

Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfa con grandes cantidades de coumestrol

Carlos M. Romero-R.
Me del Rosario Tarragó Castellanos*
Ramiro Muñoz Mendoza"
Ramón Arista Reyes*
Adolfo Rosado García*

Resumen

Se describe un síndrome que se caracteriza por aumento en el porcentaje de vacas que repiten celo, de abortos, de metrosis y metritis, y de quistes ováricos, así como estros falsos y útero turbante (UT) a la palpación aún con diagnóstico de gestación positivo (40-60 días de preñez) asociado con consumo de alfalfa con grandes cantidades de coumestrol. El estudio se realizó en 608 vacas en riesgo, a las que se les practicaron 1264 inseminaciones en el curso de un año, observándose sólo 376 gestaciones (29.75%), de las cuales 102 cursaron con UT y moco cérvico vaginal (MCV) fluido, 36 terminaron en abortos y 238 fueron normales. La resistencia eléctrica del MCV en las vacas gestantes con Dx de UT fue significativamente menor que el medido en las vacas gestantes normales (68.8 ± 15.17 contra 114.03 ± 17.05 0, n = 30) y semejante al encontrado en las vacas en estro ($63.16 \pm 10.56 \Omega$ n = 30). En 10 vacas gestantes con UT y MCV fluido se determinó la concentración plasmática de estradiol por radioinmunoanálisis; se encontraron valores normales (12.9 ± 10.04 pg/ml) en seis de los diez animales, que no explican la presencia del síndrome estrogénico. De la alfalfa que consumen los animales se extrajo el coumestrol, se purificó por cromatografía de capa fina y se determinó su concentración por espectrofotometría UV a 243 nm. Las grandes cantidades de coumestrol encontradas en la alfalfa consumida por los animales estudiados (66.8 mg/kg alfalfa seca, sin considerar las pérdidas durante el proceso de extracción y purificación) pueden ser las responsables del síndrome estrogénico descrito y su importancia económica justifica la valoración de los resultados de este estudio y la búsqueda de soluciones apropiadas al problema.

Recibido para su publicación el 22 de febrero de 1996.

* Departamento de Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. Av. Purísima y Michoacán, Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340, México, D. F.

** Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960, Mexico, D. F.

Introducción

La zona de Chalco, Estado de México, se ha caracterizado por tener una gran actividad pecuaria principalmente en la producción de leche y sus derivados. En esta zona se encuentran varias explotaciones de bovinos de leche, que por el número de cabezas que suman, representan una cantidad importante de producción de leche para el consumo local y de la ciudad de México.

Desde hace varios años se han realizado observaciones en hatos de las zonas lecheras del altiplano, las cuales dan cuenta de un problema importante que redonda en la disminución de la fertilidad, manifestada por el aumento en los porcentajes de vacas repetidoras, de abortos, de metrosis, metritis y quistes ováricos. Estas observaciones además del diagnóstico de útero turbante (DxUT) a la palpación, aún con diagnóstico de gestación positivo entre los 40 y 60 días de preñez, estros falsos y disminución de la viscosidad del moco cérvico-vaginal (MCV) en un elevado porcentaje de las vacas gestantes, hacen pensar en la presencia de un factor estrogénico anómalo que afecta estas explotaciones pecuarias. La importancia del estudio se refleja en el hecho de que el síndrome estrogénico ha llegado a alterar la fisiología de los machos. En el hato en estudio, dos de los semientales debieron ser sustituidos por presentar baja fertilidad, hipospermia, ginecomastia e incluso, en uno de ellos, verdadera galactorrea.

La base de la alimentación de los bovinos lecheras en esta región es la alfalfa; estas plantas, así como los tréboles, contienen fitoestrógenos tales como las coumarinas e isoflavonas, sustancias que tienen la capacidad de unirse a los receptores de estrógenos, provocando en los animales que los ingieren en grandes cantidades, alteraciones reproductivas por hiperestrogenización.²¹ El fitoestrógeno que se encuentra presente en mayor cantidad en la alfalfa es el coumestrol, el cual es de 30 a 100 veces más potente que otros fitoestrógenos presentes como las isoflavonas.² Todas estas sustancias estrogénicas de origen vegetal se encuentran en pequeñas cantidades de manera natural en el forraje y tienen efectos antimicrobianos⁷ y fungicidas.²² Sin embargo, la síntesis de ellas se incrementa notablemente bajo condiciones adversas para el crecimiento de las plantas, tales como temperatura y luminosidad inadecuadas,²⁰ invasiones por hongos, particularmente *Pseudoplesia medicaginis*, o coleópteros¹²

En términos generales se ha visto que la ingesta de forrajes con cantidades elevadas de fitoestrógenos provoca irregularidad del ciclo estral y baja tasa de concepción en vacas,¹⁴ además de ninfomanía, hiperemia vulvar, quistes ováricos, hiperplasia de mama y útero, prolapsos vaginal, relajación de ligamentos pelvianos y esterilidad.¹⁰ En los toros provocan metaplasia glandular y epitelial, tanto prostática como bulbo uretral, y dificultad en la maduración y movilidad de los espermatozoides.¹⁰ En ovejas se ha descrito fracaso parcial en la primera fecundación,⁵ disminución del número de corderos,³ reducción de la tasa de ovulación,¹⁶ crecimiento uterino y disminución del desarrollo folicular en ovejas impúberes.¹⁷ En este trabajo se describe un síndrome de estrogenización en vacas lecheras por consumo de alfalfa en las que se aislaron grandes cantidades de coumestrol.

Material y métodos

Determinación del síndrome estrogénico

Se estudiaron las vacas en producción ($n = 608$), pertenecientes a un hato de 1040 bovinos Holstein Frisian, localizado en la zona de Chalco en el altiplano de México, la base de la alimentación del hato es la alfalfa. El análisis se realizó entre agosto de 1993 y julio de 1994, e incluyó los parámetros reproductivos más afectados en la explotación, como el índice anual de gestación (IAG) y el porcentaje de abortos, incluyendo, como un signo adicional para la caracterización del síndrome, el porcentaje de vacas que cursan con diagnóstico de gestación positivo por palpación rectal con Dx UT y fluidez anormal del MCV. Se determinó la resistencia eléctrica del MCV en 30 vacas gestantes con Dx UT, 30 vacas en estro y 30 vacas gestantes normales como testigo. La determinación se realizó utilizando un Ohmómetro* y los resultados se compararon mediante un análisis de varianza y prueba de Tukey.⁶

Identificación de 17 β -estradiol en suero de vacas con síndrome estrogénico

A diez vacas con diagnóstico de gestación positivo entre los 40 y 60 días de preñez y en las que se encontró el útero turgente a la palpación, se les tomó una muestra sanguínea para la determinación de 17 β -estradiol en suero. La determinación de

estradiol se realizó por radioinmunoanálisis con anticuerpos de alta especificidad, que permiten cuantificar de 10 a 640 pg/ml de suero.⁸ Se utilizaron 0.5 ml de suero, la extracción se realizó con éter etílico en una proporción 1:10, el éter se evaporó y el extracto se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0, las pérdidas durante el procedimiento seguido se calcularon de sueros agregados de 3H-17 β -estradiol, el promedio de recuperación fue de 94.6%. La curva estándar se construyó con ocho concentraciones (0.5 a 64 pg/tubo), los estándares se prepararon mediante diluciones apropiadas de una solución de 17 β -estradiol recristalizado de 100 mg/ml y verificada por absorción ultravioleta a 280 nm, la variación intraensayo fue de 2.62 %.

Extracción y purificación del coumestrol

Se colectaron durante el invierno varias muestras de la alfalfa utilizada como fuente de forraje para el hato en estudio en diferentes parcelas. Todas las muestras se encontraron infestadas por *Pseudopesis medicaginis*. Las muestras de alfalfa se mezclaron, y una porción representativa se secó y molió finamente para su extracción. Todos los solventes utilizados se obtuvieron grado analítico** y fueron bidestilados en el laboratorio antes de su uso. La extracción del coumestrol se realizó por el método de Le Bars *et al*,¹² con algunas modificaciones. Un kilo de alfalfa seca y molida fue sometido a extracción Sohxlet con 2600 ml de metanol. A este extracto se le agregaron 8.0 litros de una solución de carbonato de sodio 0.5 M pH 12.0.

Esta mezcla se lavó seis veces en forma sucesiva en embudos de separación con diclorometano (2 con 2.6 litros, 2 con 1.5 litros y 2 con 1.0 litros). Posteriormente, la fase acuosa se acidificó con ácido sulfúrico al 50% hasta un pH de 4.5 y el coumestrol fue extraído con éter etílico anhidro en tres lavados sucesivos de 2.61 cada uno; esta última fase se concentró por evaporación para obtener una masa final de 4.8 g de extracto que se resuspendió en 96 ml de metanol.

Para la purificación e identificación del coumestrol, se tomó una fracción de la solución metanólica, se le agregó una parte igual de una solución saturada de EDTA, se agitó y posteriormente se extrajo nuevamente con éter etílico. La fase orgánica se evaporó a sequedad y se resuspendió en 2 ml de metanol; de esta se tomaron fracciones de 2.5 ml, que se aplicaron en placas cromatográficas*** de gel de sílica en capa fina de 5 x 20 cm. Todas las muestras se corrieron por duplicado y se comparó la relación de migración de la banda (R_F) contra un patrón incluido de coumestrol.¹³ En el sistema de corrimiento se utilizó como fase móvil una mezcla de cloroformo: metanol (4: 1 v/v).^{4,13,15}

Los compuestos fueron observados como bandas que fluorescen al ser estimulados con la luz ultravioleta de onda corta.

Para comprobar la identificación del coumestrol se determinaron los espectros de absorción de cada banda, de la siguiente manera: la placa cromatográfica fue revelada en luz ultravioleta, se raspó cada banda y el gel de sílica obtenido se lavó

* Estrogenix modelo Estron

** Beacker Allen de Mexico.

*** Merck-Mexico, S.A.
Eastman Kodak.



Figura 1. Distribución del índice de gestación anual. De 1264 inseminaciones, sólo el 30% de las vacas quedaron gestantes de las cuales 10% abortaron, 63% fueron gestantes normales y 27% gestantes con Dx UT.

con éter etílico que se evaporó, posteriormente la muestra fue diluida nuevamente en 2 ml de metanol. En esta solución se determinó el espectro de absorción en un espectrómetro UV visible.*

Resultados

De 1264 inseminaciones a lo largo del año de estudio en un hato de 608 vacas, sólo se lograron 376 gestaciones (IAG = 29.75%), de las cuales 36 (9.57%) resultaron en abortos, en 102 (27.13%) se encontró el útero turgente a la palpación al momento del diagnóstico de gestación (50 ± 10 días) y 238 (63.3%) fueron gestaciones normales.

Este resultado representa un índice de 3.36 servicios por concepción y sólo el 27% de éxito sobre el total de inseminaciones (Figura 1).

La resistencia eléctrica del moco cérvico vaginal en las vacas gestantes con Dx UT ($68.6 \pm 15.17 \Omega$) fue semejante a la que presentan las vacas en celo ($63.16 \pm 10.00 \Omega$) y diferente ($P < 0.01$) de la que

presentan las vacas gestantes normales ($114.03 \pm 17.05 \Omega$) (Figura 2).

Las 10 vacas gestantes con DxUT a las que se les determine el estradiol, mostraron dos intervalos de concentraciones; un grupo de seis presentó valores normales de estradiol de $12.9 \pm 10.04 \text{ pg/ml}$, y un segundo grupo de cuatro, manifestó valores altos de $106.0 \pm 27.68 \text{ pg/ml}$ (Figura 3).

La cromatografía del extracto de alfalfa mostró un patrón de corrimiento con cuatro manchas, de las cuales la principal mostró el mismo R_F , que el patrón de coumestrol (Figura 4). El espectro de absorción en luz ultravioleta de una solución en metanol de este compuesto fue semejante al del patrón purificado de coumestrol (Figura 5). El cálculo espectrométrico de la concentración de coumestrol obtenido del extracto de alfalfa por su absorbancia a 243 nm, reveló que se obtuvieron 66.8 mg de coumestrol por kg de alfalfa seca, sin considerar las pérdidas durante el proceso de extracción y purificación.

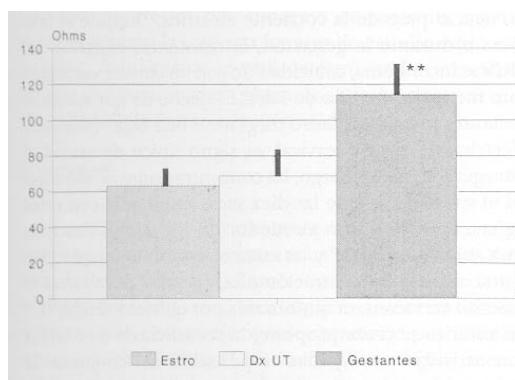


Figura 2. Resistencia eléctrica del moco cérvico vaginal. Se compara la resistencia eléctrica del moco cérvico vaginal entre vacas en estro, gestantes con Dx UT y gestantes normales. En todos los casos la $n = 30$, y ** indican diferencia a $P < 0.01$. El moco cérvico uterino de las vacas gestantes con Dx UT presenta las características del moco de vacas en estro.

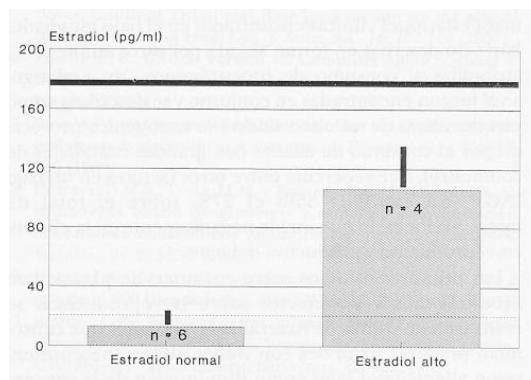


Figura 3. Valores de estradiol en vacas gestantes con Dx UT. La distribución de los valores de estradiol sanguíneo en las vacas estudiadas, se dió en dos grupos, uno con niveles normales ($n = 6$) y otro con niveles altos ($n = 4$). Estos valores se comparan con las concentraciones normales durante la gestación (----), y de vacas con ninfomanía por quistes foliculares (—). La cantidad de estradiol encontrado en las primeras, no es suficiente para producir los signos de estrogenización descritos en estos animales.

* Spectronic 3000 Array de Milton Roy.

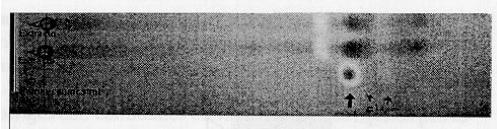


Figura 4. Cromatografía de puncación del extracto de alfalfa. En los carriles externos se muestra el patrón de coumestrol y en los carriles centrales el extracto de alfalfa. Nótese un compuesto que corre paralelo al patrón. Gel de sílica; clorofórmico: metanol, 4: 1 v/v.

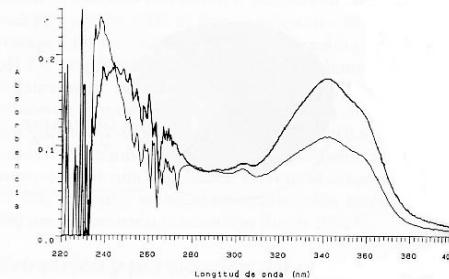


Figura 5. Espectro de absorción en luz ultravioleta de coumestrol. Se presentan los espectros de absorción con metanol en luz ultravioleta del patrón de coumestrol (línea delgada). Los picos De absorbancia máxima característicos del coumestrol disuelto en metanol son a 243 y 343 nm. La sustancia aislada muestra el mismo
Espectro que el patrón de coumestrol.

Discusión

Se describe un síndrome estrogénico en vacas lecheras, que se asocia con la ingestión de alfalfa en la que se aisló coumestrol. En los animales se manifiesta como estros falsos, quistes ováricos y Dx UT y moco cérvico vaginal fluido durante la gestación; mientras que en el hato, se aprecia un aumento en el porcentaje de abortos, un incremento de los días abiertos, de los servicios por concepción y disminución del IAG. La media ponderada de servicios por concepción de las 47 ganaderías en el país de vacas Holstein con una producción mayor de 7500 kg de leche y que incluye a 18,471 animales, es de 2.53 con un intervalo de 1.69 a 3.17, mientras que el índice obtenido en este estudio es de 3.36 servicios por concepción. Esta disminución en la eficiencia de los servicios por concepción en el ambiente de este estudio, zona de Chalco, en donde se encuentran aproximadamente 20,000 vacas, implica una cuantiosa perdida económica y requiere de una atención inmediata para la solución del problema. Las manifestaciones clínicas encontradas en el hato estudiado, han sido descritas en forma aislada por otros autores^{10,14} y atribuidas al consumo de fitoestrógenos. Sin embargo, aquí fueron encontradas en conjunto y se describen como características de un claro síndrome estrogénico provocado por el consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol, que repercute entre otros factores en un bajo IAG y un éxito de sólo el 27% sobre el total de inseminaciones, lo que incide negativamente en la eficiencia reproductiva y productiva del hato. Los primeros estudios sobre consumo de plantas con fitoestrógenos y sus efectos sobre la reproducción se realizaron en ovinos de Australia. Los rebaños que consumían praderas naturales con trébol subterráneo presentaron alteraciones tales como disminución de la

concepción e hiperplasia glandular cística del tracto reproductor, desarrollo de mama en ovejas no preñadas y de pezones en machos, a este tipo de síndrome de esterilidad se le ha denominado enfermedad del trébol.¹

Puesto que se han descrito en las vacas varias de las alteraciones reproductivas mencionadas anteriormente,^{10,14} que son indistintamente inducidas por estradiol o fitoestrógenos y clínicamente indistinguibles, para caracterizar el síndrome propuesto, se decidió obtener parámetros cuantitativos de la estrogenización y descartar la presencia de estradiol endógeno como inductor de los efectos observados.

La resistencia eléctrica del MCV es inversamente proporcional a su contenido de sales, particularmente de NaCl. La secreción de NaCl en el moco cervical es inducida por los estrógenos, de modo que una característica del estro en las vacas es la presencia de altas concentraciones de NaCl, poca viscosidad y baja resistencia del moco cervical al paso de la corriente eléctrica. Durante la fase lútea o durante la gestación, la resistencia eléctrica del MCV se incrementa, coincidiendo con una mayor viscosidad y un menor contenido de sales. El hecho de que las vacas gestantes presenten útero turbante y una baja resistencia eléctrica del moco cervical, es signo típico de actividad estrogénica. Sin embargo, las concentraciones de estradiol en el suero de seis de las diez vacas estudiadas con estos signos, se encuentran alrededor de los valores descritos para vacas gestantes,⁸ y las cuatro restantes, aunque presentaron una concentración alta, su valor no alcanza el descrito en vacas con ninfomanía por quistes foliculares.¹⁹ Lo anterior permite proponer la presencia de otro factor con actividad estrogénica responsable del conjunto de signos observados, que puede ser el coumestrol aislado de la alfalfa que consumen estos animales.

Se ha señalado que la actividad biológica del coumestrol, valorada por su capacidad para aumentar el peso uterino, es 160 veces menor que la del 17(3)-estradiol¹ e su afinidad de unión relativa al receptor uterino de estrógenos es alrededor de 70 veces menor que la del estradiol;¹⁵ por lo tanto, la concentración plasmática que debe alcanzar el compuesto para tener efectos estrogénicos importantes debe ser notablemente alta. La cantidad de coumestrol aislado en este estudio a partir de muestras de alfalfa seleccionada fue de 66.8 mg/kg de alfalfa seca. Este valor se encuentra dentro del intervalo señalado por Le Bars *et al.*¹² para alfalfas con infestación por hongos (50 a 200 mg/kg) y contrasta notablemente con los valores de 1.5 a 2.5 mg/kg encontrados en alfalfas sanas por los mismos autores.

Tanto Le Bars *et al.*¹² como Valderrabano²³ han indicado que concentraciones de 20 a 50 mg de coumestrol por kg de alfalfa son suficientes para inducir la presencia de manifestaciones estrogénicas en los animales; la concentración encontrada en el presente estudio, podría ser entonces considerada suficiente para justificar el síndrome descrito. Según los cálculos realizados, el consumo de esta alfalfa contaminada equivale a la ingestión de aproximadamente 500 mg diarios de coumestrol por vaca; por estudios realizados en cabras² es posible calcular que la ingestión de esta cantidad de coumestrol puede producir concentraciones plasmáticas de 13 ng/ml de este compuesto, que resulta ser 1000 veces mayor a la concentración de 17 β -estradiol encontrada durante el estro. Aún considerando una actividad biológica 160 veces menor en el coumestrol que en el 17 β -estradiol, la cantidad equivale a seis veces la concentración de estrógenos que ocurre durante el estro, y por lo tanto, suficiente para inducir cambios estrogénicos semejantes a los encontrados en la vaca normal durante esta fase del ciclo estral.

De esta forma, son explicables los efectos estrogénicos que manifiestan las vacas aún gestantes, cuando consumen diariamente coumestrol de alfalfas contaminadas en cantidades biológicamente equivalentes a las del 17 β -estradiol endógeno durante el estro. Una situación adicional que no ha sido considerada, es el probable paso del coumestrol a la leche y su consumo por esta vía en el humano; los efectos por consumo de vegetales que lo contienen como la soya son fuentes de estudio y preocupación.¹¹ Actualmente se está determinando la concentración de coumestrol en plasma y en leche de vacas que presentan el síndrome estrogénico descrito.

Abstract

An oestrogenic syndrome caused in dairy cows after ingesting important concentrations of coumestrol is described. The syndrome is characterized by increased levels of repeat-breeding cows, abortions, metritis and ovarian cysts, as well as other estrogenic manifestations like: Increased cervical mucus (CM) fluidity and turgent uterus (TU) at the palpation with positive diagnosis of gestation between 40 and 60 days of pregnancy. This study was performed for one year in 608 cows in risk, in which 1264 inseminations achieved only 376 gestations. Of this, 102 ended with TU and CM fluid; 36 ended in abortion and only 238 had normal pregnancies. Electrical resistance measurements in CM of pregnant cows (68.8 ± 15.17 vs. $114.03 \pm 17.05 \Omega$, n = 30) and are similar to those observed in non-pregnant estrous animals ($63.16 \pm 10.56 \Omega$, n = 30). Radioimmunoanalysis determination of estradiol in 10 pregnant cows with TU and fluid CM proportioned normal

values of plasma estradiol (12.9 ± 10.04 pg/ml) in 6/10 animals, levels which did not explain the presence of the estrogenic syndrome. Measurement of coumestrol concentration in the alfalfa ingested by the animals demonstrated the presence of important quantities of this compound (66.8 mg/kg dry alfalfa, without considering the losses during the extraction and purification procedures), which will undoubtedly explain the occurrence of the described syndrome. Economic and biological importance of the presence of this estrogenic pathology in Mexico is discussed.

Agradecimientos

Los autores agradecen las facilidades y sugerencias otorgadas por el M. en C. Jorge Haro C. para la extracción y purificación del coumestrol, así como la espontánea y valiosa colaboración durante la extracción del coumestrol del técnico laboratorista Miguel Herrera Campos.

Literatura citada

1. Adams, N. R.: Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens. *Aust. vet. J.*, 67: 197-201 (1990).
2. Bickoff, E.M., Livingston, A.L., Hendrickson, A.P. and Booth, A.M.: Relative potencies of several estrogen like compounds found in forages. *Agric. Food Chem.*, 10: 410-412 (1962).
3. Coop, I.E. and Clark, V.R.: The reproductive performance of ewes mated on lucerne. *N. Z. J. Agric. Res.*, 3: 922-933 (1960).
4. Dewick, P.M. and Martin, M.: Biosynthesis of pterocarpan, isoflavan and cooumestan metabolites of *Medicago sativa*: Chalcone, isoflavone and isoflavanone precursors. *Phytochemistry*, 18: 597-602 (1979).
5. Engle, P.H., Bell, D.J. and Davis, P.R.: The effect of ladino clover, Bridsfoot Trifol and Blue-grass pasture on the rate of conception among ewes. *Can. J. Anim. Sci.*, 16: 703-710 (1957).
6. Friedman, P.: GB-Stat Version 3.0 Computer Aided Statistics & Graphics Tutorial/Manual. *Howard University*, Silver Spring, Maryland, 1991.
7. Feet, W.F. and Osman, S.F.: Inhibition of bacteria by the soybean isoflavonoids glyceollin and coumestrol. *Phytopathology*, 72: 755760 (1982).
8. Herrera, D.M.R., Luna, M.M. y Romero, R.C.M.: Obtención de anticuerpos contra progesterona y estradiol, estandarización del radioinmunoanálisis y validación en suero de rumiantes. *Vet. Méx.*, 24:223-230 (1993).
9. Holstein de México: Ganaderías con producciones de 7,500 a más de 11,000 kilos de leche. *México-Holstein*, 26(12):32 (1995).
10. Jurado, C.R.: Fitoestrógenos, plantas estrogénicas, hongos estrogénicos. En: Toxicología Veterinaria. Editado por: Jurado, C.R., 367-497. *Salvat Editores*, Barcelona, España, 1989.
11. Kelly, G.E., Joannou G.E., Reeder, A.Y., Nelson, C. and Waring, M.A.: The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 208:40-43 (1995).
12. Le Bars, J., Le Bars, P. et Brice, G.: Présence accumulation et devenir du coumestrol dans la lucerne et ses dérivés. *Rec. Med. Vét.*, 166: 463-469 (1990).
13. Lookhart, G.L. and Finney, K.F.: Determination of coumestrol in soybeans by high-performance liquid and

- thin-layer chromatography. *Cereal Chem.*, 55: 967-972 (1978).
14. Lotane, E. and Adler, J.K.: Early effects of excessive alfalfa feeding on bovine fertility. *Refuah. Vet.*, 23:102-110 (1966).
 15. Neill, O.M.J., Adesanya, S.A., Roberts, M.F. and Pantry, I.R.: Inducible isoflavonoids from the lima bean, *Phaseolus lunatus*. *Phytochemistry*, 25:1315-1322 (1986).
 16. Newsome, F.E. and Kitts, W.D.: Effects of alfalfa consumption on estrogen levels in ewes. *Can J Anim. Sci.*, 57:531-534 (1977).
 17. Newsome, F.E. and Kitts, W.D.: The effects of feeding coumestrol on the reproductive organs of prepuberal lamb. *Can J. Anim. Sci.*, 60: 53-58 (1980).
 18. Perel, E. and Under, H.R.: **Dissociation of uterotrophic action from implantation-inducing activity in two non-steroidal oestrogens** (coumestrol and genistein). *J. Reprod. Fert.*, 21:171-175 (1970).
 19. Romero-Ramírez, C.M., Landeta, M.L.A., Tarragó, C.M.R, Sánchez-Aldana, P.A., Casas, C.A. y Valencia, M.I.: Respuesta endocrina asociada a la eficiencia de tres tratamientos hormonales en vacas con quistes foliculares. *Vet. Méx.*, 26:195-202 (1995).
 20. Rossiter, R. and Beck, A.D.: Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover. I. Effects of temperature. *Austr. J. agric. Res.*, 17: 29-37 (1966).
 21. Shemesh, M., Lindner, H.R. and Ayalon, N.: Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phytooestrogens and its use in a competitive protein-binding radioassay for plasma coumestrol. *J. Reprod. Fert.*, 29: 1-9 (1972).
 22. Sukumaran, K. and Gnanamanickam, S.S.: Isolation of antifungal compounds form Indian fodder legume plants. *Indian J. Microbial*, 20: 204-207 (1980).
 23. Valderrabano J.: Alteraciones reproductivas asociadas al consumo de fitoestrógenos. *Invest. Agric. Prod. Sanid. Anim.*, 7: 115-124(1992).