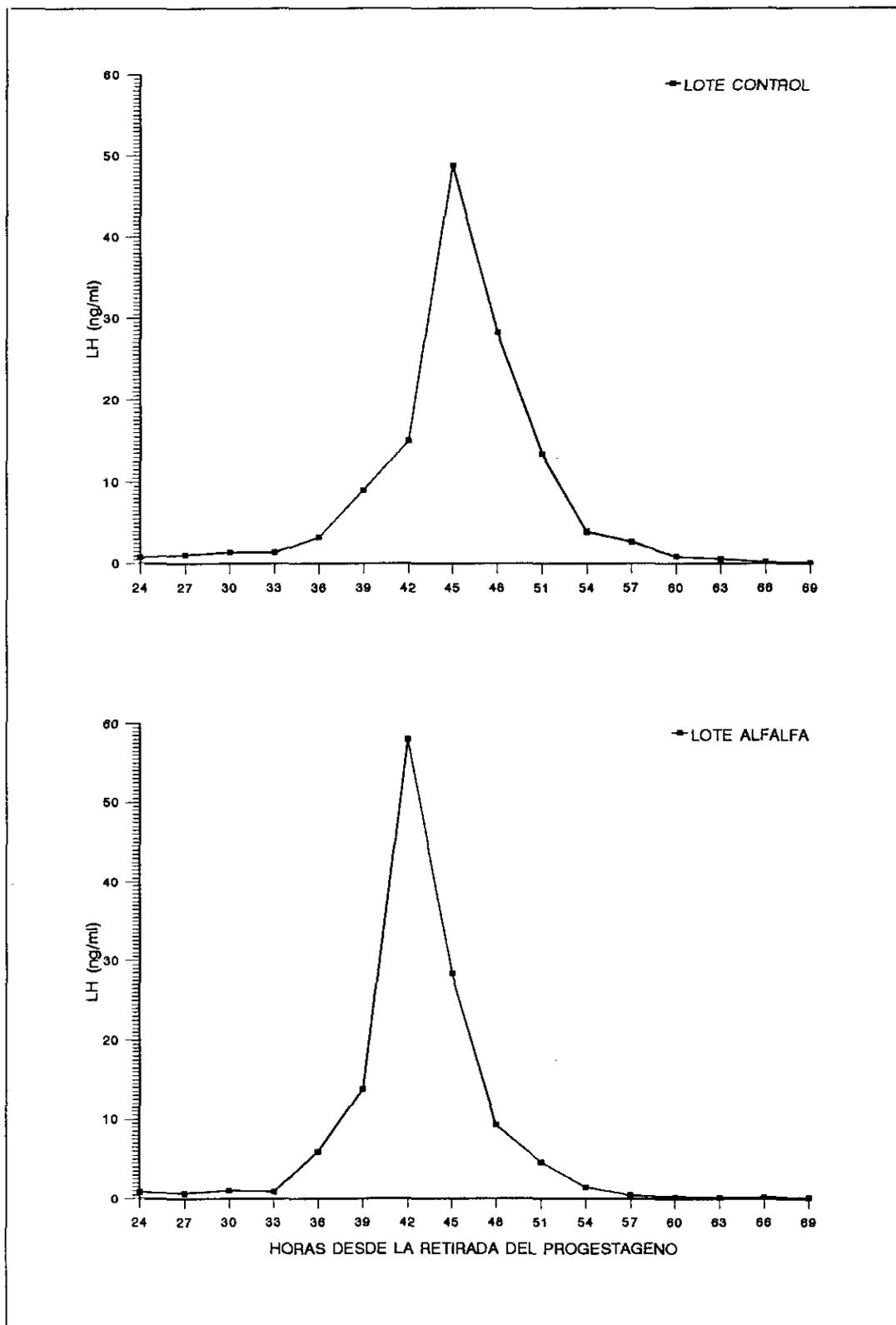


Figura 19: Perfiles medios de descarga preovulatoria de LH en los lotes alfalfa y control.



**TABLA 31.-** Concentraciones basales de LH (ng/ml), concentraciones máximas en el pico preovulatorio (ng/ml) e intervalos comprendidos entre la retirada del progestágeno y el pico preovulatorio de LH (horas).

|             | CONTROL    | ALFALFA     |
|-------------|------------|-------------|
| [LH] basal  | 1,16±0,23  | 0,90±0,15   |
| [LH] máxima | 48,81±8,46 | 58,05±11,53 |
| Horas       | 46,38±1,68 | 43,75±1,86  |

En la figura 19 se representan los perfiles medios de descarga preovulatoria de LH en los dos grupos, ajustando a la hora cero las concentraciones plasmáticas máximas de LH en el pico preovulatorio.

*.- Progesterona:*

*.- Primer ciclo:*

El modelo matemático al que se ajustan los valores de las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes a los días 3, 7, 10, 15, 17 y 21 después de la retirada del progestágeno en el análisis de regresión lineal es la ecuación de una parábola. Los parámetros del modelo se exponen en la tabla 32.

**TABLA 32.-** Estimaciones de los parámetros de la ecuación de regresión.

|         | $b_0$               | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|---------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|
| CONTROL | -0,1275<br>(0,4424) | 0,2092<br>(0,0062) | -0,0091<br>(0,0010) | 0,70*** |
| ALFALFA | -0,0291<br>(0,5251) | 0,1755<br>(0,0074) | -0,0074<br>(0,0012) | 0,30*** |

\*\*\*  $p < 0,001$

Las coordenadas del máximo son las siguientes:

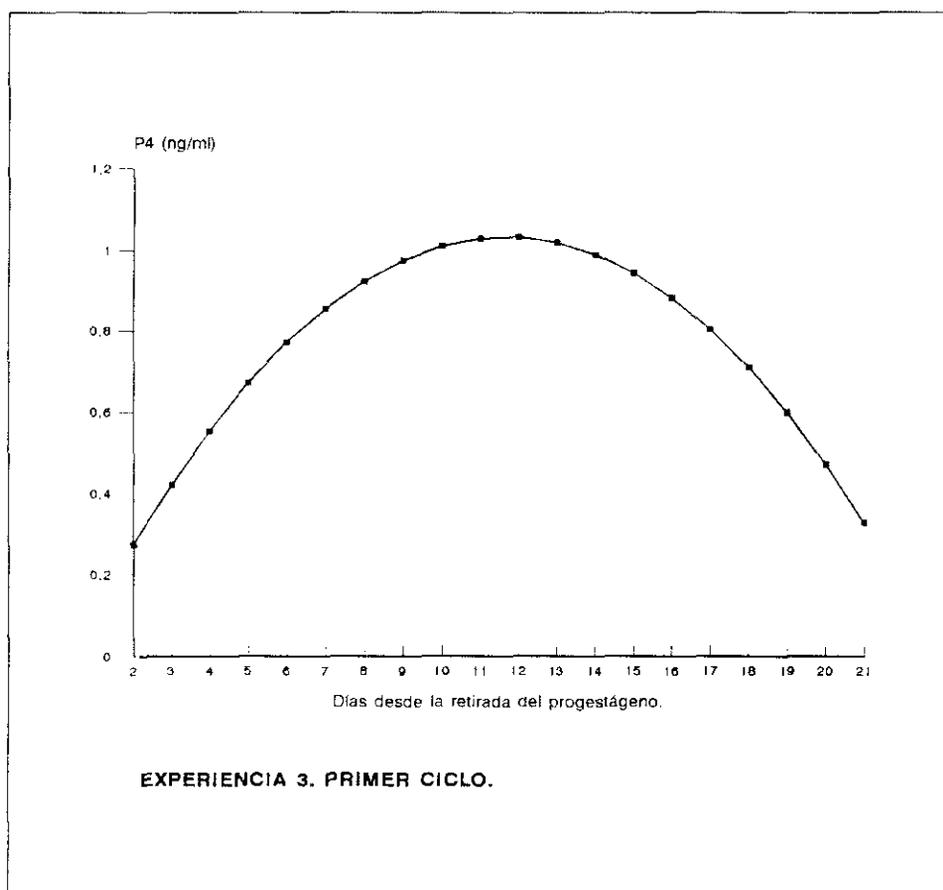
|         | X (días) | Y (concentración P <sub>4</sub> ) |
|---------|----------|-----------------------------------|
| CONTROL | 11,37    | 1,06                              |
| ALFALFA | 11,7     | 0,99                              |

Las curvas resultaron paralelas y además el desplazamiento entre ambas no fue significativo, por lo que ajustan al mismo modelo (figura 20):

$$P_4 = -0,0722 + 0,1892x - 0,0081x^2$$

No existieron diferencias significativas en cuanto a la evolución del perfil de secreción y a niveles máximos.

Figura 20: Perfil de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



En la tabla 33 se exponen la media de las concentraciones de los seis días, así como la correspondiente a cada día de muestreo, no existiendo diferencias significativas entre ambos lotes.

**TABLA 33.-** Concentraciones medias de progesterona plasmática (ng/ml) correspondientes a los días 3, 7, 10, 15, 17 y 21 después de la retirada del progestágeno.

|                       | CONTROL   | ALFALFA   |
|-----------------------|-----------|-----------|
| P <sub>4</sub> Día 3  | 0,10±0,02 | 0,22±0,11 |
| P <sub>4</sub> Día 7  | 0,71±0,11 | 0,75±0,14 |
| P <sub>4</sub> Día 10 | 1,19±0,15 | 0,95±0,12 |
| P <sub>4</sub> Día 15 | 1,14±0,14 | 1,20±0,19 |
| P <sub>4</sub> Día 17 | 0,44±0,13 | 0,72±0,16 |
| P <sub>4</sub> Día 21 | 0,23±0,05 | 0,27±0,13 |
| P <sub>4</sub> (μ)    | 0,63±0,17 | 0,68±0,15 |

*.- Segundo ciclo:*

El modelo matemático al que se ajustan los valores de las concentraciones de progesterona correspondientes a los días 24, 28, 31, 35 y 38 después de la retirada del progestágeno es la ecuación de una parábola. Los parámetros del modelo se exponen en la tabla 34.

**TABLA 34.-** Estimaciones de los parámetros de la ecuación de regresión.

|         | $b_0$                | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|---------|----------------------|--------------------|---------------------|---------|
| CONTROL | -12,5729<br>(0,0606) | 0,9486<br>(0,0102) | -0,0162<br>(0,0021) | 0,45*** |
| ALFALFA | -10,1633<br>(0,0608) | 0,7813<br>(0,0103) | -0,0134<br>(0,0021) | 0,34*** |

\*\*\*  $p < 0,001$ 

Las coordenadas del máximo fueron las siguientes:

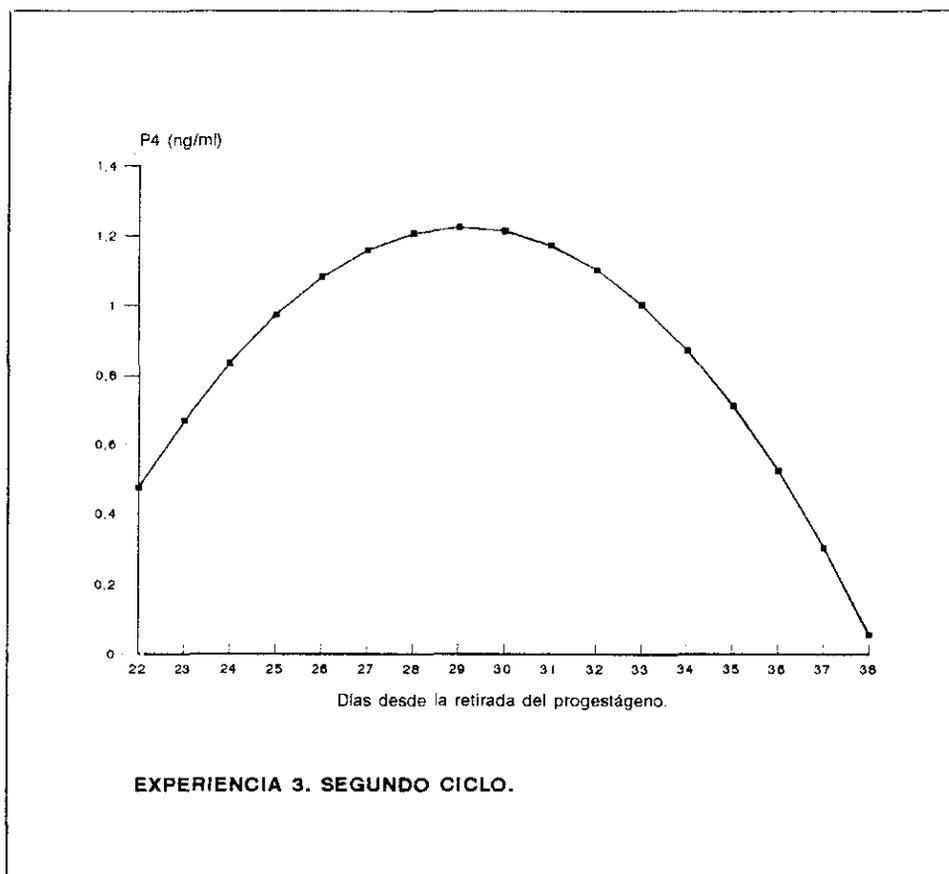
|         | X (Días) | Y (concentración $P_4$ ) |
|---------|----------|--------------------------|
| CONTROL | 29,28    | 1,31                     |
| ALFALFA | 29,15    | 1,22                     |

No existieron diferencias significativas entre las curvas, por lo que el perfil de secreción de progesterona se ajusta en los dos lotes a la siguiente ecuación (figura 21):

$$P_4 = -11,3235 + 0,8619x - 0,0148x^2$$

En la tabla 35 se exponen la media de las concentraciones de los cinco días, así como la correspondiente a cada día de muestreo, no existiendo diferencias entre ambos lotes.

Figura 21: Perfil de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.

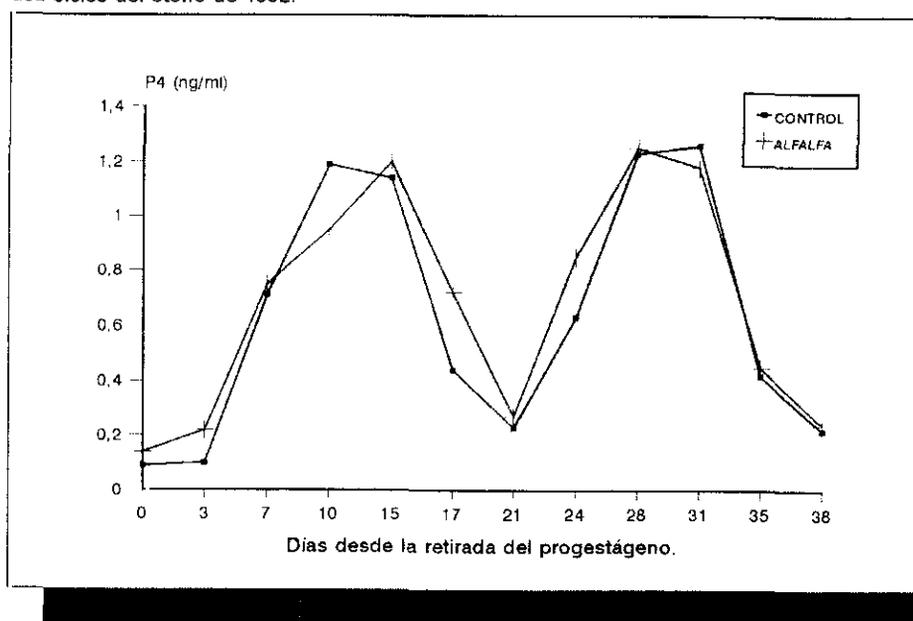


**TABLA 35.-** Concentraciones medias de progesterona plasmática (ng/ml) correspondientes a los días 24, 28, 31, 35 y 38 después de la retirada del progestágeno.

|                       | CONTROL     | ALFALFA     |
|-----------------------|-------------|-------------|
| P <sub>4</sub> Día 24 | 0,63 ± 0,11 | 0,85 ± 0,19 |
| P <sub>4</sub> Día 28 | 1,23 ± 0,12 | 1,25 ± 0,19 |
| P <sub>4</sub> Día 31 | 1,26 ± 0,24 | 1,18 ± 0,14 |
| P <sub>4</sub> Día 35 | 0,42 ± 0,17 | 0,45 ± 0,11 |
| P <sub>4</sub> Día 38 | 0,22 ± 0,06 | 0,24 ± 0,09 |
| P <sub>4</sub> (μ)    | 0,75 ± 0,24 | 0,79 ± 0,20 |

Por tanto, en el segundo otoño, cuando las ovejas del lote problema habían pastado durante un año alfalfa, no existieron diferencias significativas en los perfiles de secreción de progesterona. En la figura 22 se representa la evolución de las concentraciones de progesterona a lo largo de los dos ciclos del otoño de 1992.

Figura 22: Evolución de las concentraciones plasmáticas de progesterona a lo largo de los dos ciclos del otoño de 1992.



#### 4.3.2.- Efecto de la estación y el pastoreo de alfalfa sobre los perfiles hormonales de LH y progesterona.

##### - LH:

El análisis de varianza para los factores tipo de dieta (alfalfa y control) y estación (otoño de 1991-primavera 1992), demostró que ninguno de los dos factores ni sus interacciones resultaron significativos para las variables en estudio (nivel basal, concentración máxima en el pico preovulatorio y horas transcurridas desde la retirada del progestágeno al pico de LH).

- Progesterona:

Al comparar los perfiles de secreción de progesterona del lote de alfalfa entre el primer otoño y la primavera se observó que durante el primer ciclo los patrones de secreción fueron diferentes para las dos estaciones, ajustando a curvas distintas, como se aprecia en la figura 23. Los parámetros del modelo se exponen en la tabla 36.

**TABLA 36.-** Parámetros de las ecuaciones de regresión para las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes al primer otoño y la primavera del lote de alfalfa (1<sup>er</sup> ciclo).

|           | $b_0$               | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|-----------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|
| OTOÑO     | -0,5664<br>(0,0374) | 0,2738<br>(0,0064) | -0,0120<br>(0,0013) | 0,58*** |
| PRIMAVERA | -0,2603<br>(0,0326) | 0,1197<br>(0,0046) | -0,0045<br>(0,0007) | 0,40*** |

\*\*\*  $p < 0,001$

Las coordenadas del máximo fueron las siguientes:

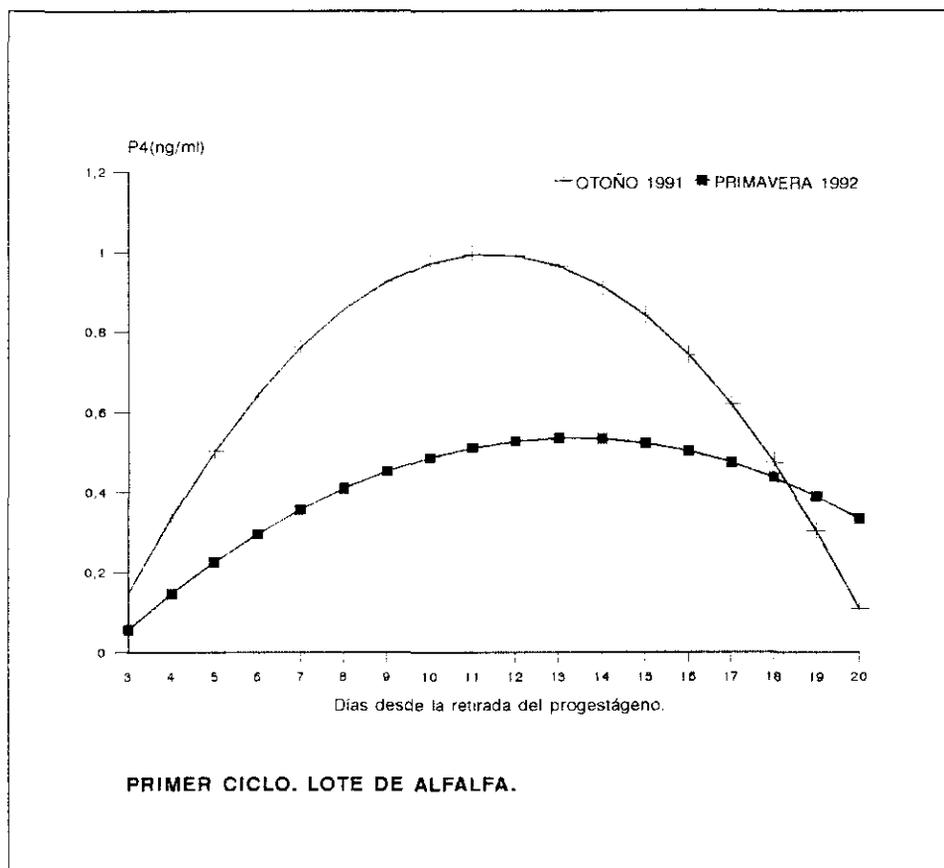
|           | X (Días) | Y (Concentración $P_4$ ) |
|-----------|----------|--------------------------|
| OTOÑO     | 11,4     | 0,99                     |
| PRIMAVERA | 13,3     | 0,53                     |

Las ecuaciones de regresión para los perfiles de secreción de progesterona en cada una de las estaciones son las siguientes:

$$P_{4(\text{otoño})} = -0,0120x^2 + 0,2738x - 0,5664$$

$$P_{4(\text{primavera})} = -0,0045x^2 + 0,1197x - 0,2603$$

Figura 23: Perfiles de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



Las curvas, por tanto, fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) presentando distinta evolución en el tiempo y distinta concentración. En otoño se alcanzó antes el máximo y la concentración fue mayor.

Los parámetros de las ecuaciones de regresión para el segundo ciclo se exponen en la tabla 37.

**TABLA 37.-** Parámetros de las ecuaciones de regresión para las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes al 1<sup>er</sup> otoño y la primavera del lote de alfalfa (2° ciclo).

|           | $b_0$               | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|-----------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|
| OTOÑO     | -6,8312<br>(0,0401) | 0,5377<br>(0,0065) | -0,0094<br>(0,0012) | 0,48*** |
| PRIMAVERA | -6,8127<br>(0,0567) | 0,5025<br>(0,0108) | -0,0084<br>(0,0022) | 0,30**  |

\*\*\*  $p < 0,001$

\*\*  $p < 0,01$

Las coordenadas del máximo fueron la siguientes:

|           | X (días) | Y (concentración $P_4$ ) |
|-----------|----------|--------------------------|
| OTOÑO     | 28,6     | 0,85                     |
| PRIMAVERA | 29,9     | 0,70                     |

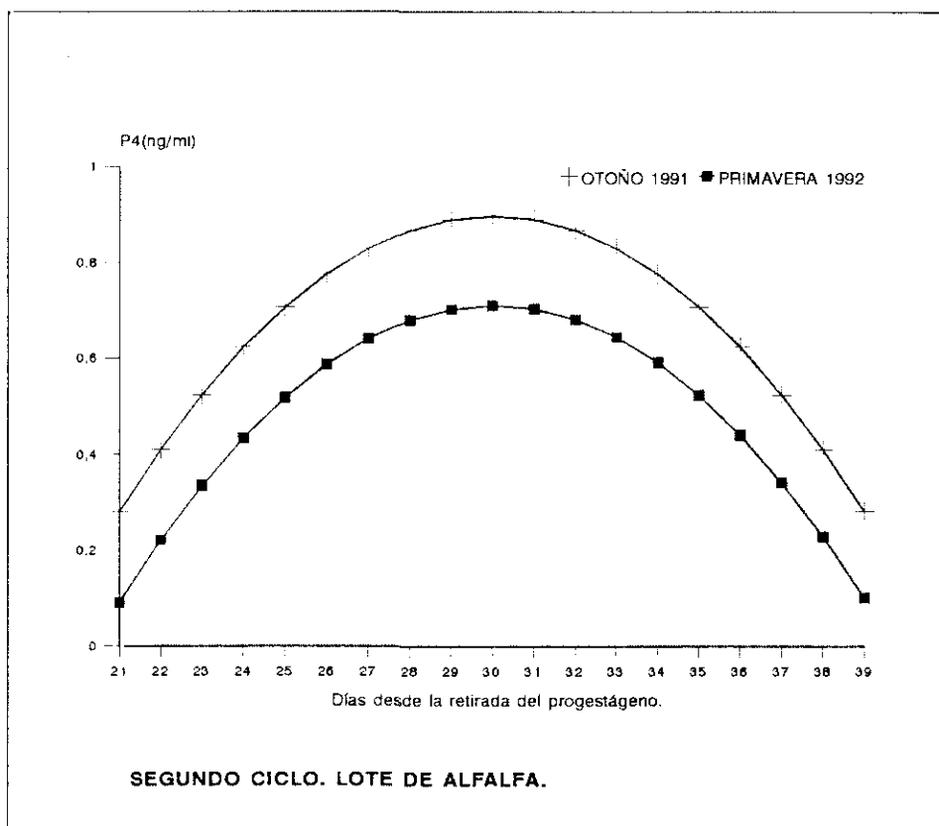
Como se observa en la figura 24, las curvas resultaron paralelas pero desplazadas, es decir, la evolución en el tiempo resultó igual en ambas estaciones, aunque en otoño se alcanzó una concentración significativamente superior ( $p < 0,05$ ).

El ajuste definitivo se realiza por las siguientes ecuaciones:

$$P_{4(\text{otoño})} = -0,0076x^2 + 0,4565x - 5,9425$$

$$P_{4(\text{primavera})} = -0,0076x^2 + 0,4565x - 6,1435$$

Figura 24: Perfiles de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



Se realizó la misma comparación con los lotes control de las dos estaciones, resultando que en el primer ciclo los perfiles de secreción fueron distintos. Los parámetros del modelo se exponen en la tabla 38.

**TABLA 38.-** Parámetros de las ecuaciones de regresión para las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes al 1<sup>er</sup> otoño y la primavera del lote control (1<sup>er</sup> ciclo).

|           | $b_0$               | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|-----------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|
| OTOÑO     | -0,5138<br>(0,0415) | 0,2837<br>(0,0071) | -0,0123<br>(0,0014) | 0,57*** |
| PRIMAVERA | -0,3928<br>(0,0536) | 0,1606<br>(0,0076) | -0,0062<br>(0,0012) | 0,56*** |

\*\*\*  $p < 0,001$

Las coordenadas del máximo fueron las siguientes:

|           | X (días) | Y (concentración P <sub>4</sub> ) |
|-----------|----------|-----------------------------------|
| OTOÑO     | 11,53    | 1,12                              |
| PRIMAVERA | 12,95    | 0,64                              |

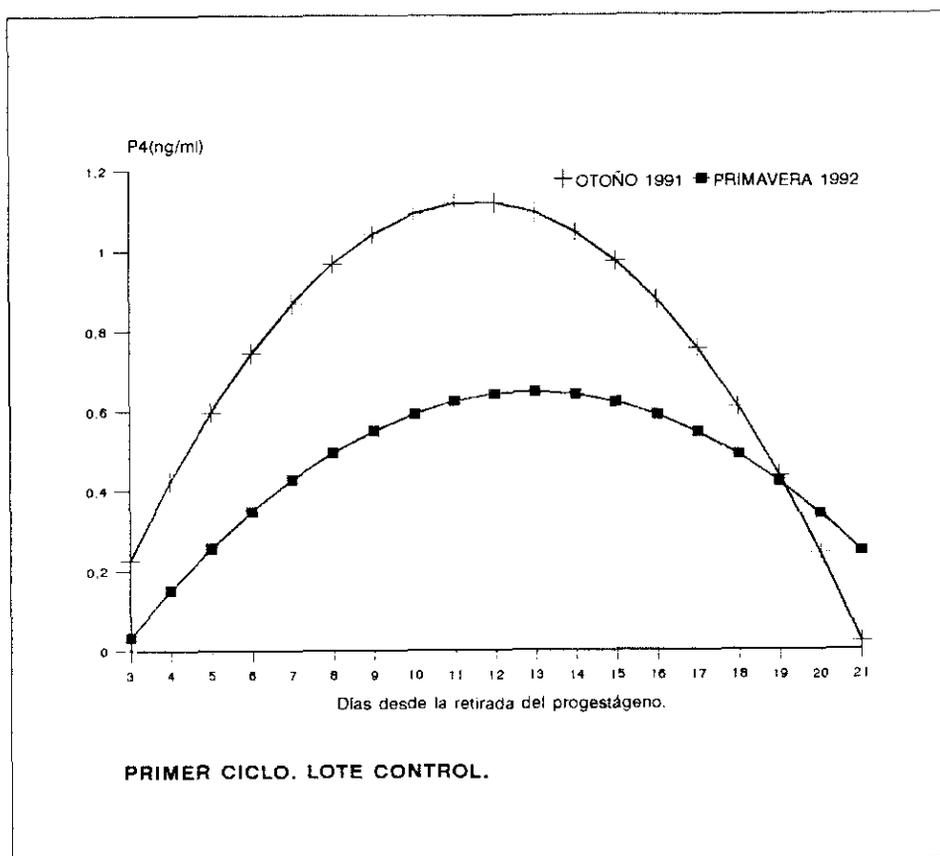
Las curvas resultaron distintas, presentando distinta evolución en el tiempo y distinta concentración (figura 25). En otoño se alcanzó antes el máximo y hubo una concentración de progesterona significativamente superior ( $p < 0,05$ ).

Las ecuaciones de regresión para los perfiles de secreción de progesterona en cada una de las estaciones son las siguientes:

$$P_4(\text{otoño}) = -0,0123x^2 + 0,2837x - 0,5138$$

$$P_4(\text{primavera}) = -0,0062x^2 + 0,1606x - 0,3928$$

Figura 25: Perfiles de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



En el segundo ciclo, los perfiles de secreción de progesterona también resultaron distintos. Los parámetros del modelo se exponen en la tabla 39.

**TABLA 39.-** Parámetros de las ecuaciones de regresión para las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes al 1<sup>er</sup> otoño y la primavera del lote control (2<sup>o</sup> ciclo).

|           | $b_0$               | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|-----------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|
| OTOÑO     | -8,2172<br>(0,0473) | 0,6565<br>(0,0076) | -0,0116<br>(0,0014) | 0,51*** |
| PRIMAVERA | -5,5907<br>(3,5547) | 0,4260<br>(0,2168) | -0,0072<br>(0,0032) | 0,56*** |

\*\*\*  $p < 0,001$

Las coordenadas del máximo fueron las siguientes:

|           | X (días) | Y (concentración $P_4$ ) |
|-----------|----------|--------------------------|
| OTOÑO     | 28,29    | 1,07                     |
| PRIMAVERA | 29,58    | 0,70                     |

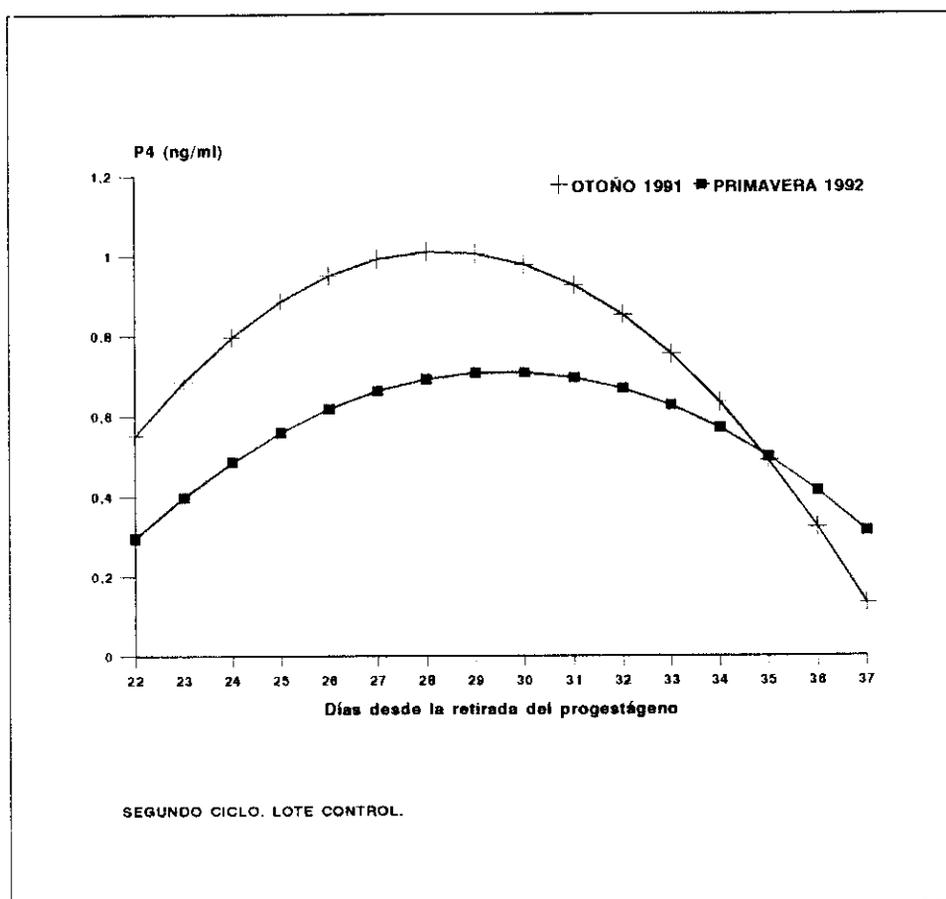
Las curvas fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), presentando distinta evolución en el tiempo y distinta concentración (figura 26). En otoño se alcanzó antes el máximo y hubo una concentración de progesterona significativamente superior.

Las ecuaciones de regresión para los perfiles de secreción de progesterona en cada una de las estaciones son las siguientes:

$$P_{4(\text{otoño})} = -0,0116x^2 + 0,6565x - 8,2172$$

$$P_{4(\text{primavera})} = -0,0072x^2 + 0,4260x - 5,5907$$

Figura 26: Perfiles de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



Por tanto, los dos lotes de ovejas presentaron la misma tendencia: las concentraciones de progesterona fueron significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) y el máximo se alcanzó significativamente antes ( $p < 0,05$ ) en otoño que en primavera.

### 4.3.3. Efecto de la dieta y del tiempo de pastoreo sobre los perfiles hormonales de LH y progesterona.

#### .- LH:

El análisis de varianza para los factores tipo de alimentación (alfalfa-control) y tiempo de pastoreo: otoño de 1991 (2 meses); otoño de 1992 (1 año), demostró que la interacción entre ambos factores no resultó significativa para ninguna de las variables estudiadas (nivel basal, concentración máxima en el pico preovulatorio y horas transcurridas desde la retirada del progestágeno al pico preovulatorio).

Ni el tipo de alimentación ni el tiempo de pastoreo determinaron diferencias significativas en el nivel basal de LH.

Sin embargo, el tiempo de pastoreo resultó significativo para las horas transcurridas desde la retirada del progestágeno al pico preovulatorio de LH, como se observa en la tabla 40.

**TABLA 40.-** Horas transcurridas desde la retirada del progestágeno al pico preovulatorio de LH en ambos lotes de ovejas en el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> año.

|                  | OTOÑO 1991                | OTOÑO 1992                |
|------------------|---------------------------|---------------------------|
| CONTROL          | 58,09 ± 2,50<br>n=11      | 46,38 ± 1,68<br>n=13      |
| ALFALFA          | 51,0 ± 3,39<br>n=8        | 43,75 ± 1,86<br>n=12      |
| $\mu \pm$ E.S.M. | 55,10 ± 2,14 <sup>A</sup> | 45,11 ± 1,25 <sup>B</sup> |

A,B p<0,01

Independientemente del tipo de alimentación, en el segundo otoño ambos lotes de ovejas presentaron antes el pico preovulatorio de LH en respuesta al tratamiento de sincronización.

Ni el tipo de alimentación ni el tiempo de pastoreo determinaron diferencias significativas en la concentración máxima de LH en el pico preovulatorio, sin embargo, en el segundo otoño ambos lotes de ovejas tuvieron una concentración máxima en el pico preovulatorio mayor que en el primer otoño ( $p < 0,1$ ) (tabla 41).

**TABLA 41.-** Concentración de LH en el pico preovulatorio en ambos lotes de ovejas en el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> otoño.

|                  | OTOÑO 1991                | OTOÑO 1992                |
|------------------|---------------------------|---------------------------|
| CONTROL          | 36,38 ± 8,78<br>n=11      | 48,81 ± 8,47<br>n=13      |
| ALFALFA          | 33,08 ± 7,32<br>n=8       | 58,05 ± 11,54<br>n=12     |
| $\mu \pm$ E.S.M. | 34,99 ± 5,82 <sup>A</sup> | 53,24 ± 6,98 <sup>B</sup> |

A,B  $p < 0,1$

- Progesterona:

Se realizó una comparación de los perfiles de secreción de progesterona del lote de alfalfa entre el otoño de 1991 (pastoreo corto) y el otoño de 1992 (pastoreo largo).

Los parámetros del modelo para el primer ciclo se exponen en la tabla 42.

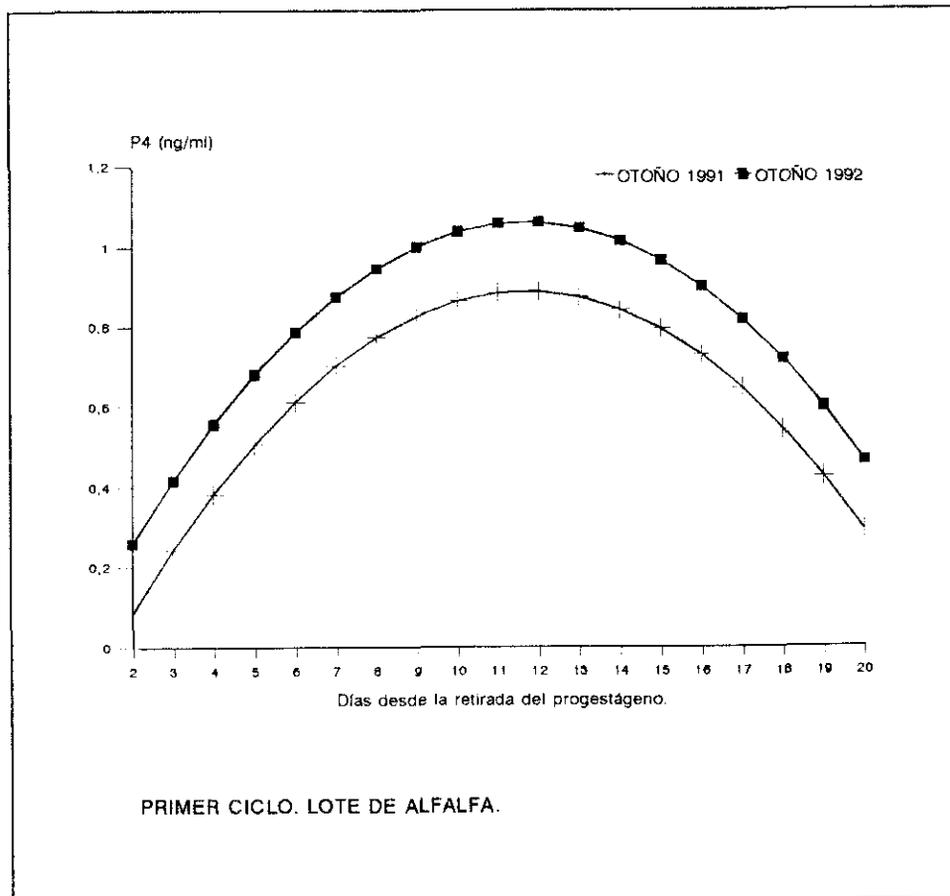
**TABLA 42.-** Parámetros de las ecuaciones de regresión para las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes al otoño de 1991 y otoño de 1992 del lote de alfalfa (1<sup>er</sup> ciclo).

|            | $b_0$               | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|
| OTOÑO 1991 | -0,5664<br>(0,0374) | 0,2738<br>(0,0064) | -0,0120<br>(0,0013) | 0,58*** |
| OTOÑO 1992 | -0,0291<br>(0,5251) | 0,1755<br>(0,0074) | -0,0075<br>(0,0012) | 0,30*** |

\*\*\*  $p < 0,001$

En el primer ciclo las curvas resultaron paralelas, pero el desplazamiento entre ambas fue significativo ( $p < 0,05$ ), es decir, ambos lotes de ovejas tuvieron la misma evolución del patrón de secreción, pero la concentración fue mayor en el otoño de 1992 (figura 27).

Figura 27: Perfiles de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



El ajuste definitivo se realiza por las siguientes ecuaciones:

$$P_{4(\text{otoño } 1991)} = -0,0086x^2 + 0,2006x - 0,2814$$

$$P_{4(\text{otoño } 1992)} = -0,0086x^2 + 0,2006x - 0,1078$$

Durante el segundo ciclo el resultado fue el mismo que en el primer ciclo. Los parámetros del modelo se exponen en la tabla 43.

**TABLA 43.-** Parámetros de las ecuaciones de regresión para las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes al otoño de 1991 y otoño de 1992 del lote de alfalfa (2° ciclo).

|            | $b_0$                | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|------------|----------------------|--------------------|---------------------|---------|
| OTOÑO 1991 | -6,8312<br>(0,0401)  | 0,5377<br>(0,0065) | -0,0094<br>(0,0012) | 0,48*** |
| OTOÑO 1992 | -10,1633<br>(0,0608) | 0,7813<br>(0,0103) | -0,0134<br>(0,0021) | 0,34*** |

\*\*\*  $p < 0,001$

Las coordenadas del máximo fueron las siguientes:

|            | X (días) | Y (concentración $P_4$ ) |
|------------|----------|--------------------------|
| OTOÑO 1991 | 28,6     | 0,85                     |
| OTOÑO 1992 | 29,15    | 1,22                     |

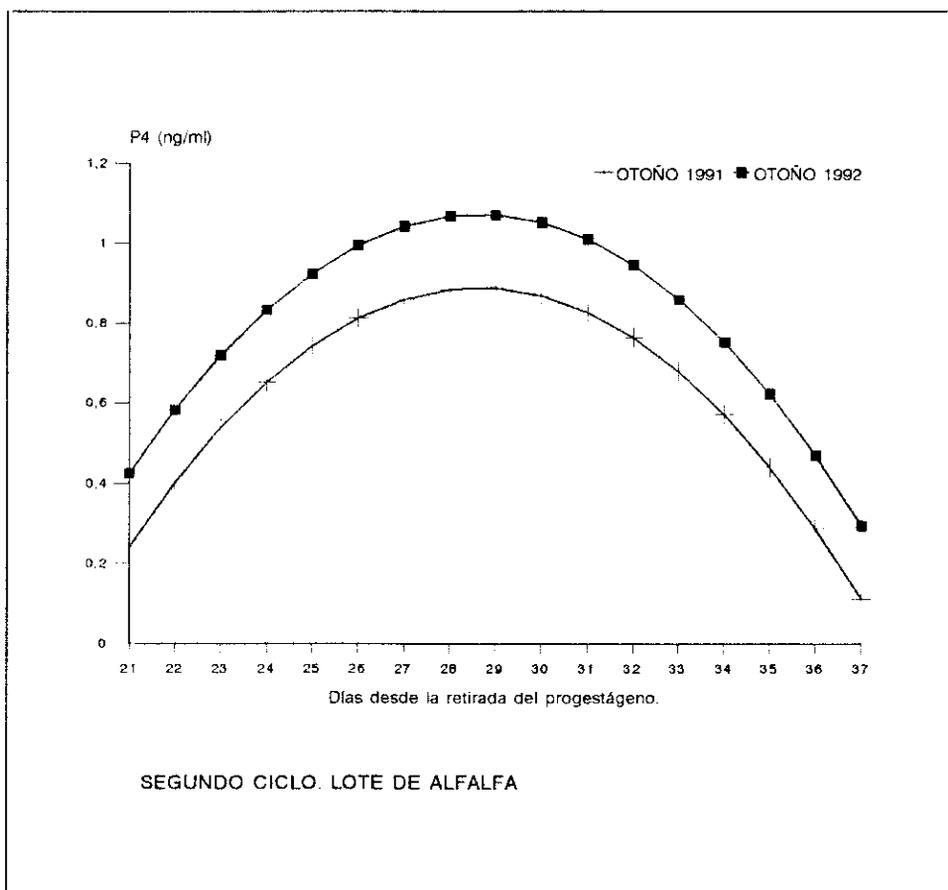
La evolución en el tiempo del patrón de secreción fue igual en los dos otoños, pero el desplazamiento fue significativo ( $p < 0,05$ ). La concentración fue mayor en el otoño de 1992 (figura 28).

El ajuste definitivo se realiza por las siguientes ecuaciones:

$$P_{4(\text{otoño } 1991)} = -0,0111x^2 + 0,6357x - 8,2123$$

$$P_{4(\text{otoño } 1992)} = -0,0111x^2 + 0,6357x - 8,0304$$

Figura 28: Perfiles de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



Se realizó la misma comparación con el lote control en los dos otoños. Tanto para el primer como segundo ciclo, las curvas resultaron idénticas. Los parámetros de los modelos se exponen en las tablas 44 y 45.

**TABLA 44.-** Parámetros de las ecuaciones de regresión para las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes al otoño de 1991 y 1992 del lote control (1<sup>er</sup> ciclo).

|            | $b_0$               | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|
| OTOÑO 1991 | -0,5138<br>(0,0415) | 0,2837<br>(0,0071) | -0,0123<br>(0,0014) | 0,57*** |
| OTOÑO 1992 | -0,1275<br>(0,4424) | 0,2029<br>(0,0062) | -0,0091<br>(0,0010) | 0,70*** |

\*\*\*  $p < 0,001$

**TABLA 45.-** Parámetros de las ecuaciones de regresión para las concentraciones plasmáticas de progesterona correspondientes al otoño de 1991 y 1992 del lote control (2<sup>o</sup> ciclo).

|            | $b_0$                | $b_1$              | $b_2$               | $r^2$   |
|------------|----------------------|--------------------|---------------------|---------|
| OTOÑO 1991 | -8,2172<br>(0,0473)  | 0,6565<br>(0,0076) | -0,0116<br>(0,0014) | 0,51*** |
| OTOÑO 1992 | -12,5729<br>(0,0606) | 0,9486<br>(0,0102) | -0,0162<br>(0,0021) | 0,45*** |

\*\*\*  $p < 0,001$

Las coordenadas del máximo para ambos ciclos fueron las siguientes:

|            | 1 <sup>er</sup> CICLO |                          | 2 <sup>o</sup> CICLO |                          |
|------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|
|            | X (días)              | Y (concentración $P_4$ ) | X (días)             | Y (concentración $P_4$ ) |
| OTOÑO 1991 | 11,53                 | 1,12                     | 28,29                | 1,07                     |
| OTOÑO 1992 | 11,37                 | 1,06                     | 29,28                | 1,31                     |

El ajuste definitivo se realiza por las siguientes ecuaciones (figuras 29 y 30):

.- Primer ciclo:

$$P_4(\text{otoño 1991}) = -0,0098x^2 + 0,225x - 0,2179$$

.- Segundo ciclo:

$$P_4(\text{otoño 1992}) = -0,0132x^2 + 0,7611x - 9,77$$

Figura 29: Perfil de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.

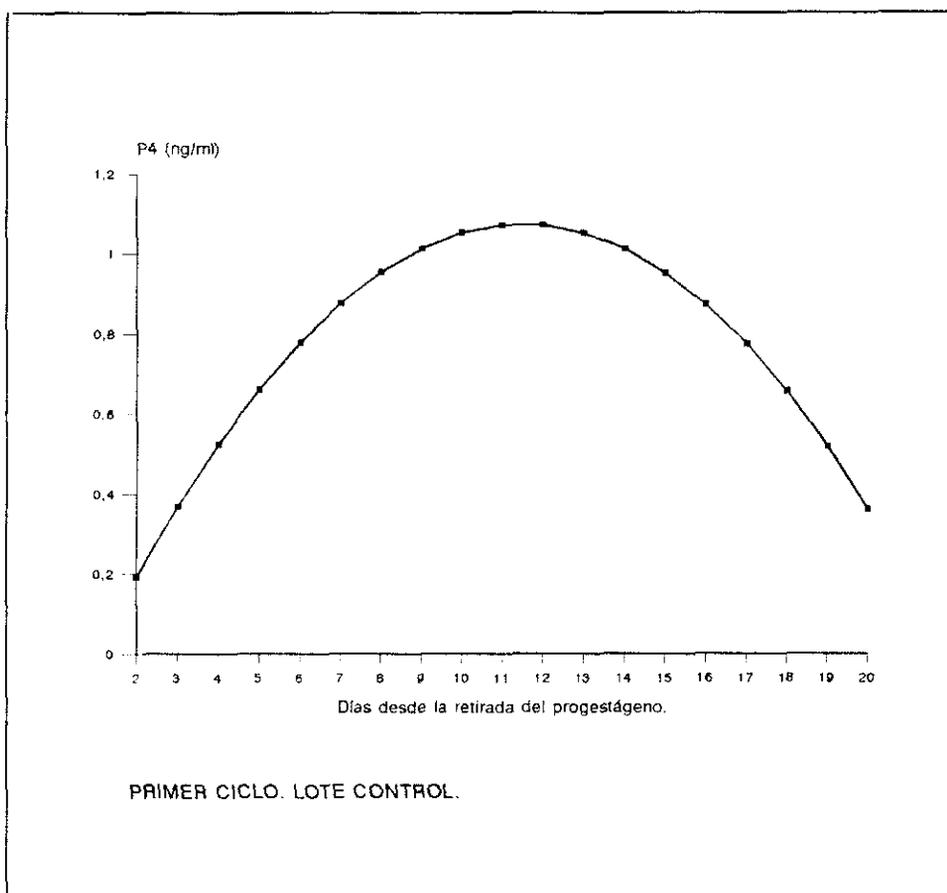
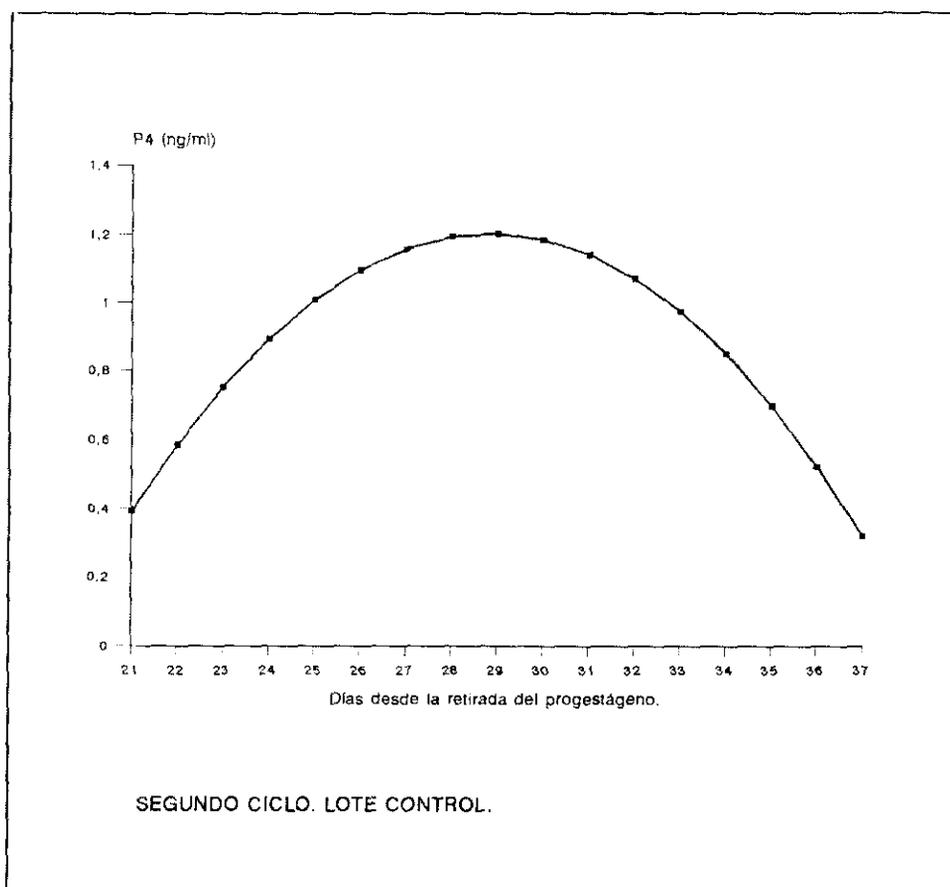


Figura 30: Perfil de secreción de progesterona según el análisis de regresión lineal.



En resumen, los perfiles de secreción de progesterona en el lote control fueron iguales en el otoño de 1991 y el otoño de 1992.

Por tanto, mientras el lote control se comportó igual en el primer y segundo otoño, las ovejas que consumieron alfalfa mostraron diferencias entre ambos otoños, con una mayor concentración de progesterona en el otoño de 1992, aunque la evolución del patrón de secreción fue igual.

#### **4.4.-ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO DEL APARATO REPRODUCTOR.**

##### **- Observaciones macroscópicas:**

Un 43% de las ovejas que pastorearon alfalfa presentaron lesiones macroscópicas visibles. De este grupo, destacaron principalmente las lesiones uterinas, que representaron el 75% de las alteraciones observadas.

Las principales lesiones fueron quistes o microquistes en el endometrio y pequeñas hemorragias, normalmente puntiformes (petequias) y algunas más extensas (equimosis) en la mucosa uterina.

Dos animales que pastaron alfalfa presentaron quistes paraováricos.

En el lote control sólo un animal presentó un absceso a nivel de la serosa de la vagina, así como quistes en el endometrio.

##### **- Observaciones histológicas:**

###### *Ovejas controles:*

La vagina de estos animales se encontró tapizada por un epitelio estratificado plano no queratinizado, que recubría el tejido conjuntivo del corión subyacente, no observándose ninguna anomalía (LAMINA IV a).

El cuello uterino presentó la estructura típica de esta especie, sin anomalías reseñables. La mucosa, tapizada por un epitelio cilíndrico, presentó pliegues hacia la luz de una altura media constante (LAMINA V a y VI a).

En el útero tampoco se encontraron alteraciones patológicas. Estaba tapizado por un epitelio cilíndrico simple, que se dispone sobre las carúnculas conjuntivas y las glándulas intercarunculares (LAMINA VII a).

Los ovarios, de estructura normal, presentaron folículos en diversas fases de desarrollo (LAMINA VIII a). En uno de los animales se observó un gran cuerpo lúteo que ocupaba prácticamente todo el ovario (LAMINA VIII b).

*Ovejas alimentadas con alfalfa:*

A excepción de un animal que presentó una vaginitis (LAMINA IVb), la estructura histológica de los animales que integraban este grupo, no difirió de las descritas anteriormente para el lote control.

Los ovarios presentaron folículos en diversas fases de desarrollo, no observándose ninguna anomalía.

Las principales alteraciones se observaron a nivel del cuello uterino, donde se apreció un mayor desarrollo de los pliegues, que alcanzaban mayor complejidad y altura en las luces (LAMINA Vb) y con frecuencia presentaron secreciones eosinofílicas (LAMINA VI b ).

El epitelio de revestimiento y el glandular era cúbico y en ocasiones cilíndrico y se disponía sobre una lámina propia más celular que en los casos anteriormente descritos.

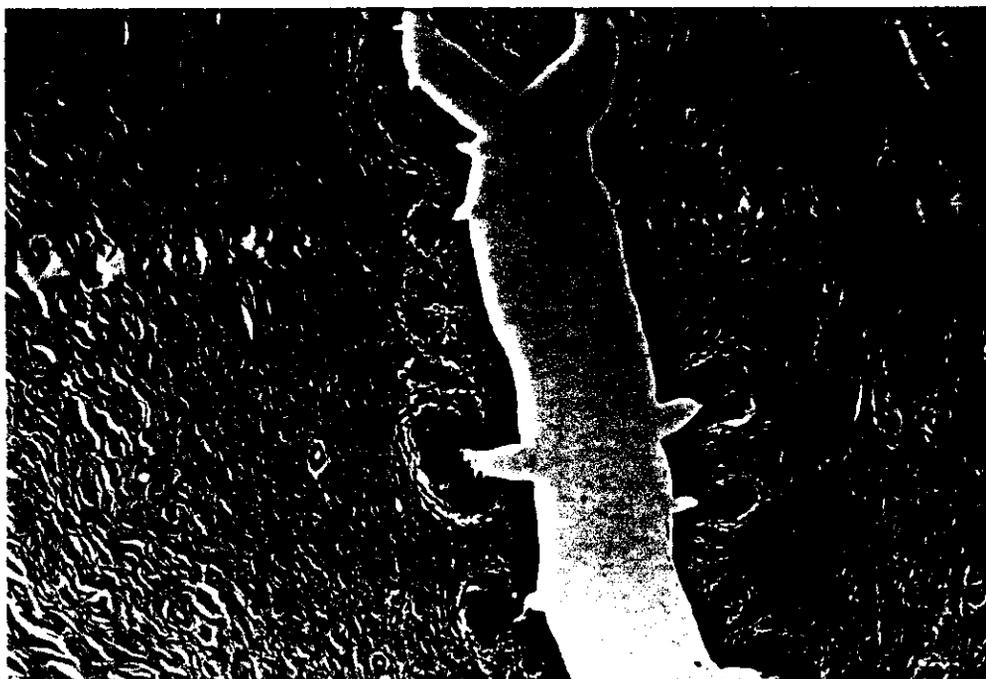
Se observaron formaciones quísticas de diversos tamaños que solían poseer un contenido eosinofílico (LAMINA VI c).

El útero también presentó una mayor actividad glandular aunque no llegaron a formarse estructuras quísticas semejantes a las anteriormente descritas (LAMINA VII b).

LAMINA IV



**A**



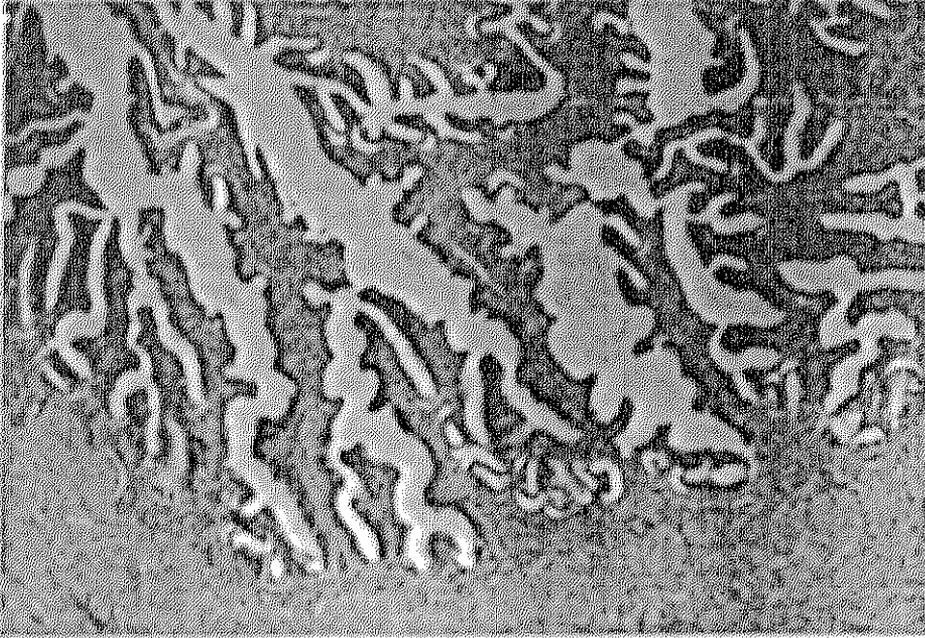
**B**

**LAMINA IV**

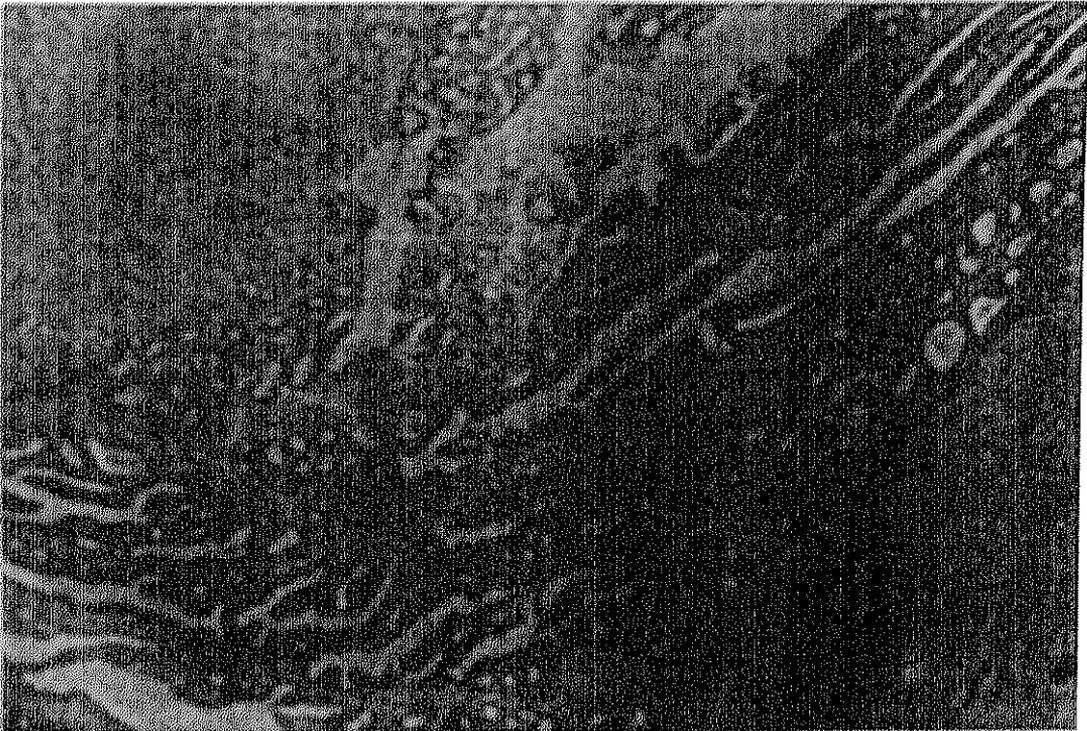
**A:** Vagina. H-E x 19 (lote control)

**B:** Vagina. H-E x 19 (lote de alfalfa) se observa un foco inflamatorio de células redondas y una mayor queratinización del epitelio.

LAMINA V



A



B

**LAMINA V:**

**A:** Pliegues mucosos del cuello uterino (lote control) H-E x 19.

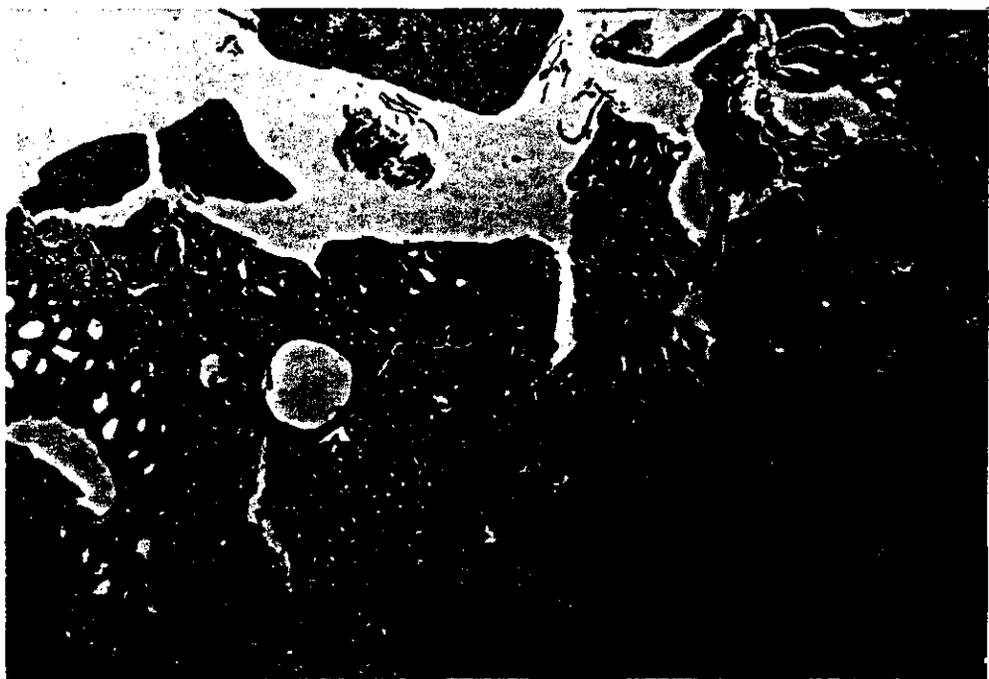
**B:** Cuello uterino (lote de alfalfa) H-E x 19



**A**



**B**



**C**

**LAMINA VI**

**A:** Cuello uterino (lote control) H-E x 19

**B:** Hiperplasia quística segregante de cuello uterino (lote de alfalfa) H-E x 19

**C:** Cuello uterino (lote de alfalfa). Se observa una hiperplasia quística glandular con fusión y pérdida de las prolongaciones típicas. H-E x 19

LAMINA VII



**A**



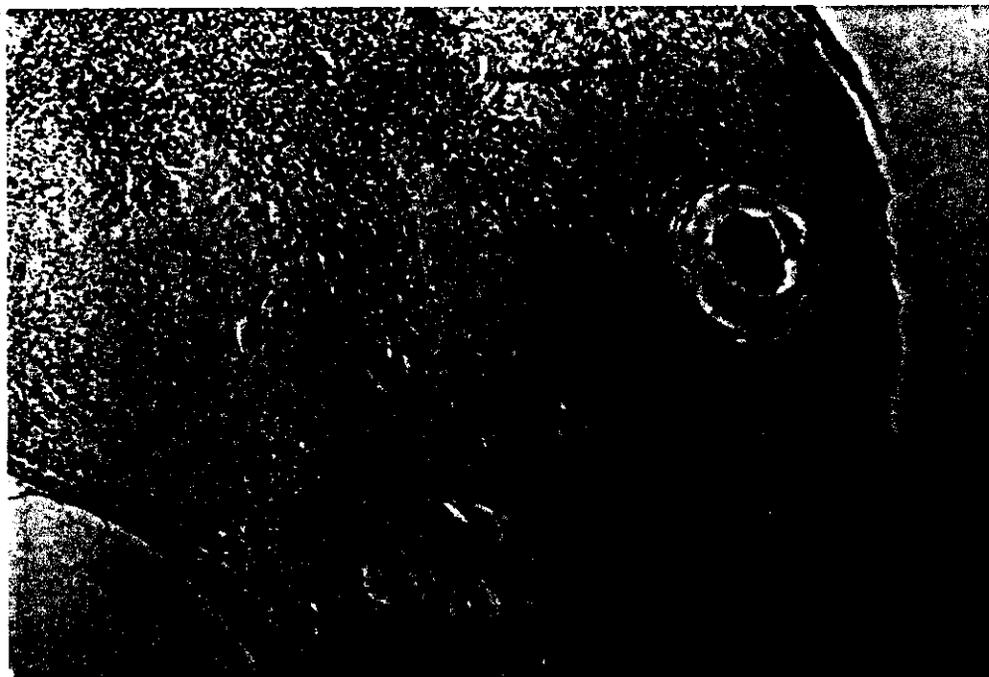
**B**

**LAMINA VII:**

**A:** Utero (lote control) H-E x 19.

**B:** Utero (lote de alfalfa) H-E x 19. Se observa una hiperplasia glandular en el endometrio.

LAMINA VIII



A



B

**LAMINA VIII**

**A:** Ovario (lote control). H-E x 19

**B:** Ovario, en el que se aprecia un cuerpo lúteo a la derecha de la imagen (lote control). H-E x 19.

*DISCUSSION*

## **5.- DISCUSION.**

### **5.1.- DISPONIBILIDAD DE PASTO Y CONTENIDO EN COUMESTROL.**

La disponibilidad de alfalfa en las parcelas osciló entre 55,12 y 73,57 gr MS/Kg PV/día, correspondientes al verano y la primavera respectivamente. En otoño la disponibilidad fue de 71,83 gr MS/Kg PV/día en el año 1991 y 69,85 gr MS/Kg PV/día en el año 1992.

En praderas de alfalfa, el nivel máximo de ingestión se alcanza con disponibilidades de 68-81 gr MS/Kg PV (Rattray et al., 1982; Ramón et al., 1989). Por tanto, la ingestión no se vio limitada en ningún período de pastoreo a excepción del verano, en que pudo verse moderadamente restringida.

Por otra parte, no hubo diferencias significativas en la evolución del peso y condición corporal entre los lotes control y alfalfa, aunque todos los lotes presentaron al final de las experiencias un peso y condición corporal significativamente mayores que al inicio, independientemente de la dieta.

El contenido en coumestrol de la alfalfa varió según los meses de estudio, presentando un valor medio de  $19,76 \pm 2,79$  mg/Kg MS. Los valores más bajos correspondieron a los meses de Junio, Julio y Agosto (8,18; 10,24 y 9,58 mg/Kg MS respectivamente) y los valores máximos a Octubre y Noviembre de ambos años (28,53 y 24,13 en 1991 ; 33,7 y 34 en 1992) y al mes de Abril (21,40 mg/Kg MS).

Estos resultados están en la línea de los obtenidos por Delgado et al. (1992), que encontraron un valor medio de coumestrol en muestras de alfalfa c.v. Aragón, en

pastoreo, de  $17,5 \pm 2,20$  ppm, mediante cromatografía líquida de alta resolución, presentando los valores más bajos en verano y comenzando a elevarse en Septiembre.

De acuerdo con lo descrito en otros trabajos (Francis y Millington, 1965; Wong et al., 1971; Smith y Jagush, 1979), pensamos que la cantidad de coumestrol encontrada en la alfalfa, a pesar de ser moderada, fue suficiente para mostrar alguna actividad. Wong et al. (1971), indicaron que la concentración mínima considerada biológicamente activa oscilaba entre 20-50 mg/Kg, refiriéndose al total de coumestanos. Francis y Millington (1965), encontraron efectos estrogénicos en alfalfa con un contenido en coumestrol de 25 ppm. Nosotros sólo hemos cuantificado el coumestrol, por lo que probablemente la cantidad total de coumestanos sea mayor.

El moderado contenido en coumestrol encontrado en la alfalfa sugiere que la utilización de la alfalfa en pastoreo rotacional puede contribuir a mantener bajos niveles de patógenos foliares, que es el principal factor responsable de la actividad estrogénica en la alfalfa (Ramón et al., 1993).

## **5.2.- EFECTO DEL PASTOREO DE ALFALFA SOBRE EL MOCO CERVICAL OVINO.**

Numerosos trabajos señalan como causa principal de la infertilidad debida al consumo de fitoestrógenos, un fracaso de la fertilización que está asociado a una pobre penetración de espermatozoides en el oviducto, como consecuencia de cambios cualitativos y cuantitativos del moco cervical, que impiden el establecimiento de una reserva de espermatozoides en el cervix, así como un transporte espermático normal (Turnbull et al., 1966; Fels y Neil, 1968; Kaltenbach y Davies, 1970; Lightfoot et al.,

1974; Adams, 1976a). Estos cambios en el moco cervical afectan tanto al volumen como a sus propiedades reológicas.

Nuestros resultados muestran diferencias significativas en el volumen y en la elasticidad del moco cervical entre los dos lotes de ovejas, excepto en la experiencia de primavera, donde no existieron diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados, y que correspondió a los meses en que el contenido en coumestrol de la alfalfa fue más bajo (10,57 y 8,18 mg/Kg MS en los meses de Mayo y Junio respectivamente), concentraciones que son inferiores a la mínima considerada como biológicamente activa (20 ppm) (Wong et al., 1971).

El volumen de moco cervical y el spinnbarkeit sólo se vieron afectados por el tipo de alimentación (dieta con coumestrol y control), independientemente de la estación y del tiempo de pastoreo, observándose un mayor volumen de moco cervical con una reducida elasticidad en las ovejas que pastaron alfalfa.

Estos hechos han sido descritos por otros autores (Smith, 1971a; Lightfoot et al., 1974), que encontraron un volumen de moco cervical significativamente mayor en ovejas expuestas a fitoestrógenos, usando como método de recogida compresas de algodón introducidas en la vagina. Sin embargo, otros trabajos (Adams, 1976a) no encuentran un mayor volumen de moco cervical cuando la recogida se realiza por aspiración con una pipeta, y atribuyen el mayor volumen observado en trabajos anteriores a una disminución de la viscosidad, que hace que el moco pueda penetrar en el algodón más fácilmente.

Trabajos más recientes (Kaldas y Hughes, 1989), describen que la menor viscosidad del moco cervical se debe a una disminución en la concentración de glicoproteína (componente que da al moco su consistencia) y que los fitoestrógenos también aumentan el volumen de moco y su contenido en agua, dependiendo estas

últimas acciones de la dosis, mientras que el descenso de glicoproteína parece depender más de la duración de la exposición que de la dosis.

Nuestros resultados indican que a dosis entre 20 y 35 mg/Kg MS y con el mismo método de recogida que Adams (1976a), se produce un mayor volumen de moco cervical y una disminución en la elasticidad del mismo y, por tanto, parecen indicar que la producción de glicoproteína y el contenido en agua del moco están afectados.

Estos cambios en el moco cervical pueden afectar al establecimiento de una reserva de espermatozoides en el cervix, necesaria para que ocurra una fertilización normal (Hunter, 1992), así como el transporte espermático, puesto que la estructura del moco cervical orienta al espermatozoide en su migración (Gibbons y Sellwood, 1973; Hafez, 1987c). El reducido *spinnbarkeit* del moco cervical de ovejas expuestas a fitoestrógenos, refleja una ausencia de la estructura molecular normal del moco cervical e impide una orientación efectiva de los espermatozoides.

A pesar de estos cambios en el volumen y elasticidad del moco cervical, no hemos observado diferencias en la penetración espermática en ninguna de las dos pruebas realizadas "in vitro". Hasta la fecha, no tenemos noticia de ningún otro estudio sobre este tema, ya que todo lo que hemos encontrado son estudios "in vivo" (Lightfoot et al., 1967; Kaltenbach y Davies, 1970), en los que se observaron diferencias significativas en el número de espermatozoides recogidos del cervix, útero y oviductos entre ovejas que habían estado sobre pastos estrogénicos y ovejas controles, presentando las primeras un menor número de espermatozoides. Lightfoot et al., (1967), también observaron que un número menor de espermatozoides recogidos del cervix de ovejas afectadas fueron móviles. Nosotros no hemos encontrado ningún efecto tóxico del mucus de las ovejas que pastaron alfalfa sobre el semen ("in vitro") y es posible que la menor viabilidad observada "in vivo" sea debida a un fallo del moco cervical para separar los espermatozoides del flujo de leucocitos y fluidos del útero (Mattner, 1968).

Sin embargo, sí existieron diferencias significativas en la penetración espermática, independientes de la dieta, entre el otoño y la primavera. Pensamos que estas diferencias son debidas a la influencia del fotoperíodo en las características seminales más que a cambios en las propiedades del moco cervical, ya que, en la raza Manchega, los niveles plasmáticos de testosterona libre y los seminales de fructosa, se hallan íntima e inversamente relacionados con el número de horas de luz solar (Borque et al., 1992).

Los cambios descritos en la literatura en las características del moco cervical, se han atribuido a un mayor nivel de producción de estrógenos o, alternativamente, a una mayor sensibilidad del cervix a los estrógenos (Lightfoot et al., 1974). Nosotros nos inclinamos hacia la segunda sugerencia, puesto que la duración del celo, que está directamente relacionada con la cantidad de estrógenos (Scaramuzzi et al., 1971a), fue similar en ambos lotes.

Además, se ha observado que en ovejas tratadas con fitoestrógenos se incrementa el número de receptores de estrógenos en el cervix (Tang y Adams, 1981). Esto implicaría que los fitoestrógenos no sólo ocupan los receptores disponibles, sino que además, estimulan la producción local de más lugares de unión, lo que hace al cervix mucho más sensitivo a la acción de los fitoestrógenos (Tang y Adams , 1978a).

En el resto de parámetros analizados en el moco cervical (presión osmótica y arborización) no hemos encontrado diferencias significativas, hecho ya reseñado en otros trabajos (Adams, 1976a).

En cuanto a la duración del celo, la incidencia del mismo y el comportamiento sexual, no hemos encontrado diferencias significativas entre ambos grupos de ovejas. Estos resultados están en la línea de otros autores que han observado que la longitud del ciclo estral y la duración del celo no parecen estar significativamente afectadas en

ovejas con infertilidad debida al consumo de fitoestrógenos (Obst y Seamark, 1970; Lightfoot et al., 1974; Smith, 1975). Sin embargo, existen trabajos que describen irregularidades en el ciclo, con una mayor variabilidad en la duración del ciclo estral y mayor incidencia de estros silenciosos (Ch'ang, 1961; Adams, 1981), aunque estas irregularidades parecen estar más relacionadas con infecciones del tracto genital, que son comunes en ovejas con enfermedad del trébol (Turnbull et al., 1966; Fels y Neil, 1968; Kaltenbach y Davies, 1970).

### **5.3.- EFECTO DEL PASTOREO DE ALFALFA SOBRE LOS PERFILES HORMONALES DE LH Y PROGESTERONA.**

Numerosos trabajos sugieren una acción de los fitoestrógenos a nivel del eje hipotálamo-hipófisis, alterando la secreción de gonadotropinas (Mathieson y Kitts, 1980; Rodgers et al., 1980; Adams, 1981; Montgomery et al., 1985), aunque la acción de los estrógenos vegetales a este nivel no está muy clara.

Así, se han descrito retrasos en el pico preovulatorio de LH y niveles plasmáticos basales de gonadotropinas más altos que los normales, como consecuencia de una menor respuesta del eje hipotálamo-hipófisis al  $17\beta$ -estradiol. Esta reducida respuesta al  $17\beta$ -estradiol, podría estar relacionada con cambios en el número o afinidad de los receptores de estrógenos en la hipófisis (Tang y Adams, 1978a). Si el eje hipotálamo-hipófisis tiene una menor sensibilidad al  $17\beta$ -estradiol, el nivel de gonadotropinas podría ser mayor de lo normal debido a una disminución del "feed-back" negativo del estradiol (Scaramuzzi et al., 1971b).

Sin embargo, otros trabajos no encuentran diferencias significativas en los niveles de FSH (Smith et al., 1980), ni en las concentraciones de LH (Mc Leod, 1978,

citado por Smith, 1980; Chamley et al., 1985) entre ovejas que pastaban alfalfa estrogénica y ovejas controles.

La competición entre estrógenos endógenos y fitoestrógenos por los receptores, está en función de la afinidad y de la concentración. Por tanto, aunque los fitoestrógenos tengan menor afinidad que el estradiol por los receptores, a altas concentraciones podrían competir con el estradiol por los receptores de estrógenos en la hipófisis. Además, en ausencia de estradiol, estos compuestos pueden unirse a los receptores hipofisarios de estrógenos y actuar de la misma forma que el estradiol (Mathieson y Kitts, 1980).

Por tanto, las acciones de los fitoestrógenos pueden ser estrogénicas o antiestrogénicas. En una situación de hipoestrogenismo, los estrógenos endógenos pueden ocupar los receptores y producir efectos estrogénicos, mientras que en presencia de estradiol, grandes cantidades de un estrógeno exógeno pueden disminuir la actividad estrogénica por competición con el  $17\beta$ -estradiol (Kaldas y Hughes, 1989).

Nuestro trabajo sólo es comparable al de Hettle y Kitts (1983), puesto su estudio se refiere concretamente a la descarga preovulatoria de LH después de una sincronización de los celos con progesterona. Estos autores encontraron una mayor concentración en el pico preovulatorio de LH y un retraso del mismo, en ovejas que consumían alfalfa respecto de ovejas controles. Sus resultados están de acuerdo con la hipótesis de una menor sensibilidad del eje hipotálamo- hipófisis al "feed-back" negativo del estradiol.

Nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en ninguna de las tres experiencias en cuanto al nivel basal, horas transcurridas desde la extracción del progestágeno hasta la aparición del pico de LH, ni concentración máxima en el pico preovulatorio, quizás como consecuencia de que la cantidad de coumestrol que contenía

la alfalfa no fue suficiente para competir con los estrógenos endógenos por los receptores del hipotálamo y de la hipófisis.

En la experiencia de primavera, el número de ovejas que presentaron pico de LH en respuesta al tratamiento de sincronización fue menor que en los dos otoños para ambos lotes de ovejas, aunque el lote de alfalfa presentó un mayor número de ovejas con pico de LH (8 ovejas en el lote de alfalfa vs 4 en el lote control). Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (debido al escaso número de animales), pensamos que quizá pudiera tener relación con el consumo de coumestrol. Chamley et al. (1985) encontraron que en ovejas afectadas por la enfermedad del trébol, la frecuencia de los pulsos de LH y la concentración de LH durante la estación reproductora eran cercanas a las de ovejas controles. En contraste, durante el anoestro, estos parámetros fueron más bajos en las ovejas controles, mientras que las ovejas afectadas tuvieron los mismos niveles que en estación reproductora.

Pensamos que los resultados que obtuvimos en primavera están relacionados con la hipótesis expuesta por Kaldas y Hughes (1989), quienes afirman que cuando existen niveles basales de estrógenos endógenos, los fitoestrógenos pueden ocupar los receptores disponibles y producir efectos estrogénicos. De hecho, se ha sugerido que las variaciones estacionales en la frecuencia de los pulsos de LH que ocurren en ovejas ovariectomizadas pueden resultar de la presencia de sustancias estrogénicas en la dieta (Goodman et al., 1982).

Independientemente de la dieta, al comparar el primer y segundo otoño, observamos que en ambos lotes de ovejas se produce un adelanto del pico de LH y un aumento de la concentración de LH en el pico preovulatorio. Pensamos que esto ha sido debido a la diferencia de peso y condición corporal entre el primer y segundo año. Al inicio de la experiencia el peso medio de los animales fue de 50 Kg. con una condición corporal media de 1,92. Después de un año de experiencia, el peso medio de los

animales fue de 66,46 Kg con una condición corporal media de 2,98. Ambos valores (peso y condición corporal), fueron significativamente diferentes entre los dos años. La alimentación influye en todos los aspectos de la reproducción de la oveja, entre ellos la tasa de ovulación, que depende entre otros factores del estado de carnes. Este efecto ha sido descrito ampliamente en numerosos trabajos (Smith, 1988; Smith y Stewart, 1990; Folch et al., 1991). Por otra parte existe una relación entre la liberación de LH y la tasa de ovulación, de tal forma que ovejas con dos ovulaciones y alta condición corporal, tienen una mayor frecuencia de pulsos de LH que ovejas con ovulación simple y baja condición corporal (Rhind y Mc Neilly, 1983, citado por Thomas y Oldham, 1984).

En cuanto a la progesterona, nuestros resultados mostraron diferencias significativas en la concentración de esta hormona entre los dos lotes de ovejas (alfalfa y control) únicamente en la primera experiencia (otoño de 1991). Ni en la primavera ni en el segundo año de estudio existieron diferencias significativas entre ambos lotes.

Las alteraciones en la secreción de progesterona debidas al consumo de fitoestrógenos han sido descritas en otros trabajos (Obst y Seamark, 1970; Hearnshaw et al., 1972; Adams et al., 1981), observándose una caída brusca de la progesterona a partir del día 12 del ciclo como consecuencia de un reducido período de actividad del cuerpo lúteo. Obst y Seamark (1970), sugirieron que la ingestión de plantas estrogénicas podía tener un efecto luteolítico directo sobre el cuerpo lúteo, o bien actuar indirectamente afectando la esteroidogénesis folicular o a algún agente luteolítico uterino. Adams, Hearnshaw y Oldham (1981) sugieren que probablemente exista un control alterado del cuerpo lúteo por el útero como resultado de una endometritis, que es, a juicio de estos autores, la lesión más común y severa debida al consumo de fitoestrógenos.

Esta alteración en el período de función del cuerpo lúteo parece estar más relacionada con un efecto agudo y temporal de los fitoestrógenos que con el desarrollo de una infertilidad permanente. Smith (1975), no encontró diferencias en los niveles de producción de progesterona entre ovejas con una historia previa de infertilidad de tres años debida a la enfermedad del trébol y ovejas controles.

En la primera experiencia de nuestro estudio, no encontramos un descenso brusco de la progesterona, sino una concentración de progesterona a lo largo de los dos ciclos de estudio, significativamente mayor en el lote control que en el lote que pastoreó alfalfa, aunque la evolución en el tiempo del patrón de secreción fue la misma para ambos lotes de ovejas, alcanzando los dos grupos el nivel máximo al mismo tiempo (entre los días 11 y 12 del ciclo).

En nuestro trabajo, no aparecen diferencias significativas entre los dos lotes de ovejas en los perfiles de secreción de progesterona durante el segundo año de estudio (cuando el lote problema llevaba un año en las parcelas de alfalfa). De hecho, al comparar los perfiles del lote de alfalfa entre el primer y segundo otoño, se observó que después de un año de pastoreo, este lote presentaba concentraciones de progesterona significativamente mayores que el primer año, no ocurriendo esto en el lote control, que presentó el mismo perfil de secreción de progesterona ambos años. Parece, por tanto, que el segundo otoño la concentración de progesterona no se vió afectada por el consumo de fitoestrógenos. Esto podría estar relacionado con un mecanismo de desactivación de los coumestanos desarrollado después de una exposición prolongada a los mismos (Kelly, 1972; Kelly y Lindsay, 1975).

La menor secreción de progesterona observada en el lote de alfalfa en el primer otoño pudo ser debida a una menor tasa de ovulación en estas ovejas. Existe una influencia de la tasa de ovulación sobre los niveles plasmáticos de progesterona (Abecia et al., 1991). Thorburn et al., (1969), ya registraron este hecho, indicando que la

variación encontrada para los niveles plasmáticos de progesterona durante la fase luteal de diferentes ciclos sexuales, estaba en parte explicada por el número de cuerpos lúteos presentes. López-Sebastián et al. (1992), encontraron una correlación entre los niveles medios de progesterona y el número de cuerpos lúteos en ovejas sometidas a un tratamiento de superovulación.

Numerosos trabajos describen una disminución en la tasa de ovulación en ovejas que ingieren fitoestrógenos (Coop, 1977; Scales y Moss, 1977; Kelly et al., 1980; Smith et al., 1980; Ramón, 1987; Ramón et al., 1993).

Smith y Jagush (1979), encontraron que niveles de coumestanos de 25 ppm en la dieta, deprimían la tasa de ovulación en ovejas que consumieron pellets de alfalfa por un período de 35 días. En nuestro trabajo, los niveles de coumestrol encontrados en las parcelas de alfalfa en los primeros meses de pastoreo fueron de 16,78, 28,53 y 24,13 mg/Kg MS (en Septiembre, Octubre y Noviembre, respectivamente) cantidades que pudieron ser suficientes para deprimir la tasa de ovulación según lo expuesto anteriormente.

En la experiencia de primavera no existieron diferencias significativas entre los dos lotes de ovejas, posiblemente debido al bajo contenido en coumestrol de la alfalfa.

Independientemente de la dieta, cuando se compararon los perfiles de secreción de progesterona entre el primer otoño y la primavera, se observaron diferencias significativas en ambos lotes de ovejas (grupo de alfalfa y control). Los dos grupos presentaron en los dos ciclos de primavera concentraciones menores de progesterona, la concentración máxima se alcanzó más tarde y el número de ovejas que presentaron ciclos fue menor que en los dos otoños, reflejando posiblemente el anoestro estacional de esta especie, ya que en la oveja se puede considerar el fotoperíodo como el factor primario que afecta a las variaciones estacionales de la actividad sexual (López-

Sebastián, 1989a). Los estudios realizados con raza Manchega demuestran que el descenso de la actividad sexual comienza en el mes de Febrero, restableciéndose a partir de Mayo o Junio (Vera y Vega, 1971; Saiz et al., 1980).

#### **5.4.- EFECTO DEL PASTOREO DE ALFALFA SOBRE EL APARATO REPRODUCTOR.**

El consumo de fitoestrógenos induce alteraciones morfológicas en el aparato reproductor. Estos cambios afectan principalmente al ovario, oviducto, útero, cervix y vagina, glándulas tiroides, adrenales y mamarias (Gardiner y Nairn, 1969; Hearnshaw et al., 1972; Adams, 1976b; Valderrábano et al., 1988).

Nosotros hemos estudiado ovario, útero, cuello uterino y vagina, encontrando alteraciones únicamente a nivel de útero y cervix, posiblemente como consecuencia de que el contenido en coumestrol de la alfalfa fue moderado.

A nivel ovárico no hemos encontrado ninguna alteración reseñable, aunque varios trabajos describen anomalías foliculares en ovejas que consumían alfalfa (Kelly et al., 1976a; Adams, 1976b; El Samannoudy et al., 1980). Estas alteraciones consistían en un desarrollo folicular anormal, una atresia temprana de los folículos y una hiperplasia de la rete ovárica. Estas lesiones son similares a las encontradas cuando los ovarios se someten a una excesiva cantidad de estrógenos exógenos (Goldenberg et al., 1972).

Tampoco encontramos lesiones relevantes a nivel de la vagina (sólo un animal presentó una vaginitis y una mayor queratinización del epitelio), aunque se han descrito alteraciones a nivel del epitelio vaginal, con una mayor queratinización y síntesis queratohialina en las capas parabasales (Barberan et al., 1990).

Las alteraciones más evidentes las encontramos a nivel de cuello uterino y útero, aunque no llegaron a ser tan espectaculares como las descritas en la enfermedad del trébol. Los pliegues del cuello alcanzaron mayor complejidad y altura en las luces, que presentaban secreciones eosinofílicas, indicando una mayor actividad glandular. El epitelio se dispuso sobre una lámina propia más celular que en las ovejas controles.

Estos hechos han sido observados por otros autores (Heydon y Adams, 1977; Adams, 1986; 1990; Barberan et al., 1990); que describen pliegues cervicales más anchos, llegando incluso a fusionarse, incrementos en la cantidad de lámina propia que además presenta un mayor contenido celular, y se observa un desarrollo de glándulas tubulares similares a las glándulas uterinas.

En función de todos estos cambios, parece que la exposición crónica a plantas estrogénicas estimula la transformación del cervix hacia una estructura de tipo uterino, tomando la apariencia de endometrio (Adams, 1986).

Por todo lo expuesto, parece que el cervix es el principal órgano diana de los fitoestrógenos. Se ha sugerido que los estrógenos exógenos no sólo ocupan los lugares de unión disponibles, sino que además estimulan la producción local de más sitios de unión (Tang y Adams, 1978a). Esto hace al cervix más sensible a la acción estrogénica y si la exposición a los estrógenos es continuada, las alteraciones cervicales pueden llegar a ser muy exageradas (Kaldas y Hughes, 1989). De hecho, en nuestro trabajo el único parámetro estudiado que mostró diferencias significativas durante todo el período de pastoreo fue el moco cervical.

A nivel del útero, observamos una mayor actividad glandular, aunque no llegaron a formarse estructuras quísticas como en el cuello. Las lesiones fueron similares pero menos severas que las descritas en la enfermedad del trébol (Barrett et al., 1965; Rizzoli

Los primeros trabajos sobre la enfermedad del trébol (Bennets et al., 1946) ya describían como principal alteración debida al consumo de fitoestrógenos, una hiperplasia quística glandular del endometrio.

El hiperestrogenismo es la principal etiología de los quistes glandulares en ovino (McKentee, 1990), y se ha observado que existe una relación entre la severidad de esta lesión y el grado de infertilidad (Davies y Nairn, 1964).

Por tanto, el consumo de alfalfa que contenga cantidades moderadas de coumestrol por largos períodos de tiempo, puede producir lesiones morfológicas en el aparato reproductor similares, aunque menos severas, a las producidas por el trébol estrogénico. Las lesiones que hemos encontrado en nuestro estudio pueden considerarse como reversibles y posiblemente desaparecieran al cesar el estímulo estrogénico (Flores, 1993).

***CONCLUSIONES***

## **6.- CONCLUSIONES.**

1ª.- Las praderas de alfalfa "Tierra de Campos" en secano, y para las condiciones experimentales de nuestro estudio, presentan un contenido en coumestrol moderado, no superando en general las 30 ppm, correspondiendo el máximo al otoño (34 ppm) y el mínimo a los meses de verano (8,18 ppm).

2ª.- Niveles de coumestrol entre 20-30 ppm en la alfalfa, cuando se administra a las ovejas en pastoreo, son suficientes para producir un aumento significativo en el volumen de moco cervical y una disminución en la elasticidad el mismo.

3ª.- El perfil de descarga preovulatoria de LH no se ve afectado por el pastoreo de alfalfa de secano con niveles de coumestrol inferiores a 35 ppm.

4ª.- El consumo de alfalfa de secano con un contenido en coumestrol superior a 20 ppm, produce una disminución en las concentraciones plasmáticas de progesterona al inicio del pastoreo. Sin embargo, después de un pastoreo prolongado, no existen diferencias significativas en las concentraciones de progesterona respecto a ovejas controles.

5ª.- El pastoreo prolongado de alfalfa en secano, con un contenido global medio de 20 ppm de coumestrol, induce alteraciones morfológicas en el aparato reproductor de la oveja, confirmando estudios anteriores. Estos cambios afectan fundamentalmente al endometrio y cuello uterino, que presentan formaciones quísticas y mayor actividad glandular, aunque las lesiones encontradas no alcanzan la gravedad de las descritas en la enfermedad del trébol.

6ª.- Niveles de coumestrol en la alfalfa por debajo de 20 ppm no alteran de forma significativa, en ovejas Manchegas, ninguno de los parámetros reproductivos estudiados.

7ª.- Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que el pastoreo de alfalfa con concentraciones moderadas de coumestrol (por debajo de las 30 ppm), aunque puede provocar algunos desórdenes, no alteran de forma significativa los parámetros reproductivos estudiados en ovejas de raza Manchega. No obstante, ante las variaciones en el contenido fitoestrogénico de la alfalfa y la dificultad de su cuantificación, es recomendable retirar a los animales del pasto entre 15 y 30 días antes de las cubriciones, o al menos disminuir su consumo.

***RESUMEN***

## 7.- RESUMEN.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto del pastoreo de alfalfa en secano sobre las características del moco cervical, los perfiles hormonales de LH y progesterona y la morfología del aparato reproductor, de ovejas Manchegas. Así mismo se ha estudiado la influencia que sobre estos parámetros pudiera tener la estación (debido a las posibles variaciones en el contenido en coumestrol de la alfalfa) y el tiempo de pastoreo. Para ello se han realizado tres experiencias: la primera se llevó a cabo en el otoño de 1991, con un período de pastoreo de 2 meses; la segunda experiencia se realizó en la primavera de 1992, con un período de pastoreo de dos meses y la tercera experiencia en el otoño de 1992, cuando el tiempo de pastoreo era aproximadamente de 1 año.

El mayor contenido en coumestrol de la alfalfa correspondió a los meses de otoño y el menor a los meses de verano.

Excepto en la experiencia realizada en primavera, las ovejas que pastaron alfalfa presentaron un volumen de moco cervical significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que las ovejas controles, mientras que la elasticidad o spinnbarkeit del moco cervical fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ).

El perfil de descarga preovulatoria de LH no se vio afectado por el pastoreo de alfalfa de secano, mientras que las concentraciones plasmáticas de progesterona fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) durante la primera experiencia en el lote de alfalfa. Ni en la primavera ni en el segundo año de estudio existieron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de progesterona.

Las ovejas de los lotes de alfalfa presentaron, después de un año de pastoreo, alteraciones morfológicas a nivel del cuello uterino y del endometrio. Estas alteraciones consistieron en la presencia de quistes y una mayor actividad glandular, aunque las lesiones no llegaron a ser tan graves como las descritas en la enfermedad del trébol.

## **8.- ABREVIATURAS.**

**c.c.:** Condición corporal

**FGA:** Acetato de fluorogestona

**FSH:** Hormona foliculo estimulante

**LH:** Hormona luteinizante

**M.S.:** Materia seca

**P. osmótica:** Presión osmótica.

**P. espermática:** Penetración espermática.

**P.V.:** Peso vivo

**P<sub>4</sub>:** Progesterona

**μ:** Media aritmética

**r:** Coeficiente de correlación

**E.S.M.:** Error standar de la media

## ***BIBLIOGRAFIA***

**9.- BIBLIOGRAFIA.**

**ABECIA, J.A., FORCADA, F., SAÑUDO C. (1991).** Niveles de progesterona al inicio de la gestación en ganado ovino: influencia de la tasa de ovulación y de la raza. *ITTEA. IV Jornadas sobre Producción Animal. Vol. extra, n° 11: 160-162.*

**ADAMS, N.R. (1975).** Relationship between cervical mucus spinbarkheit and the direction of sperm migration in ewes with clover disease. *J. Reprod. Fert., 43: 391-392.*

**ADAMS, N.R. (1976a).** Cervical mucus changes in infertile ewes previously exposed to oestrogenic subterranean clover. *Res. Vet. Sci., 21: 59-63.*

**ADAMS, N.R. (1976b).** Altered ovarian function in ewes after prolonged exposure to plant estrogens. *Theriogenology, 6: 625.*

**ADAMS, N.R. (1976c).** Pathological changes in the tissues of infertile ewes with clover disease. *J. Comp. Path., 86: 29-35.*

**ADAMS, N.R. (1977).** Cervical mucus and reproductive efficiency in ewes after exposure to oestrogenic pastures. *Aust. J. Agric. Res., 28: 481-489.*

**ADAMS, N.R. (1978).** Sexual behaviour responses of the ovariectomized ewe to oestradiol benzoate, y their persistent reduction after exposure to phyto-oestrogens. *J. Reprod. Fert., 53: 203-208.*

**ADAMS, N.R. y TANG, B.Y. (1979).** Changes in ovine cervical mucus in response to oestrogen treatment. *J. Reprod. Fert., 57: 261-266.*

**ADAMS, N.R. (1981).** A changed responsiveness to oestrogen in ewes with clover disease. *J. Reprod. Fert., suppl.30: 223-230.*

**ADAMS, N.R., HEARNshaw, H., y OLDHAM, C.M. (1981).** Abnormal function of the corpus luteum in some ewes with phyto-oestrogenic infertility. *Aust. J. Biol. Sci.*, 34: 61-65.

**ADAMS, N.R. y NAIRN, M.E. (1983).** The nature of dystokia in ewes after grazing oestrogenic subterranean clover. *Aust. Vet. J.*, 60: 124-125.

**ADAMS, N.R. (1986).** Morphogenic change in the cervix of the ewe after prolonged exposure to oestradiol-17 $\beta$ . *J. Reprod. Fert.*, 76: 727-733.

**ADAMS, N.R. y TANG, B.Y. (1986).** Changed control of cervical secretion from infertile ewes previously exposed to oestrogenic clover pasture. *J. Reprod. Fert.*, 76: 147-152.

**ADAMS, N.R. (1990).** Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens. *Aust. Vet. J.*, 67: 197-201.

**ALEGRE J. (1991).** Análisis de un sistema de producción de carne de ovino basado en praderas de alfalfa (*Medicago sativa L.*) en seco: productividad del pasto, cebo de corderos y características de las canales. *Tesis Doctoral.E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Madrid.*

**ALLISTON, C.W., PATTERSON, T.B. y ULBERG, L.C. (1958).** Crystallization patterns of cervical mucus as related to estrus in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 17: 322-325.

**BARBERAN, M. y VALDERRABANO, J. (1989).** Efecto de la administración prolongada de alfalfa a carneros jóvenes. *ITEA*, 9: 160-162.

**BARBERAN, M., VALDERRABANO, J. y BASCUAS, J.A. (1990).** Histopathological changes in ewe lambs exposed to prolonged diet on lucerne. *Ann. Rech. Vét.*, 21: 161-166.

**BARRET, J.F., GEORGE, J.M. y LAMOND, D.R. (1965).** Reproductive performance of merino ewes grazing red clover (*Trifolium pratense L.*), improved pasture, or native pasture. *Aust. J. Agric. Res.*, 16: 189-200.

**BATTERHAM, T.J., HART, N.K. y LAMBERTON, J.A. (1965).** Metabolism of oestrogenic isoflavones in sheep. *Nature.*, 206: 509.

**BATTERHAM, T.J., SHUTT, D.A., HART, N.K., BRADEN A.W.H. y TWEEDDALE, H.J. (1971).** Metabolism of intraruminally administered [4-<sup>14</sup>C] formononetin y [4-<sup>14</sup>C] biochanin A in sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 22: 131-138.

**BAUMINGER, S., LINDNER, H.R., PEREL, E. y ARNON, R. (1969).** Antibodies to a phyto-oestrogen: antigenicity of genistein coupled to a synthetic polypeptide. *J. Endocr.*, 44: 567-578.

**BECK, A.B. (1964).** The oestrogenic isoflavones of subterranean clover. *Aust. J. Agric. Res.*, 15: 223-230.

**BECK, A.B. y GARDINER, M.R. (1965).** Clover disease of sheep in Western Australia. *J. Agric. West. Aust.*, 6: 390-400.

**BENNETTS, H.W., UNDERWOOD, E.J. y SHIER, F.L. (1946).** A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust. Vet. J.*, 22: 2-12.

**BENNETT, D., MORLEY, F.H.W. y AXELSEN, A. (1967).** Bioassay responses of ewes to legume swards. II. Uterine weight results from swards. *Aust. J. Agric. Res.*, 18: 495-504.

**BICKOFF, E.M., BOOTH, A.N., LYMAN, R.L., LIVINGSTON, A.L., THOMPSON, C.R. y DEEDS, F. (1957).** Coumestrol, a new estrogen isolated from forage crops. *Science*, 126: 969-970.

**BICKOFF, E.M., LIVINGSTON, A.L., BOOTH, A.N., HENDRICKSON, A.P. y KOHLER, G.O. (1960).** Estrogenic activity in dehydrated and suncured forages. *J. Anim. Sci.*, 19: 189-197.

**BICKOFF, E.M., SPENCER, R.R., KNUCKLES, B.E. y LUNDIN, R.E. (1966).** 3'-Methoxycoumestrol from alfalfa: isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 14: 444-446.

**BORQUE, C., VAZQUEZ, I., SAGÜES, A., GARCIA, C., GARDE, J. (1992).** Influence of photoperiod in biochemical tracers of semen. *43 Reunion Anual de la Federación Europea de Zootecnia. Madrid. Septiembre 1992.*

**BRADBURY, R.B. y WHITE, D.E. (1954).** Estrogens and related substances in plants. *Vitam. Horm.*, 12: 207-233.

**BRADEN, A.W.H., SOUTHCOTT, W.H. y MOULE, G.R. (1964).** Assessment of oestrogenic activity of pastures by means of increase of teat length in sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 15: 142-152.

**BRADEN, A.W.H., HART, N.K. y LAMBERTON, J.A. (1967).** The oestrogenic activity y metabolism of certain isoflavones in sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 18: 335-348.

**BUGALIA, N.S., SHARMA, R.D. y BISWAS, R.K. (1988).** Sialo proteins and phosphatases in estrual cervical mucus of fertile and repeat breeder buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 30: 837-841.

**BURROUGHS, C.D., MILLS, K.T. y BERN, H.A. (1990).** Reproductive abnormalities in female mice exposed neonatally to various doses of coumestrol. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 30: 105-122.

**CLARK, N.T. (1965).** Effect of antepartum injections of stilboestrol dipropionate on lambing behaviour of ewes. *Aust. Vet. J.*, 41: 300.

**CLEGG, M.T. y GANONG, W.F. (1960).** The effect of hypothalamic lesions on ovarian function in the ewe. *Endocrinology*, 67: 179-186.

**COOP, I.E. y CLARK, V.R. (1960).** The reproductive performance of ewes mated on lucerne. *N.Z.J. Agric. Res.*, 3: 922-933.

**COOP, I.E. (1977).** Depression of lambing percentage from mating on lucerne. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, 37: 149-151.

**COX, R.I., WONG, M.S.F., BRADEN, A.W., TRIKOJUS, V.M. y LINDNER, H.R. (1972).** The formation and specificity of antibodies to phyto-oestrogens in the sheep. *J. Reprod. Fert.*, 8: 157-158.

**COX, R.I. y BRADEN, A.W. (1974).** The metabolism y physiological effects of phyto-oestrogens in livestock. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 10: 122-129.

**COX, R.I., COLLINS, W.J., WILSON, P.A. y WONG, M.S.F. (1984).** Potential biological inactivation of pasture oestrogens in the animal - immunization or metabolic

deflection. *En: Reproduction in sheep*. Ed.: Lindsay, D.R. & Pearce, D.T. Aust. Acad. Sci., Canberra; 368-370.

**CROKER, K.P. y SHELTON, J.N. (1974).** The effects of exogenous progestagen and oestrogen on cervical mucus in the ewe. *Aust. J. Agric. Res.*, 25: 331-337.

**CROKER, K.P., LIGHTFOOT, R.J., JOHNSON, T.J., ADAMS, N.R. y CARRICK, M.J. (1989).** The effects of selection for resistance to clover infertility on the reproductive performances of merino ewes grazed on oestrogenic pastures. *Aust. J. Agric. Res.*, 40: 165-176.

**CH'ANG, T.S. (1961).** Reproductive performance of New Zealand Romney sheep grazed on red clover (*Trifolium pratense*) pastures. *J. Agric. Sci.*, 57: 123-127.

**CHAMLEY, W.A., ADAMS, N.R., HOOLEY, R.D. y CARSON, R. (1981).** Hypothalamic-pituitary function in normal ewes and ewes which grazed oestrogenic subterranean clover for several years. *Aust. J. Biol. Sci.*, 34: 239-44.

**CHAMLEY, W.A., CLARKE, I.J. y MORAN, A.R. (1985).** Seasonal changes in LH secretion in normal ewes and ewes which grazed oestrogenic clover. *Aust. J. Biol. Sci.*, 38: 109-113.

**CHILTON, B.S., NICOSIA, S.V. y LAUFER, M.R. (1980).** Effect of estradiol-17 $\beta$  on endocervical cytodifferentiation y glycoprotein biosynthesis in the ovariectomized rabbit. *Biology of Reproduction.*, 23: 677-686.

**CHRÉTIEN, F.C., COHEN, J. y PSYCHOYOS, A. (1974).** A scanning electron microscope study of changes in baboon cervical mucus during the menstrual cycle. *J. Reprod. Fert.*, 40: 447-449.

- DAVIES, H.L. y NAIRN, M. (1964).** Correlation between lambing performance y incidence of cystic endometrium in ewes. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 5: 62-63.
- DE VUYST, HENRIET, VERVACK, ARNOUD y VAN BELLE. (1960).** Estudio del moco cervical en los bóvidos. *Zootechnia*, 9: 55-63.
- DELGADO, I., RAMON, J Y VALDERRABANO J. (1992).** Efecto del pastoreo directo sobre un cultivo de alfalfa. *Invest. Agr.: Prod. San. Anim.*, 7 (1): 71-80.
- DEVERALL, B.J. (1977).** Defense mechanisms of plants. *Ed: Cambridge Univ. Press. Cambridge*: pp. 73.
- DONNELLY, JR., MORLEY, F.H.W. y MCKINNEY, G.T. (1982).** The productivity of breeding ewes grazing on lucerne or grass y clover pastures on the tablelands of Southern Australia. I. Reproduction. *Aust. J. Agric. Res.*, 33: 1085-1097.
- EDGAR, D.G. y ASDELL, S.A. (1960).** Spermatozoa in the female genital tract. *J. Endocr.*, 21: 321-326.
- EL SAMANNOUDY, F.A., SHAREHA, A.M., GHANNUDI, S.A., GILLALY, G.A. y EL MOUGY, S.A. (1980).** Adverse effects of phytoestrogens-. 7. Effect of  $\beta$ -sitosterol treatment on follicular development, ovarian structure and uterus in the immature female sheep. *Cell. Molec. Biol.*, 26: 255-266.
- EVANS, G. y MAXWELL, W.M.C. (1989).** Manejo y valoración del semen. *En: Inseminación artificial de ovejas y cabras. Ed: Acribia*. 95-107.
- FABER, K.A. y HUGHES, C.L. (1991).** The effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol, genistein, and zearalenone on pituitary responsiveness and sexually

dimorphic nucleus volume in the castrated adult rat. *Biology of Reproduction*, 45: 649-653.

**FELS, H.E. y NEIL, H.G. (1968).** Effects on reproduction of prolonged grazing of oestrogenic pastures by ewes. *Aust. J. Agric. Res.*, 19: 1059-1068.

**FINDLAY, J.K., BUCKMASTER, J.M., CHAMLEY, W.A., CUMMING, I.A., HEARNshaw H. y GODING, JR. (1973).** Release of luteinizing hormone by oestradiol-17 $\beta$  and a gonadotrophin-releasing hormone in ewes affected with clover disease. *Neuroendocrinology*, 11: 57-66.

**FLORES, J.M. (1993).** Comunicación personal.

**FOLCH, J., COCERO, M.J., DE LA FUENTE, J y VALDERRABANO J (1989).** Calidad embrionaria, fertilidad y prolificidad de las ovejas sometidas a dieta única de alfalfa. III Jornadas sobre Producción Animal. *ITEA*. 9: 283-285.

**FOLCH, J., PURROY, A. Y VALDERRABANO, J (1991).** Influencia de la alimentación sobre la reproducción de la oveja. Alimentación del ganado ovino II. *Ovis*, nº13: 9-23.

**FOLMAN, Y. y POPE, G.S. (1966).** The interaction in the mature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other utero-vaginitrophic compound of low potency. *J. Endocrin.*, 34: 215-225.

**FORSBERG, J.G. (1969).** The development of atypical epithelium in the mouse uterine cervix and vaginal fornix after neonatal oestradiol treatment. *Br. J. Exp. Path.*, 50: 187-195.

**FOWLER, M.E. (1983).** Plant poisoning in free-living wild animals: a review. *J. Wildlife Dis.*, 19: 34-43.

**FRANCIS, C.M. y MILLINGTON, A.J. (1965).** Wether bioassay of annual pasture legumes. IV. The oestrogenic activity of annual medic pastures. *Aust. J. Agric. Res.*, 16: 927-935.

**FRANCIS, C.M. y DEVITT, A.C. (1969).** The effect of waterlogging on the growth and isoflavone concentration of *Trifolium subterraneum* L. *Aust. J. Agric. Res.*, 20: 819-825.

**FREDRICKS, G.R., KINCAID, R.L., BONDIOLI, K.R. y WRIGHT, R.W. (1981).** Ovulation rates y embryo degeneracy in female mice fed the phytoestrogen, coumestrol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 167: 237-241.

**GADDUM-ROSSE, P., BLANDAU, R.J. y LEE, W.I. (1980).** Sperm penetration into cervical mucus in vitro. I. Comparative studies. *Fertil. Steril.*, 33: 636-643.

**GARDINER, M.R. y NAIRN, M.E. (1969).** Studies on the effect of cobalt y selenium in clover disease of ewes. *Aust. Vet. J.*, 45: 215-222.

**GIBBONS, R.A. y MATTNER, P. (1966).** Some aspects of the chemistry of cervical mucus. *Int. J. Fert.*, 11: 366-372.

**GIBBONS, R.A. y SELLWOOD, R. (1973).** The macromolecular biochemistry of cervical secretions. *En: The biology of the cervix.* Ed.: Blandau, R.J. & Moghissi, K. University of Chicago Press. Chicago. 251-265.

**GOLDENBERG, R.L., VAITUKAITIS, J.L. y ROSS, G.T. (1972).** Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology*, 90: 1492-1498.

**GOMEZ BRUNET, M.A. (1989).** Estudio endocrino de las variaciones estacionales de la actividad reproductiva de la oveja y su efecto sobre el post-parto y la lactación. *Tesis Doctoral. Madrid.* Ftad. de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense.

**GOODMAN, R.L. y KARSCH, F.J. (1980).** Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential supression by ovarian steroids. *Endocrinology*, 107: 1286-1290.

**GOODMAN, R.L., BITTMAN, E.L., FOSTER, D.L. Y KARSCH, F.J. (1982).** Alterations in the control of luteinizing hormone pulse frequency underlie the seasonal variation in estradiol negative feedback in the ewe. *Biology of Reproduction*, 27: 580-589.

**GREGOIRE, A.T., KANDIL, O. y BEYER, G. (1972).** The acid and alkaline phosphatase activity in human cervical mucus of females using either a coil or combined therapy. *Fertil. Steril.*, 23: 15-17.

**GUGGOLZ, J., LIVINGSTON, A.L. y BICKOFF, E.M. (1961).** Detection of daidzein, formononetin, genistein, and biochanin A in forages. *J. Agric. Food Chem.*, 9: 330-332.

**HAFEZ, E.S.E. (1987a).** Anatomy of Female Reproduction. *En: Reproduction in farm animal.* Ed: Hafez, E.S.E. Lea & Febiger. 5th Edition. Philadelphia. Pag: 35-64.

**HAFEZ, E.S.E. (1987b).** Functional Histology of Reproduction. *En: Reproduction in farm animal.* Ed: Hafez, E.S.E. Lea & Febiger. 5th Edition. Philadelphia. Pag: 65-82.

**HAFEZ, E.S.E. (1987c).** Transport and survival of gametes. *En: Reproduction in farm animal.* Ed: Hafez, E.S.E. Lea & Febiger. 5th Edition. Philadelphia. Pag: 168-188.

**HAMANA, K., EL-BANNA, A.A. y HAFEZ, E.S.E. (1971).** Sialic acid and some physicochemical characteristics of bovine cervical mucus. *Cornell Vet.*, 61: 104-113.

- HANSON, C.H. (1972).** Ciencia y tecnología de la alfalfa. *Ed: Hemisferio Sur.*
- HEARNshaw, H., BROWN, J.M., CUMMING, I.A., GODING, J.R. y NAIRN, M. (1972).** Endocrinological and histopathological aspects of the infertility in the ewe caused by oestrogenic clover. *J. Reprod. Fert.*, 8: 160-161.
- HEARNshaw, H., CUMING, I.A. y GODING, J.R. (1977).** Effect of ingestion of oestrogenic clover on luteinizing hormone release in the ovariectomized ewe. *Aust. J. Biol. Sci.*, 30: 217-223.
- HETTLER, J.A. y KITTS, W.D. (1983).** Effects of phyto-estrogenic consumption on plasma LH levels in cycling ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 6: 233-238.
- HEYDON, R.A. y ADAMS, N.R. (1979).** Comparative morphology and mucus histochemistry of the ruminant cervix: differences between crypt and surface epithelium. *Biology of Reproduction*, 21: 557-562.
- HEYDON, R.A. y ADAMS, N.R. (1977).** Histochemical studies on cervical glands in ewes with clover disease. *J. Comp. Path.*, 87: 353-361.
- HOLST, P.J. y BRADEN, A.W.H. (1972).** Ovum transport in the ewe. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 167-173.
- HUGHES, C.L. (1988a).** Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environmental Health Perspectives*, 78: 171-175.
- HUGHES, C.L. (1988b).** Effects of phytoestrogens on GnRH-induced luteinizing hormone secretions in ovariectomized rats. *Reprod. Toxic.*, 1: 179-181.

- HUNTER, R.H.F. (1992).** Curso superior de Reproducción Animal. Instituto Agronómico del Mediterráneo de Zaragoza. C.I.H.E.A.M. (27 de Abril-19 de Junio)
- INRA. (1988).** Alimentation des bovins, ovins & caprins. Institut National de la Recherche Agronomique. Francia. *Ed: Mundi-Prensa.*
- JAGUSCH, K.T., SMITH, J.F y KELLY, R.W. (1977).** Effect of feeding lucerne during mating on the fertility of ewes. *Proceeding of the Nutrition Society of New Zealand, 2:* 161.
- JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C. y PALMER, N. (1985).** Pathology of domestic animals. *Ed: Academic Press, Inc., Orlando.*
- JURADO, R. (1983).** Fitoestrógenos. *En: Introducción a la toxicología veterinaria. Ed: Tebar Flores. Pág.: 292-297.*
- KAIN, W.M. y BIGGS, D.R. (1980).** Effect of pea aphid and bluegreen lucerne aphid (*Acyrtosiphon* spp.) on coumestrol levels in herbage of lucerne (*Medicago sativa*). *N.Z.J. Agric. Res., 23:* 563- 568.
- KALDAS, R.M. y HUGHES, C.L. (1989).** Reproductive y general metabolic effects of phytoestrogens in mammals. *Reprod. Toxic., 3:* 81-89.
- KALTENBACH, C.C. y DAVIES, H.L. (1970).** Fertilization, sperm transport, and early embryonic loss in ewes grazed on cultivars of subterranean clover (*T. subterraneum*). *Aust. J. Agric. Res., 21:* 107-114.
- KAPLANSKI, O., SHEMESH, M. y BERMAN, A. (1981).** Effects of phyto-oestrogens on progesterone synthesis by isolated bovine granulosa cells. *J. Endocr., 89:* 343-348.

**KARSCH, F.J., FOSTER, D.L., BITTMAN, E.L. y GOODMAN, R.L. (1983).** A role for estradiol in enhancing luteinizing hormone pulse frequency during the follicular phase of the estrous cycle of the sheep. *Endocrinology*, 113: 1333-1339.

**KARSCH, F.J. (1984).** Endocrine and environmental control of oestrous cyclicity in sheep. *En: Reproduction in sheep. Ed:Lindsay, D.R. & Pearce, D.T. Aust. Acad. Sci., Canberra. 10-15.*

**KATZ, D.F., MORALES, P., SAMUELS, S.J. y OVERSTREET, J.W. (1990).** Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus. *Fertil. Steril.*, 54: 513-516.

**KELLY, R.W. (1972).** The oestrogenic activity of coumestans in ovariectomized ewes. *J. Reprod. Fert.*, 8: 159.

**KELLY, R.W. Y LINDSAY, D.R. (1975).** Change with length of feeding period in the oestrogenic response of ovariectomized ewes to ingested coumestans. *Aust. J. Agric. Res.*, 26: 305-11.

**KELLY, R.W., ADAMS, N.R. y LINDSAY, D.R. (1976a).** Effect of coumestans on reproduction in the ewe. *Aust. J. Agric. Res.*, 27: 253-259.

**KELLY, R.W., ALLISON, A.J. y SHIRLEY, D.K. (1976b).** Interaction between phyto-oestrogens and steroids in the cervical mucus and uterine weight responses in ewes. *Aust. J. Agric. Res.*, 27: 101-107.

**KELLY, R.W., SHACKELL, G.H. y ALLISON, A.J. (1980).** Reproductive performance of ewes grazing red clover (*Grasslands pawera*) or white clover-grass pasture at mating. *N.Z.J. Exp. Agric.*, 8: 87-91.

**KITTS, D.D. (1987).** Studies on the estrogenic activity of a coffee extract. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 20: 37-49.

**KREMER, J. (1965).** A simple sperm penetration test. *Int. J. Fert.*, 10: 209-215.

**LAND, R.B. (1976).** The sensitivity of the ovulation rate of Finnish Landrace y Blackface ewes to exogenous oestrogen. *J. Reprod. Fert.*, 48: 217-218.

**LEAVITT, W.W. y WRIGHT, P.A. (1965).** The plant estrogen, coumestrol, as an agent affecting hypophysial gonadotropic function. *J. Exp. Zool.*, 160: 319-328.

**LE BARS, J. y LE BARS, P. (1984).** Méthodes pratiques du dosage du coumestrol dans la luzerne et ses dérivés. *Rev. Med. Vet.*, 135: 73-76.

**LEOPOLD, A.S., ERWIN, M., OH, J., BROWNING, B. (1976).** Phytoestrogens: adverse effects on reproduction in California quail. *Science.*, 191: 98-100.

**LIGHTFOOT, R.J., CROKER, K.P. y NEIL, H.G. (1967).** Failure of sperm transport in relation to ewe infertility following prolonged grazing on oestrogenic pastures. *Aust. J. Agric. Res.*, 18: 755-765.

**LIGHTFOOT, R.J. (1974).** A look recommendations for the control of infertility due to clover disease in sheep. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 10: 113-121.

**LIGHTFOOT, R.J. y WROTH, R.H. (1974).** The mechanism of temporary infertility in ewes grazing oestrogenic subterranean clover prior to y during joining. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 10: 130-134.

**LIGHTFOOT, R.J., SMITH, J.F., CUMMING, I.A., MARSHALL, T., WROTH, R.H. y HEARNshaw, H. (1974).** Infertility in ewes caused by prolonged grazing on

oestrogenic pastures: oestrus, fertilization and cervical mucus. *Aust. J. Biol. Sci.*, 27: 409-414.

**LIGHTFOOT, R.J. y ADAMS, N.R. (1979).** Changes in cervical histology in ewes following prolonged grazing on oestrogenic subterranean clover. *J. Comp. Path.*, 89: 367-373.

**LINDSAY, D.R. y FRANCIS, C.M. (1968).** Cervical mucus measurement in ovariectomized ewes as a bioassay of synthetic and phyto-oestrogens. *Aust. J. Agric. Res.*, 19: 1069-1076.

**LINDSAY, D.R. y FRANCIS, C.M. (1969).** Effect of progesterone and duration of pasture intake on animal mucus response to phyto-oestrogens in sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 20: 719-725.

**LINFORD, E. (1974).** Cervical mucus: an agent or a barrier to conception?. *J. Reprod. Fert.*, 37: 239-250.

**LITTLE, D.L., COX, R.L., WALKER, S.K. y FLAVEL, P.F. (1984).** Effect of steroid immunization on clover induced infertility in sheep. *En: Reproduction in sheep*. Ed.: Lindsay, D.R. & Pearce, D.T. Aust. Acad. Sci., Canberra: 365-367.

**LOPER, G.M., HANSON, C.H. y GRAHAM, J.H. (1967).** Coumestrol content of alfalfa as affected by selection for resistance to foliar diseases. *Crop Science*, 7: 189-192.

**LOPER, G.M. (1968).** Effect of aphid infestation on the coumestrol content of alfalfa varieties differing in aphid resistance. *Crop Science*, 8: 104-106.

**LOPEZ SEBASTIAN, A., GOMEZ, A. y INSKEEP, E.K. (1984).** Effects of a single injection of LHRH on the response of anoestrous ewes to the introduction of rams. *J. Anim. Sci.*, 59: 277-283.

**LOPEZ SEBASTIAN, A. (1989a).** Estacionalidad en la reproducción. En: Mecanismos endocrinos de la reproducción. *Ed: Ovis n° 1: 59-72.*

**LOPEZ SEBASTIAN, A. (1989b).** El ciclo sexual. En: Mecanismos endocrinos de la reproducción. *Ed. Ovis, n° 1: 43-57.*

**LOPEZ SEBASTIAN, A., PICAZO, R.A., BARRAGAN, M.L. COCERO, M.J., GOMEZ, A. y CABELLOS, B. (1992).** Increase in ovulation rate after the treatment with a single injection of FSH-P diluted in propylene glycol in ewes synchronized with cloprostenol. *Reunion Scientifique de L'Association Européenne de Transfert Embryonnaire.*

**M.A.P.A. (1990).** Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

**MARTIN, P.M., HORWITZ, K.B., RYAN, D.S. y McGUIRE, W.L. (1978).** Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 103: 1860-1867.

**MATHIESON, R.A. y KITTS, W.D. (1980).** Binding of phyto-oestrogen y oestradiol-17 $\beta$  by cytoplasmic receptors in the pituitary gland y hypothalamus of the ewe. *J. Endocr.*, 85: 317-325.

**MATOUŠEK, J., ŘÍHA, J., SRŠEŇ, V., VESELSKÝ, L. y LOUDA, F. (1989).** Penetration of cervical mucus and other body fluids by bull sperm in capillary tubes. *Anim. Reprod. Sci.*, 18: 161-166.

**MATTNER, P.E. (1966).** Formation and retention of the spermatozoan reservoir in the cervix of the ruminant. *Nature*, 212: 1479-1480.

**MATTNER, P.E. (1968).** The distribution of spermatozoa and leucocytes in the female genital tract in goats and cattle. *J. Reprod. Fert.*, 17: 253-261.

**MATTNER, P.E. (1973).** The cervix and its secretions in relation to fertility in ruminants. En: *The biology of the cervix*. Ed.: Blandau, R.J. & Moghissi, K. University of Chicago Press. Chicago. 339-350.

**MAXWELL, J.A.L. (1970).** Field observations on four outbreaks of maternal dystocia in the merino ewe. *Aust. Vet. J.*, 46: 533-536.

**McKENTEE, K. (1990).** The uterus: atrophic, metaplastic and proliferative lesions. En: *Reproductive Pathology of Domestic Mamals*. Academic Press, Inc. San Diego, 167-168.

**MEDINA BLANCO, M., PEINADO LUCENA, E. y GOMEZ CASTRO, A.G. (1982a).** Isoflavonas estrogénicas en especies espontáneas del genero *Trifolium*. *Arch. Zootec.*, 31: 269-277.

**MEDINA BLANCO, M., GOMEZ CASTRO, A.G. y PEINADO LUCENA, E. (1982b).** Modificaciones estacionales del contenido estrogénico de pastos naturales. *Arch. Zootec.*, 31: 193-204.

**MEHMOOD, A., AKHTAR, S., ULLAH, N. y KHAN, M.L. (1991).** The use of the probit model to predict pregnancy status of buffalo based on physio-chemical properties of estrual mucus. *Theriogenoly*, 36: 117-122.

**MILLINGTON, A.J., FRANCIS, C.M. y McKEOWN, N.R. (1964a).** Wether bioassay of annual pasture legumes. I. Oestrogenic activity in *Medicago tribuloides* *desr. var. cyprus* relative to four strains of *Trifolium subterraneum* L. *Aust. J. Agric. Res.*, 15: 520-526.

**MILLINGTON, A.J., FRANCIS, C.M. y McKEOWN, N.R. (1964b).** Wether bioassay of annual pasture legumes. II. The oestrogenic activity of nine strains of *Trifolium subterraneum* L. *Aust. J. Agric. Res.*, 15: 527-536.

**MOGHISSI, K.S., SEGAL, S., MEINHOLD, D. y AGRONOW, S.J. (1982).** In vitro sperm cervical mucus penetration: studies in human and bovine cervical mucus. *Fertil. Steril.*, 37: 823-827.

**MONTGOMERY, G.W., MARTIN, G.B., LE BARS, J. y PELLETIER, J. (1985).** Gonadotrophin release in ovariectomized ewes fed different amounts of coumestrol. *J. Reprod. Fert.*, 73: 457-463.

**MORLEY, F.H.W., AXELSEN, A. y BENNETT, D. (1964).** Effects of grazing red clover (*Trifolium pratense*, L.) during the joining season on ewe fertility. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 5: 58-61.

**MORLEY, F.H.W., AXELSEN, A. y BENNETT, D. (1966).** Recovery of normal fertility after grazing on oestrogenic red clover. *Aust. Vet. J.*, 42: 204-206.

**MURASE, T., OKUDA, K. y SATO, K. (1990a).** Assessment of bull fertility using a mucus penetration test and a human chorionic gonadotrophin stimulation test. *Theriogenology*, 34: 801-812.

**MURASE, T. y BRAUN, J.W. (1990b).** Impact of methodological factors on sperm penetration into cervical mucus in cattle. *Theriogenology*, 34: 73-80.

**MUSLERA, E., RATERA, C. (1984).** Praderas y forrajes, producción y aprovechamiento. *Ed.: Mundi-Prensa. Madrid.*

**NEIL, H.G. y MARSHALL, T. (1970).** Superphosphate deficiency raises pasture oestrogens. *J. Agric. West. Aust., 11: 43-44.*

**NELSON, K., PAVLIK, E.J., NAGELL, JR., HANSON, M.B., DONALDSON, E.S. y FLANIGAN, R.C. (1984).** Estrogenicity of coumestrol in the mouse: fluorescence detection of interaction with estrogen receptors. *Biochemistry., 23: 2565-2572.*

**NEWSOME, F.E. y KITTS, W.D. (1977).** Effects of alfalfa consumption on oestrogen levels in ewes. *Can. J. Anim. Sci., 57: 531-535.*

**NILSSON, A. (1962).** Demethylation of the plant estrogen formononetin to daidzein in rumen fluid. *Ark. Kemi., 19: 549-550.*

**NOTEBOOM, W.D., HISAW, F.L., FOX, C.W. y OLDFIELD, J.E. (1961).** The effect of plant estrogens on histology of seminal vesicles in sheep. *J. Anim. Sci., 20: 677-678.*

**NOTTLE, M.C. y BECK, A.B. (1974).** Urinary sediments in sheep feeding on oestrogenic clover. III. The identification of 4'-O-metil equol as a major component of some sediments. *Aust. J. Agric. Res., 25: 509-514.*

**OBST, J.M. y SEAMARK, R.F. (1970).** Plasma progesterone concentrations during the reproductive cycle of ewes grazing yarloop clover. *J. Reprod. Fert., 21: 545-547.*

**OBST, J.M. y SEAMARK, R.F. (1971).** Haemoglobin type and fertility of merino ewes grazing oestrogenic (Yarloop clover) pastures. *Nature, 232: 497-498.*

**OBST, J.M., SEAMARK, R.F. y McGOWAN, C.J. (1972).** Plasma hormone levels during pregnancy in ewes grazing oestrogenic clover. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 9: 204-208.

**OBST, J.M. y SEAMARK, R.F. (1975).** Hormone studies on ewes grazing an oestrogenic (Yarloop clover) pasture during the reproductive cycle. *Aust. J. Biol. Sci.*, 28: 279-290.

**ODEBLAD, E. (1968).** The functional structure of human cervical mucus. *Acta Obstet. gynec. Scand.*, 67, suppl.1: 59.

**ODEBLAD, E. y RUDOLFSSON, C. (1973).** Types of cervical secretions: biophysical characteristics. *En: The biology of the cervix*. Ed: Blandau, R.J. & Moghissi, K. University of Chicago Press. 267-284.

**OVERSTREET, J.W. (1986).** Evaluation of sperm-cervical mucus interaction. *Fertil. Steril.*, 45: 324-326.

**POZO LORA, R. (1955).** Observaciones sobre la cristalización del moco cervical en la vaca. *Arch. Zootec.*, 4: 318-335.

**RADFORD, H.M. (1967).** The effect of hypothalamic lesions on reproductive activity in the sheep. *J. Endocr.*, 39: 415-422.

**RAMON, J.P., VALDERRABANO, J. y BARBERAN, M. (1987).** Efecto de dietas de alfalfa sobre el aparato reproductor de las ovejas. II Jornadas de Producción Animal. *ITEA*, 7: 334-336.

**RAMON, J.P. (1987).** Posibilidades de utilización de la alfalfa en pastoreo directo en un sistema intensivo de producción de corderos. *Tesis Master*. Instituto Agronómico del Mediterráneo de Zaragoza, (C.I.H.E.A.M.).

**RAMON, J.P., URIARTE, J, VALDERRABANO, J (1989).** Efecto del nivel de oferta sobre la ingestión y producción de ovejas y corderos en pastoreo de alfalfa. *Invest. Agr.: Prod. San. Anim.*, 4 (1): 55-65.

**RAMON, J.P., VALDERRABANO, J y FOLCH, J (1993).** Reproductive performance of Rasa Aragonesa ewes mated on lucerne (*Medicago sativa* cv. Aragón) pastures. *Small Ruminant Research*, 11: 323-329.

**RATTRAY, P.V., JAGUSH, K.T., DUGANZICH, D.M., McLEAN, K.S. y LINCH, R.J. (1982).** Influence of feeding post-lambing on ewe and lamb performance at grazing. *Procc.N.Z.Anim.Prod.*, 42: 179-182.

**RESTALL, B.J (1969).** The influence of the fluids from the genital tract of the ewe on the survival of ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22: 1517-1525.

**RIZZOLI, D.J y MORAN, A.R. (1977).** Permanent clover infertility in ewes. *Aust. Vet. J.*, 53: 190-191.

**ROBERTS, G.P., PARKER, J.M. y SYMONDS, H.W. (1976).** Macromolecular components of genital tract fluids from the sheep. *J. Reprod. Fert.*, 48: 99-107.

**RODGERS, R.J, CLARKE, L.J, FINDLAY, J.K, BROWN, A., CUMMING, I.A., MULLER, B.D. y WALKER, S.K. (1980).** Plasma LH and FSH in ewes that were either fertile or infertile after long-term grazing of oestrogenic pasture. *Aust. J. Biol. Sci.*, 33: 213-220.

**ROSSITER, R.C. y BECK, A.B. (1966).** Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*T. subterraneum* L.). I. Effects of temperature. *Aust. J. Agric. Res.*, 17: 29-37.

**ROSSITER, R.C. y BECK, A.B. (1967).** Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*T. subterraneum* L.). III. Effects of light. *Aust. J. Agric. Res.*, 18: 23-37.

**ROSSITER, R.C. (1969).** Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*T. subterraneum* L.). VII. Effects of nitrogen supply. *Aust. J. Agric. Res.*, 20: 1043-1051.

**ROSSITER, R.C. (1970).** Factors affecting the oestrogen content of subterranean clover pastures. *Aust. Vet. J.*, 46: 141-144.

**SAIZ CIDONCHA, F., MARINO, M., PEREZ GARCIA, T. (1980).** Aparición de la pubertad y actividad cíclica estacional en la oveja de raza Manchega. *9 th Int. Cong. Anim. Reprod. & A.I.*, 4: 337-339.

**SAUER, M.A., RIFKA, S.M., HAWKS, R.L., CUTTER, G.B. y LORIAUX, D.L. (1983).** Marijuana: interaction with the estrogen receptor. *JJ. Pharmacol. Exp. Ther.*, 224: 404-407.

**SCALES, G.H. y MOSS, R.A. (1977).** Reproductive performance of ewes mated on lucerne. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, 37: 152-157.

**SCARAMUZZI, R.J., LINDSAY, D.R. y SHELTON, J.N. (1971a).** The effect of oestradiol benzoate on the duration of oestrous behaviour in the ovariectomized ewe. *J. Endocr.*, 50: 345-346.

**SCARAMUZZI, R.J., TILLSON, S.A., THORNEYCROFT, L.H. y CALDWELL, B.V. (1971b).** Action of exogenous progesterone and estrogen on behavioral estrus and luteinizing hormone levels in the ovariectomized ewe. *Endocrinology*, 88: 1184-1189.

**SCHINCKEL, P.G. (1948).** Infertility in ewes grazing subterranean clover pastures. *Aust. Vet. J.*, 24: 289-294.

**SELAIVE-VILLARROEL, A.B. y KENNEDY, J.P. (1983).** Fertility studies in young and mature ewes. I. Cervical mucus production. *Theriogenology*, 20: 537-541.

**SETCHELL, K.D.R., BORRIELLO, S.P., HULME, P., KIRK, D.N. y AXELSON, M. (1984).** Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 40: 569-578.

**SETCHELL, K.D.R., GOSSELIN, S.J., WELSH, M.B., JOHNSTON, J.O., BALISTRERI, W.F., KRAMER, L.W., DRESSER, B.L. y TARR, M.J. (1987).** Dietary estrogens - a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology*, 93: 225-233.

**SHEMESH, M., LINDNER, H.R. y AYALON, N. (1969).** Coumestrol and 4'-O-methylcoumestrol in alfalfa grown in Northern Israel: possible effect of a foliar pathogen (*Pseudopeziza medicaginis* [Lib.]). *Refuah Vet.*, 26: 1-7.

**SHEMESH, M., LINDNER, H.R. y AYALON, N. (1972).** Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phyto-oestrogens y its use in a competitive protein-binding radioassay for plasma coumestrol. *J. Reprod. Fert.*, 29: 1-9.

**SHUTT, D.A., AXELSEN, A. y LINDNER, H.R. (1967).** Free and conjugated isoflavones in the plasma of sheep following ingestion of oestrogenic clover. *Aust. J. Agric. Res.*, 18: 647-655.

**SHUTT, D.A. y BRADEN, W.H. (1968).** The significance of equol in relation to the oestrogenic responses in sheep ingesting clover with a high formononetin content. *Aust. J. Agric. Res.*, 19: 545-553.

**SHUTT, D.A., WESTON, R.H. y HOGAN, J.P. (1970).** Quantitative aspects of phyto-oestrogen metabolism in sheep fed on subterranean clover (*Trifolium subterraneum* cultivar clare) or red clover (*Trifolium pratense*). *Aust. J. Agric. Res.*, 21: 713-722.

**SHUTT, D.A. y COX, R.I. (1972).** Steroid y phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors in vitro. *J. Endocr.*, 52: 299-310.

**SIERRA, I. y THOS, J. (1982).** Posibilidades de la explotación del ganado ovino de aptitud cárnica en praderas de regadío. *VII Jorn. Cient. Soc. Esp. Ov. Murcia*.

**SINGER, A. y REID, B.L. (1970).** Effect of the oral-contraceptive steroids on the ultrastructure of human cervical mucus - a preliminary communication. *J. Reprod. Fert.*, 23: 249-255.

**SISSON, S. y GROSSMAN, J.D. (1982).** Anatomía de los animales domésticos. *Ed: Salvat. Barcelona*.

**SMITH, D.C., HUNTER, G.B. y SPANDONI, L.R. (1970).** Alkaline phosphatase concentration in cervical mucus. *Fertil. Steril.*, 21: 549-554.

**SMITH, J.F. (1971a).** Studies on ovine infertility in agricultural regions of Western Australia: cervical mucus production by fertile and infertile ewes. *Aust. J. Agric. Res.*, 22: 513-519.

**SMITH, J.F. (1971b).** Ewe fertility - production of cervical mucus. *J. Reprod. Fert.*, 24: 132.

**SMITH, J.F. (1975).** Studies on ovine infertility in agricultural regions of Western Australia: plasma progesterone levels of fertile and infertile ewes. *Aust. J. Biol. Sci.*, 28: 85-88.

**SMITH, J.F. y JAGUSCH, K.T. (1979).** Coumestans in lucerne y ovulation in ewes. *N.Z.J. Agric. Res.*, 22: 411-416.

**SMITH, J.F., JAGUSCH, K.T., BRUNSWICK, L.F.C. y McGOWAN, L.T. (1980).** The effect of lucerne feeding on ovulation rate in ewes. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, 40: 44-49.

**SMITH, J.F. (1988).** Influence of nutrition on ovulation rate in the ewe. *Aust. J. Biol. Sci.*, 41: 27-36.

**SMITH, J.F. y STEWART, R.D. (1990).** Effects of nutrition on the ovulation rate of ewes. En: *Reproductive Physiology of Merino Sheep.- Concepts and Consequences. School of Agriculture (Animal Science). The University of Western Australia.* 85-101.

**TANG, B.Y. y ADAMS, N.R. (1978a).** Changes in oestradiol-17 $\beta$  binding in the hypothalamic pituitary glands of persistently infertile ewes previously exposed to oestrogenic subterranean clover: evidence of alterations to oestradiol receptors. *J. Endocr.*, 78: 171-177.

- TANG, B.Y. y ADAMS, N.R. (1978b).** Enzyme activities and protein and carbohydrate concentrations in cervical secretions at dioestrus in normal ewes and ewes with permanent phytoestrogenic infertility. *Aust. J. Biol. Sci.*, 31: 241-246.
- TANG, B.Y. y ADAMS, N.R. (1981).** Oestrogen receptors y metabolic activity in the genital tract after ovariectomy of ewes with permanent infertility caused by exposure to phyto-oestrogens. *J. Endocr.*, 89: 365-370.
- TANG, B.Y. y ADAMS, N.R. (1986).** Apparently normal oestrogen receptor system in ovariectomized ewes with impaired response to oestrogen after prolonged grazing on oestrogenic pasture. *J. Endocr.*, 109: 251-255.
- TERNER, C. (1965).** Oxidative and biosynthetic utilization by human spermatozoa of a metabolite of the female reproductive tract. *Nature*, 208: 115-116.
- THOMAS, G.B. y OLDHAM, C.M. (1984).** Frequency of luteinizing hormone release in merino ewes with one and two ovulations. En: *Reproduction in sheep. Ed: Lindsay d.r. & Pearce, D.T. Aust. Acad. Sci., Canberra. 102-104.*
- THOMSON N.A. y JAGUSCH, K.T. (1976).** Effect of lambing date on the utilization of grass/clover y lucerne pastures during mating. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, 36: 184-189.
- THORBURN, G.D., BASSETT, J.M. y SMITH, I.D. (1969).** Progesterone concentration in the peripheral plasma of sheep during the oestrous cycle. *J. Endocr.*, 45: 459-469.
- TURNBULL, K.E., BRADEN, A.W.H. y GEORGE, J.M. (1966).** Fertilization y early embryonic losses in ewes that had grazed oestrogenic pastures for 6 years. *Aust. J. Agric. Res.*, 17: 907-17.

**UNDERWOOD, E.J. y SHIER, F.L. (1951).** The permanence of the oestrogenic effects of subterranean clover grazing on the ewe. *Aust. Vet. J.*, 27: 63-67.

**UNDERWOOD, E.J., SHIER, F.L., DAVENPORT, N. y BENNETS, H.W. (1959).** Further studies of the effects of prolonged injections of stilboestrol on the ewe. *Aust. Vet. J.*: 84-87.

**VALDERRABANO, J., RAMON, J.P. y BARBERAN, M. (1988).** Morphological alterations in the reproductive organs of ewe lambs reared on lucerne. *Anim. Prod.*, 47: 271-274.

**VALDERRABANO, J. (1992).** Alteraciones reproductivas asociadas al consumo de fitoestrógenos. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.*, 7: 115-124.

**VAZQUEZ, I. (1992).** Comunicación personal.

**VERA Y VEGA, A. (1971).** Fisiología de la reproducción en las razas Manchega, Churra y Rasa. *Zootecnia*, 20: 477-500.

**WOLF, D.P., SOKOLOSKI, J., KHAN, M.A. y LITT, M. (1977).** Human cervical mucus. III. Isolation and characterization of rheologically active mucin. *Fertil. Steril.*, 28: 53-58.

**WONG, E., FLUX, D.S. y LATCH, G.C.M. (1971).** The oestrogenic activity of white clover, (*Trifolium repens L.*). *N.Z.J. Agric. Res.*, 14: 639-645.