

# CONSUMO DE MIMOSINA EN EL DESARROLLO DE GLÁNDULAS ENDOMETRIALES DE VACAS EN POSTPARTO TEMPRANO

## MIMOSINE INTAKE ON DEVELOPMENT OF THE ENDOMETRIAL GLANDS IN EARLY POSTPARTUM COWS

María Bottini-Luzardo<sup>1\*</sup>, Carlos Aguilar-Pérez<sup>2</sup>, Fernando Centurión-Castro<sup>2</sup>, Francisco Solorio-Sánchez<sup>2</sup>, Leonardo Guillermo<sup>2</sup>, David Muñoz-Rodríguez<sup>3</sup>, Yaritza Salas-Araujo<sup>4</sup>, Juan Ku-Vera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia N° 2. 41940. Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional km 197. Cuajinicuilapa, Guerrero, México. (mariabluzardo@yahoo.es). <sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. 97100. Carretera Mérida- Xmatkuil km 15.5. Mérida, Yucatán, México. <sup>3</sup>Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. 97203. Periférico Norte km. 33.5. Chuburná de Hidalgo Inn, Mérida, Yucatán, México. <sup>4</sup>Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado. Final Avenida Ribereña, Cabudare, Venezuela.

### RESUMEN

*Leucaena leucocephala* es un arbusto rico en proteína y mimosina que se cultiva en altas densidades para incrementar la ingesta de proteína en sistemas de producción bovina. La mimosina es un antimitótico cuyo efecto sobre el endometrio no es bien conocido. Se presume que podría acumularse en el tejido endometrial, inhibiendo el desarrollo de las glándulas endometriales responsables de nutrir al embrión. El objetivo de este estudio fue determinar la acumulación de mimosina en el tejido endometrial, por consumo de *L. leucocephala*, y observar su efecto en el desarrollo de las glándulas endometriales de vacas en postparto temprano en un sistema silvopastoril. Veinticuatro vacas *Bos indicus* × *Bos taurus* se dividieron en dos tratamientos: pastoreo en sistema silvopastoril (SSP, n=12), conformado por asociación de *Cynodon nlemfuensis* y *L. leucocephala* var. Cunningham; y pastoreo en sistema de monocultivo (SM, n=12), de *C. nlemfuensis*. El consumo de mimosina por kilogramo de peso vivo se estimó a partir del consumo diario de mimosina por vaca. La concentración de mimosina en tejido uterino se determinó con HPLC. La prueba de t de Student ( $p \leq 0.05$ ) se utilizó para contrastar diferencias entre la concentración de mimosina en el tejido endometrial con glándulas funcionales y no funcionales. La mimosina se acumuló en el tejido endometrial de vacas en el SSP y su concentración varió de 51.02 a 63.45  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tejido endometrial (TE). El desarrollo de las glándulas endometriales fue normal con concentraciones de mimosina iguales o menores a

### ABSTRACT

*Leucaena leucocephala* is a shrub rich in proteins and mimosine. This high-density crop is cultivated to increase protein intake in cattle production systems. Mimosine is an antimitotic and its effect on the endometrium is still unknown. It is presumed that it could accumulate in the endometrial tissue, inhibiting the development of the endometrial glands, which are in charge of nurturing the embryo. The objective of this study was to determine mimosine accumulation in the endometrial tissue as a result of the consumption of *L. leucocephala* and to observe its effect in the development of the endometrial glands of early postpartum cows in a silvopastoral system. Twenty-four *Bos indicus* × *Bos taurus* cows were divided in two treatments: grazing in a silvopastoral system (SSP, n=12), formed by the association of *Cynodon nlemfuensis* and *L. leucocephala*, var. Cunningham; and grazing in a monoculture system (SM, n=12) of *C. nlemfuensis*. Mimosine consumption per kilogram of live weight was estimated based on the daily consumption of mimosine per cow. Mimosine concentration in the uterine tissue was determined using HPLC. A Student's t test ( $p \leq 0.05$ ) was applied to contrast the differences between the mimosine concentration in the endometrial tissue of functional and non-functional glands. Mimosine accumulated in the endometrial tissue of SSP cows. Its concentration ranged from 51.02 to 63.45  $\mu\text{g g}^{-1}$  of endometrial tissue (TE). The endometrial glands had a normal development, with  $\leq 53.73 \mu\text{g g}^{-1}$  mimosine concentration in TE. By contrast, with 60.81  $\mu\text{g g}^{-1}$ , or higher, TE concentrations, endometrial glands showed signs of atrophy. Daily mimosine consumption in the SSP was 0.019  $\text{g kg}^{-1}$  live weight. Mimosine from *L. leucocephala*

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2017. Aprobado: noviembre, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 52: 817-826. 2018.

53.73  $\mu\text{g g}^{-1}$  de TE. Por el contrario, con concentraciones de 60.81  $\mu\text{g g}^{-1}$  de TE o más se observó atrofia de las glándulas endometriales. El consumo diario de mimosina en el SSP fue 0.019 g  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo. La mimosina proveniente del consumo de *L. leucocephala* se acumula en el tejido endometrial y puede causar atrofia de las glándulas endometriales en vacas en postparto temprano.

**Palabras clave:** *Bos indicus*, *Bos taurus*, postparto, *Leucaena leucocephala*, *Cynodon nlemfuensis*, reproducción.

## INTRODUCCIÓN

Una de las causas principales que evitan el establecimiento de una preñez nueva en la vaca, durante el postparto temprano, es un ambiente uterino inadecuado (Walsh *et al.*, 2011). Para que la gestación inicie, es necesario que el endometrio pueda nutrir al embrión en la etapa pre y post implantación (Donofrio *et al.*, 2008); esto es posible por las secreciones nutritivas de las glándulas endometriales (Gunin *et al.*, 2001). Esas glándulas están sujetas a los cambios en el endometrio, que se remodela en cada ciclo estral, al ocurrir proliferación celular (mitosis) y el subsecuente desarrollo glandular.

Factores antinutricionales en la dieta del animal como fitohormonas, alcaloides y taninos, pueden actuar indirectamente sobre el endometrio, interrumpiendo la síntesis y secreción de estradiol y progesterona, que son las principales responsables de estimular el crecimiento de glándulas endometriales (Gonella *et al.*, 2010; Benbia *et al.*, 2013) o actuar de manera directa disminuyendo o bloqueando la proliferación celular y la secreción de las glándulas endometriales (Oluyemi *et al.*, 2007; Iranloye y Bolarinwa, 2008). La consecuencia de cualquiera de estas acciones es la alteración del desarrollo glandular impidiendo la implantación u ocasionando muerte embrionaria.

El principal origen de los factores antinutricionales y fuente de alimentación de los herbívoros son los forrajes (James *et al.*, 1992). En el trópico, los sistemas de producción de carne y leche están en sistemas silvopastoriles (SSP) asociando gramíneas con árboles o arbustos leguminosos con el objetivo de disminuir la oferta de concentrados (Murgueitio *et al.*, 2011; Naranjo *et al.*, 2014).

Una de las asociaciones más utilizadas en la región tropical de Latinoamérica es la de gramínea con leucaena (*Leucaena leucocephala*), para mejorar

consumption accumulates in the endometrial tissue and can cause endometrial glands atrophy in early postpartum cows.

**Key words:** *Bos indicus*, *Bos taurus*, postpartum, *Leucaena leucocephala*, *Cynodon nlemfuensis*, reproduction.

## INTRODUCTION

One of the main causes that prevents new cow pregnancies during the postpartum is an inadequate uterine environment (Walsh *et al.*, 2011). In order to start a pregnancy, the endometrial glands provide the nutritional secretions (Gunin *et al.*, 2001) that enable the endometrium to nurture the embryo before and after the implantation (Donofrio *et al.*, 2008). These glands are subject to changes in the endometrium, which modifies its structure in each oestrus cycle, as a result of cell proliferation (mitosis) and the subsequent development of the gland.

Antinutritional factors in the animals' diet—such as phytohormones, alkaloids, and tannins—can indirectly act over the endometrium, interrupting the synthesis and secretion of estradiol and progesterone, which are mainly responsible for stimulating the growth of the endometrial glands (Gonella *et al.*, 2010; Benbia *et al.*, 2013). Additionally, estradiol and progesterone directly diminish or block cell proliferation and endometrial gland secretion (Oluyemi *et al.*, 2007; Iranloye and Bolarinwa, 2008). Any of these actions alters gland development, preventing implantation or causing embryo death.

Forage is the main origin of these antinutritional factors and the feeding source of herbivores (James *et al.*, 1992). In the tropics, meat and milk production systems are in silvopastoral systems (SSP) relating grasses with trees or leguminous plants, in order to diminish the concentrate offer (Murgueitio *et al.*, 2011; Naranjo *et al.*, 2014).

One of the most frequently used associations in the tropical region of Latin America is grass with leucaena (*Leucaena leucocephala*). This association helps to improve protein consumption and to keep cattle productivity (Murgueitio *et al.*, 2011; Cuartas *et al.*, 2013). However, leucaena includes mimosine, an alkaloid whose 3,4 and 2,3 dihydropyridine (DHP) metabolites could cause embryo death or early fetal death (Jones *et al.*, 1989; Akande *et al.*, 2010).

el consumo de proteína y mantener la productividad del rebaño (Murgueitio *et al.*, 2011; Cuartas *et al.*, 2013). Sin embargo, la leucaena contiene el alcaloide mimosina, cuyos metabolitos 3,4 y 2,3 dihidroxipiridona (DHP) podrían ocasionar muerte embrionaria o muerte fetal temprana (Jones *et al.*, 1989; Akande *et al.*, 2010).

Estudios *in vitro* demostraron que la mimosina tiene un efecto antimitótico sobre varios tipos de células, incluyendo las del ovario (Feldman y Schönthal, 1994; Hughes y Cook, 1996). Según Sahlu *et al.* (1995) y Reis *et al.* (1999), la mimosina puede acumularse en algunos órganos y el folículo piloso de cabras impidiendo la multiplicación celular. Sin embargo, en la literatura revisada no se encontró información sobre la probable acumulación de mimosina en el tejido uterino, y si esto tiene algún efecto sobre el desarrollo de las glándulas endometriales de vacas durante el posparto temprano. El objetivo de este estudio fue determinar la acumulación de mimosina en el tejido endometrial, por consumo de *L. leucocephala*, y observar su efecto en el desarrollo de las glándulas endometriales de vacas en postparto temprano en un sistema silvopastoril, con altas densidades de esta leguminosa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó de marzo de 2013 a marzo de 2014 en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, localizada al este de la Península de Yucatán, México, entre 16° 06' y 21° 37' N, y 87° 32' y 90° 23' E.

### Animales y tratamiento

El estudio incluyó 24 vacas adultas durante el posparto temprano (45 a 90 d), cruza de *Bos indicus* × *Bos taurus*, de tres a cinco partos, con peso vivo promedio de 509 ± 74 kg y condición corporal de 6 ± 0.3 puntos, de acuerdo con la escala 1-9 establecida por Ayala *et al.* (1995). Inmediatamente después del parto, las vacas se asignaron a uno de los dos tratamientos: pastoreo en sistema silvopastoril (SSP, n=12), asociación de pasto estrella de África (*Cynodon nlemfuensis*) y leucaena var. Cunningham, con densidad de 36 000 plantas de leucaena ha<sup>-1</sup>; y pastoreo en sistema de monocultivo (SM, n=12) de pasto estrella de África. El pastoreo en ambos sistemas fue de 8:00 a 13:00 h y de 17:00 a 5:00 h, el consumo estimado de forraje fue de 50 al 70 % de la dieta. En el ordeño, las vacas recibieron un suplemento para cubrir sus requerimientos energéticos y proteicos según el nivel

*In vitro* studies have shown that mimosine has an antimitotic effect over several types of cells, including ovary cells (Feldman and Schönthal, 1994; Hughes and Cook, 1996). According to Sahl *et al.* (1995) and Reis *et al.* (1999), mimosine can accumulate in several organs and the hair follicle of goats, preventing cell multiplication. However, there was no information in the reviewed literature about mimosine accumulation in the uterine tissue and whether or not it has any effect over the development of the endometrial glands of early postpartum cows. The objective of this study was to determine mimosine accumulation in endometrial tissue, as a result of the consumption of *L. leucocephala*, and to observe its effect in the development of endometrial glands of early postpartum cows in a silvopastoral system, where high amounts of this grass were available.

## MATERIALS AND METHODS

The study was carried out from March 2013 to March 2014, in the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, located in the East of the Yucatan Peninsula, Mexico, between 16° 06' and 21° 37' N, and 87° 32' and 90° 23' E.

### Animals and treatments

The study included 24 adult *Bos indicus* × *Bos taurus* cross-bred cows, during early postpartum (45-90 d), which had given birth three to five times, with a 509 ± 74 kg average live weight, and 6 ± 0.3 points of corporal condition, according to the 1-9 scale established by Ayala *et al.* (1995). Immediately after the parturition, the cows were assigned to one of the two treatments: grazing in silvopastoral system (SSP, n=12), using African Star-grass (*Cynodon nlemfuensis*) and leucaena var. Cunningham, with a 36 000 leucaena plants ha<sup>-1</sup> density; and grazing in a monoculture system (SM, n=12) of African Star-grass. In both systems, the cows grazed from 8:00 am to 01:00 pm and from 05:00 pm to 5:00 am; the estimated consumption of forage accounted for 50-70 % of the diet. At milking, the animals were fed supplements to meet their energy and protein requirements, according to their milk production, without losing or gaining weight (Table 1 and 2), using the AFRC-CAB-INTERNATIONAL (1995) tables. The supplement accounted for 30-50 % of the total consumption.

de producción láctea, sin pérdida o ganancia de peso (Cuadro 1 y 2), empleando las tablas de la AFRC-CAB-INTERNATIONAL (1995). El suplemento constituyó entre el 30 y 50 % del consumo total.

**Consumo de mimosina por peso vivo (CMPV)**

El consumo de mimosina se estimó a partir del consumo de materia seca de leucaena y el contenido de mimosina en hojas y tallos tiernos. El primero se determinó con el método de *n*-alcanos (Dove y Mayes, 1991) y se expresó en kg de MS vaca<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, y el contenido de mimosina en la *L. leucocephala* se determinó mediante cromatografía líquida y se expresó en g kg<sup>-1</sup> de MS leucaena; después, el consumo de mimosina se reportó como g vaca<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Bottini-Luzardo *et al.*, 2015). El CMPV se calculó con la ecuación:

$$CMPV (g \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}) = CM/PV$$

**Mimosine consumption per live weight (CMPV)**

Mimosine consumption was estimated based on the consumption of dry leucaena and the mimosine content in tender leaves and stalks. The former was determined using the *n*-alkane method (Doves and Mayes, 1991) and stated in kg of MS cow<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, while the latter was determined through a liquid chromatography and stated in g kg<sup>-1</sup> of MS leucaena. Subsequently, mimosine consumption was reported as g cow<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Bottini-Luzardo *et al.*, 2015). CMPV was calculated using equation:

$$CMPV (g \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}) = CM/PV$$

where *CMPV* is mimosine consumption, in grams per kilogram of live weight per day (g kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>); *CM* is mimosine consumption, in g cow<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; and *PV* is the live weight of the cow in kg.

**Cuadro 1. Composición nutricional de los forrajes y suplementos consumidos por vacas en un sistema silvopastoril intensivo (SSP) y un sistema de monocultivo de gramínea (SM).**

**Table 1. Nutritional composition of fodder and supplement consumed by cows in an intensive silvopastoral system (SSP) and in a grass monoculture system (SM).**

Variable	SSP			SM	
	Pasto estrella de África	Leucaena	Sorgo	Pasto estrella de África	Concentrado
MS (%MF)	27.4	32.1	95.0	27.4	89.0
PC (%MS)	8.0	15.3	8.6	6.2	12.3
FAD (% MS)	36.1	24.7	-	36.1	-
Ceniza(% MS)	9.9	7.8	1.3	9.9	3.8
EM (%MS)	9.2	9.3	12.4	8.9	11.2

MF: materia fresca, MS: materia seca, PC: proteína cruda, FAD: fibra ácido detergente, EM: energía metabolizable. ❖ MF: fresh matter; MS: dry matter; PC: raw protein; FAD: acid detergent fiber; EM: metabolizable energy.

**Cuadro 2. Consumo de forraje estimado y cantidad de suplemento ofrecido (kg MS vaca<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) según el nivel de producción de leche de vacas en un sistema silvopastoril intensivo (SSP) y un sistema de monocultivo de gramínea (SM).**

**Table 2. Estimated fodder consumption and amount of supplement provided (kg MS cow<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), according to the level of dairy milk production in an intensive silvopastoral system (SSP) and a grass monoculture system (SM).**

kg leche vaca <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	SSP			SM	
	Pasto estrella de África	Leucaena	Sorgo	Pasto estrella de África	Concentrado
10	4.6	3.8	3.5	7.3	3.4
15	6.2	4.2	4.8	6.7	5.4
20	2.7	6.4	7.0	7.5	6.7
25	2.7	6.4	9.5	7.5	10.7

donde *CMPV* es el consumo de mimosina en gramos por kg de peso vivo, por día ( $\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ ); *CM* es el consumo de mimosina en  $\text{g vaca}^{-1} \text{d}^{-1}$ ; y *PV* es el peso vivo de la vaca en kg.

### Biopsias endometriales

Al momento de realizar las biopsias todas las vacas tenían al menos 45 d pastando en el tratamiento asignado y presentaban completa involución uterina.

Desde el día 45 postparto se observaron los ovarios, usando un ecógrafo (MINDRAY-50) transductor lineal de 7.5 MHz (Shenzhen, Mindray Bio-Medical Electronics, Co. Ltd. Nanshan, Shenzhen, China). Las biopsias se tomaron de la capa funcional del endometrio el día cinco después de la observación ecográfica del cuerpo lúteo (CL), cuando se esperaba hubiese ocurrido el total desarrollo de las glándulas endometriales por presencia de la progesterona secretada por el CL (Kojima y Selander, 1970), y se realizaron biopsias sólo de la capa funcional del endometrio.

Dos muestras de tejido endometrial se tomaron con una pinza para biopsias, la cual se introdujo en la vagina y guiada transrectalmente hasta la parte craneal de uno de los cuernos uterinos. La primera muestra se colocó en un contenedor plástico estéril y congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento para la determinación de mimosina. La segunda se colocó en un contenedor plástico estéril con una solución de formalina al 10 % para su estudio histológico.

Después de cada biopsia, la pinza se lavó 5 min con solución de yodo al 10 % y se enjuagó con agua estéril antes de su uso en la siguiente vaca.

### Concentración de mimosina en tejido endometrial

Las muestras de endometrio se descongelaron en el laboratorio a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después se cortaron finamente y se colocaron en un tubo de ensayo, donde se adicionaron 2 mL de acetonitrilo (Sigma-Aldrich®) y se centrifugaron 15 min a  $16\ 000\ \text{g min}^{-1}$ . El acetonitrilo se evaporó con una placa de calentamiento a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  bajo una atmósfera de nitrógeno. Una vez realizada la evaporación se añadieron 2 mL de ácido clorhídrico (HCL 0.1 N), el tubo se agitó manualmente durante 30 s para homogeneizar la muestra, que se filtró utilizando una membrana de acetato de celulosa con porosidad de  $0.45\ \mu\text{m}$ . La detección de mimosina se realizó mediante cromatografía líquida (KNAUER Smartline, degasificador Manager smartline 5000, pump smartline 1000, autosampler smartline 3950, Germany), usando una columna LUNA C18 de  $4.6 \times 150\ \text{mm}$  y  $5\ \mu\text{m}$ , y detector UV smartline con temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se inyectaron  $0.5\ \mu\text{L}$  de extracto de mimosina. La fase móvil fue una solución de ácido ortofosfórico (0.02 M) y la longitud de onda fue de 275 nm (Wu *et al.*, 2012).

### Endometrial biopsies

At the time the biopsies were carried out, all the cows had grazed for at least 45 d in the treatment to which they were allocated and they showed a full uterine involution.

Forty-five days after parturition, the ovaries were observed using a 7.5 MHz linear transducer ultrasound scanner (MINDRAY-50) (Shenzhen, Mindray Bio-Medical Electronics, Co. Ltd. Nanshan, Shenzhen, China). Biopsies were carried out in the functional layer of the endometrium, five days after the corpus luteum was subject to an ultrasound scanning. By that time, the endometrial glands were expected to have reached full development, as a result of the presence of the progesterone secreted by the CL (Kojima and Selander, 1970). The biopsies were only carried out in the functional layer of the endometrium.

Biopsy pincers were used to take two endometrial tissue samples. The pincers were introduced in the vagina and they were guided transrectally towards the vault of the uterine horns. The first sample was put in a sterile plastic container and frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until it was processed, in order to determine the existence of mimosine. The second sample was put in a sterile plastic container with a 10 % formalin solution in order to carry out a histological study.

After each biopsy, the pincers were washed for five minutes using a 10 % iodine solution and rinsed with sterile water, before they were used in the next cow.

### Mimosine concentration in endometrial tissue

Endometrium samples were thawed in the laboratory at a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperature. Subsequently, they were cut into thin slices and put in a test tube. Two mL of acetonitrile (Sigma-Aldrich®) were added, and the mix was centrifuged at  $16\ 000\ \text{g min}^{-1}$  for 15 min. The acetonitrile was evaporated using a hot plate at  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a nitrogen atmosphere. After the evaporation, 2 mL of hydrochloric acid (HCL 0.1 N) were added, and the tube was shaken by hand for 30 s in order to homogenize the sample. The sample was filtered using a cellulose acetate membrane with a  $0.45\ \mu\text{m}$  porosity. The mimosine was detected through a liquid chromatography (KNAUER Smartline, Manager Smartline 5000 degasser, smartline 1000 pump, 3950 smartline autosampler, Germany), using a  $4.6 \times 150\text{-mm}$  and  $5\text{-}\mu\text{m}$  LUNA C18 column and a smartline UV detector with a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperature. A  $0.5\ \mu\text{L}$  mimosine extract was injected. The mobile phase included an orthophosphoric acid solution (0.02 M) and a 275-nm wavelength (Wu *et al.*, 2012). A  $1.0\ \text{mL min}^{-1}$  gradient was used. The result was stated as  $\mu\text{g g}^{-1}$  of endometrial tissue (TE).



El gradiente usado fue de  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ . El resultado se expresó como  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tejido endometrial (TE).

### Funcionalidad del tejido endometrial

La funcionalidad del tejido endometrial se evaluó con el método de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina (Tinciones Alvarez<sup>®</sup>, Granada-España). Las muestras se observaron en un microscopio Labomed LX40 (Lab. América Inc-USA) con aumento de 10 y 40X. Las fotografías se tomaron de 10 campos de un mismo corte histológico, utilizando una cámara Lamine 117 Histología de Ross Rowell con resolución de  $1024 \times 768 \text{ pp}$ , 24 bit de color, adaptada al microscopio. Como indicativo de un endometrio funcional (EF) se consideró la presencia de glándulas hipertrofiadas y productivas, caracterizadas por el lumen dilatado y la presencia de material eosinofílico, donde el epitelio glandular presentó grandes vacuolas en la porción apical de su citoplasma, desplazando el núcleo hacia la membrana basal (Kojima y Selander, 1970; Gonella *et al.*, 2010). Se calificó como endometrio no funcional (ENF) si no se observaban esas características.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Proc GENMOD se usó para determinar diferencias entre sistemas con respecto al número de vacas con endometrio funcional y no funcional. La correlación simple se calculó entre el CMPV y la concentración de mimosina en tejido uterino ( $\mu\text{g g}^{-1}$  TE) de vacas en el SSP.

Para determinar la normalidad de la concentración de mimosina en vacas en el SSP, se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos de concentración de mimosina se transformaron a  $\text{Log}_{10}$  para cumplir con el supuesto de normalidad y se realizó una prueba de t de Student para contrastar diferencias entre la concentración de mimosina en el tejido endometrial funcional y no funcional en vacas en el SSP. Los resultados fueron significativos si  $p \leq 0.05$ . El programa SAS (SAS, 2009) se usó para el análisis de datos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mimosina se encontró en el endometrio de vacas en el SSP. Este es el primer reporte de acumulación de mimosina en órganos reproductivos de rumiantes.

Cuatro vacas en el SSP y 10 vacas en el SM (Figura 1) presentaron endometrio funcional, caracterizado por presentar glándulas maduras y funcionales. En el SSP sólo seis vacas desarrollaron CL y en el SM dos vacas fueron retiradas del experimento debido

### Functional nature of the endometrial tissue

The functional nature of the endometrial tissue was evaluated using the paraffin inclusion and the hematoxylin-eosin staining method (Tinciones Alvarez<sup>®</sup>, Granada, Spain). The samples were observed with a Labomed LX40 microscope (Lab. America Inc., USA), with 10 and 40X magnifications. Photographs were taken from 10 fields with the same histological cut, using a Lamine 117 Histology 24-bit color camera, with a  $1024 \times 768 \text{ pp}$  resolution (Ross Rowell) that had been adapted to the microscope. The presence of hypertrophied and productive glands was considered as an indication of a functional endometrium (EF). These glands feature an expanded lumen and the presence of eosinophilic material; their glandular epithelium had big vacuole in the apical section of the cytoplasm, which moved the nucleus towards the basement membrane (Kojima and Selander, 1970; Gonella *et al.*, 2010). If these features were absent, it was classified as a non-functional endometrium (ENF).

### Experimental design and statistical analysis

Proc GENMOD was used to determine the differences between systems with regard to the number of cows with functional and non-functional endometrium. The simple correlation between CMPV and mimosine concentration in the uterine tissue ( $\mu\text{g g}^{-1}$  TE) of SSP cows was calculated.

The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the normality of the mimosine concentration in SSP cows. The mimosine concentration data were transformed to  $\text{Log}_{10}$  to meet the normality assumption. Meanwhile, a Student's t-test was carried out to check the differences in mimosine concentration between the functional and non-functional endometrial tissues of SSP cows. Results were significant if  $p \leq 0.05$ . The SAS software (SAS, 2009) was used to analyze the data.

## RESULTS AND DISCUSSION

Mimosine was found in the endometrium of SSP cows. This is the first report about mimosine accumulation in the reproductive organs of ruminants.

Four SSP cows and 10 SM cows (Figure 1) had a functional endometrium, featuring mature and functional glands. Only six SSP cows developed CL and two SM cows were removed from the experiment, as a consequence of the presence of follicular cysts. The remaining 10 cows developed CL.

Only two SSP cows showed severely atrophied endometrial glands (Figure 2). There were no

a la presencia de quistes foliculares, las restantes 10 desarrollaron CL.

Solo dos vacas en el SSP presentaron atrofia severa de las glándulas endometriales (Figura 2). No hubo diferencias entre sistemas, con respecto al número de hembras con EF ( $p > 0.05$ ), lo que podría ser consecuencia del bajo número de hembras que desarrollaron CL en el SSP.

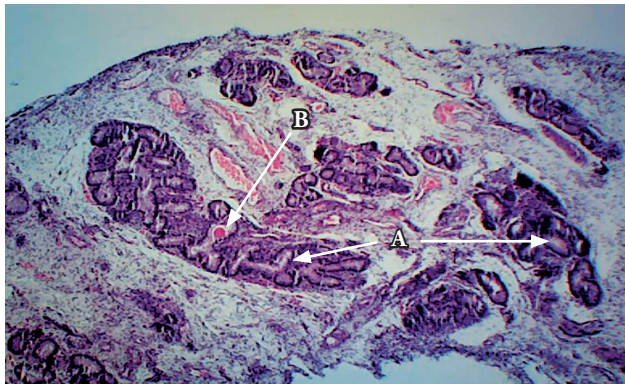
La concentración de mimosina almacenada en el tejido endometrial de las vacas en el SSP con ENF fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) que el de las vacas con EF (Cuadro 3). El coeficiente de correlación entre la cantidad de mimosina ingerida y la almacenada no fue diferente de cero ( $r = -0.019$ ).

El consumo estimado, promedio diario, de mimosina por vaca fue  $10.1 \pm 1$  g, con un mínimo de 7.6 y un máximo de 12.1 g (Bottini-Luzardo *et al.*, 2015), el CMPV promedio fue  $0.019 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$  con mínimo de 0.01 y máximo de  $0.03 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Este consumo es inferior a los valores relacionados con toxicidad clínica ( $\geq 0.18 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) por mimosina en vacas (Sethi y Kulkarni, 1995). Sin embargo, estos autores indican que el consumo de mimosina menor

differences between systems regarding the number of females with EF ( $p > 0.05$ ). This could be a consequence of the low number of SSP females that developed CL.

The concentration of mimosine stored in the endometrial tissue of SSP cows with ENF was higher ( $p \leq 0.05$ ) than of cows with EF (Table 3). The correlation coefficient between the amount of mimosine ingested and the mimosine stored was not different from zero ( $r = -0.019$ ).

The estimated consumption (daily average) of mimosine per cow was  $10.1 \pm 1$  g. The lowest and maximum amounts were 7.6 and 12.1 g, respectively (Bottini-Luzardo *et al.*, 2015). The average CMPV was  $0.019 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , with minimum and maximum amounts of 0.01 and  $0.03 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectively. This consumption is lower than the values reported by Sethi and Kulkarni (1995) about the clinical toxicity ( $\geq 0.18 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) caused by mimosine in cows. However, the same authors point out that mimosine consumption below  $0.18 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$  can cause subclinical toxicity in cows. These results match the findings of Phaikaew *et al.*

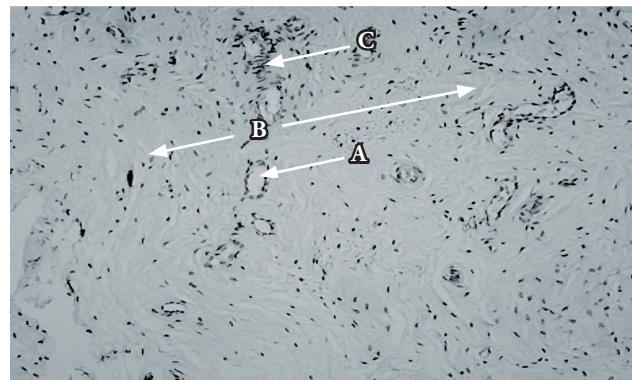


**Figura 1.** Capa glandular endometrial funcional representativa de cuatro vacas en el SSP y 10 vacas en el SM, caracterizada por proliferación de glándulas maduras funcionales. A) Glándulas maduras. B) Lumen glandular dilatado con presencia de material eosinofílico (40 X).

**Figure 1.** Functional endometrial glandular layer representative of four SSP cows and 10 SM cows, based on the proliferation of functional mature glands. A) Mature glands. B) Dilated glandular lumen with presence of eosinophilic material (40X).

**Figura 2.** Capa glandular endometrial representativa de dos vacas en el sistema silvopastoral, caracterizada por atrofia severa de glándulas y estroma formado por fibras de colágeno inmaduras, fibroblastos y fibrocitos. A) Glándulas atrofiadas. B) Fibras de colágeno. C) Proliferación de fibroblastos y fibrocitos (40X).

**Figure 2.** Endometrial glandular layer representative of two cows in the silvopastoral system, featuring severe glandular atrophy and stroma formed by immature collagen fibers, fibroblasts, and fibrocytes. A) Atrophied glands. B) Collagen fibers. C) Proliferation of fibroblasts and fibrocytes (40X).



**Cuadro 3. Concentración de mimosina en el tejido endometrial de vacas en postparto temprano consumiendo *Leucaena leucocephala* en un sistema silvopastoril intensivo.****Table 3. Mimosine concentration in the endometrial tissue of early postpartum cows that were fed *Leucaena leucocephala* in an intensive silvopastoral system.**

Variable	Concentración de mimosina en tejido endometrial $\mu\text{g g}^{-1}$ de TE		
	Media	Mínimo	Máximo
Endometrio funcional (EF)	51.98	51.02	53.73
Endometrio no funcional (ENF)	60.87	60.81	63.45

a  $0.18 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , puede causar toxicidad subclínica en vacas, lo que coincide con Phaikaew *et al.* (2012) y Halliday *et al.* (2013) quienes establecen que el consumo de mimosina puede tener efectos adversos en la salud del animal, aunque no se manifiesten clínicamente, como ocurrió en otros estudios que señalan efectos negativos sobre la eficiencia reproductiva de ratas y toros consumiendo alcaloides, sin manifestación clínica de toxicidad (Yakubu, 2012; Burnett *et al.*, 2017).

Klotz (2015) reporta la acumulación de alcaloides en los tejidos de órganos reproductivos de animales que consumen forrajes con estos factores antinutricionales. Además señala que su consumo constante puede ocasionar trastornos en diversas funciones fisiológicas, incluyendo las reproductivas.

En este sentido es posible entonces que la acumulación de este alcaloide en la capa funcional del tejido endometrial, en concentraciones iguales o superiores a  $60 \mu\text{g g}^{-1}$  TE, pueda ocasionar atrofia glandular (Figura 2). Esto podría atribuirse al efecto antimitótico de la mimosina sobre las células (Hughes y Cook, 1996; Krude, 1999; Bianco *et al.*, 2006; Hallak *et al.*, 2008) o a la acción inhibitoria de los alcaloides sobre los receptores de estradiol y progesterona, hormonas responsables de estimular el desarrollo de las glándulas en el endometrio (Lessey *et al.*, 1996; Lecce *et al.*, 2001). Según investigaciones en África, el consumo de plantas con alcaloides, como la mimosina, altera el desarrollo glandular y la estructura del tejido endometrial en mujeres y animales (Dabhadkar *et al.*, 2012; Udoh, 2012; Elshawarby *et al.*, 2014).

Leucaena es el arbusto forrajero más utilizado en la alimentación de rumiantes en el mundo (Shelton y Dalzell, 2007). El consumo de este arbusto forrajero, puede disminuir los costos de producción y el impacto ambiental (Murgueitio *et al.*, 2011; Yacout, 2016).

(2012) and Halliday *et al.* (2013) who establish that mimosine consumption can have adverse effects in animal health, even if those effects do not show up in clinical tests. Previous studies have pointed out negative effects on the reproductive efficiency of rats and bulls that have consumed alkaloids, although they did not show clinical signs of toxicity (Yakubu, 2012; Burnett *et al.*, 2017).

Klotz (2015) reports alkaloid accumulation in the tissues of the reproductive organs of animals that are fed forage that includes these antinutritional factors. Klotz points that their constant consumption can upset several physiological functions (including reproductive functions).

In that sense, the accumulation of this alkaloid in the functional layer of the endometrial tissue (in  $\geq 60 \mu\text{g g}^{-1}$  TE concentrations) could potentially cause glandular atrophy (Figure 2). This situation could be attributed to the antimitotic effect that mimosine has on cells (Hughes and Cook, 1996; Krude, 1999; Bianco *et al.*, 2006; Hallak *et al.*, 2008). It could also be the result of the inhibitory action that alkaloids have on the estradiol and progesterone receptors—the hormones in charge of stimulating the development of the endometrial glands (Lessey *et al.*, 1996; Lecce *et al.*, 2001). According to researches carried out in Africa, the consumption of plants that contain alkaloids (such as mimosine) alters the development of glands and the structure of the endometrial tissue in women and animals (Dabhadkar *et al.*, 2012; Udoh, 2012; Elshawarby *et al.*, 2014).

Leucaena is the forage shrub most frequently used to feed ruminants around the world (Shelton and Dalzell, 2007). The consumption of this forage shrub can diminish production costs and environmental impact (Murgueitio *et al.*, 2001; Yacout, 2016). However, the effects that the antinutritional



Sin embargo, es necesario comprender los efectos que sobre la salud reproductiva puedan tener los factores antinutricionales contenidos en esta leguminosa, ya que la disminución en los rendimientos reproductivos repercute negativamente los rendimientos económicos del sistema de producción.

## CONCLUSIÓN

La mimosina proveniente del consumo de leucaena se acumula en el tejido endometrial y puede causar atrofia de las glándulas endometriales en vacas en postparto temprano. Este es el primer estudio que muestra la acumulación de mimosina en el tejido endometrial de las vacas y que establece una probable acción de este alcaloide sobre el desarrollo glandular.

## LITERATURA CITADA

- AFRC-CAB-INTERNATIONAL. 1995. Energy and Protein Requirements of Ruminants. An Advisory Manual Prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. (Ed University Press, Cambridge, U.K. 88p) pp. 58.
- Akande, K., E., U. Doma, and H. Adamu. 2010. Major antinutrients found in plant protein sources: Their effect on nutrition. *Pak. J. Nutr.* 9: 827-832.
- Ayala, B., A., R. Honhold R., R. Delgado T., and J. Magaña M. 1995. A visual condition scoring scheme for *Bos indicus* and crossbred cattle. *In: Anderson S., and S. Wadsworth. (eds). Proceeding of an International Workshop. Mérida Marzo 1992, Mérida, México IFS/FMVZ-UADY 1992.* pp: 119-128.
- Benbia, S., Y. Boutelis S., A. Chennaf., and Y. Massinissa. 2013. Evaluation of the cytology and histology of uterus and cervix as predictors of estrous stages in ewes and dairy cows. *In: Schönbach C., S. Bairong, T. Wee, S. Ranganathan. (eds). International Conference on Biology and Biomedicine. Washington, DC, USA, September 2013. Bibliometrics pp: 33-35.*
- Bianco, F., G. Basini, and F. Grasselli. 2006. The plant alkaloid sanguinarine affects swine granulosa cell activity. *Reprod. Toxic.* 21: 335-340.
- Bottini-Luzardo, M., C. Aguilar P., F. Centurión C., F. Solorio S., A. Ayala B., R. Montes P., D. Muñoz R., and J. Ku V. 2015. Ovarian activity and estrus behavior in early postpartum cows grazing *Leucaena leucocephala* in the tropics. *Trop. Anim. Health Prod.* 47: 1481-1486.
- Burnett, C., W. Bridges, and S. Pratt. 2017. Effects of grazing tall fescue containing ergot alkaloids on bull sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 181: 24-29.
- Cuartas, C. C., J. Naranjo R., A. Tarazona M., and R. Barahona R. 2013. Energy use in cattle in intensive silvopastoral systems with *Leucaena leucocephala* and its relationship to animal performance. *Rev. CES Med. Vet. Zoot.* 8: 70-81.
- Dabhadkar, D.K., V. Zade, P. Rohankar, S. Pare, and M. Wikhe. 2012. Estrogenic and anti-estrogenic potentials of ethanolic pod extract of plumeria rubra in female albino rats. *Global J. Pharm.* 6: 142-147.
- Donofrio, G., V. Franceschi, A. Capocefalo, S. Cavirani, and I. Sheldon. 2008. Bovine endometrial stromal cells display osteogenic properties. *Reprod. Biol. Endoc.* 6: 65.
- Dove, H., and R. Mayes. 1991. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: A review. *Aus. J. Agric. Res.* 42: 913.
- Elshawarby, A. M., H. Saleh, A. Attia, and E. Negm. 2014. Arsenic-induced toxicity in the endometrium of adult albino rat and the possible role of human chorionic gonadotropin hormone. *The Egyptian J. Histology* 37: 327-338.
- Feldman, S., T., and A. Schönthal. 1994. Negative regulation of histone H1 kinase expression by mimosine, a plant amino acid. *Cancer Res.* 54: 494-498.
- Gonella, A., L. Grajales, and V. Hernández. 2010. Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. *Rev. MVZ Cordoba.* 15: 1976-1984.
- Gunin, A., I. Mashin, and D. Zakharov. 2001. Proliferation, mitosis orientation and morphogenetic changes in the uterus of mice following chronic treatment with both estrogen and glucocorticoid hormones. *J. Endoc.* 169: 23-31.
- Hallak, M., L. Vazana, O. Shpilberg, I. Levy, J. Mazar, and I. Nathan. 2008. A molecular mechanism for mimosine-induced apoptosis involving oxidative stress and mitochondrial activation. *Apoptosis: An Int. J. Programmed Cell Death* 13: 147-55.
- Halliday, M. J., J. Padmanabha, C. Mcsweeney, G. Kerven, and H. Shelton. 2013. Leucaena toxicity: A new perspective on the most widely used forage tree legume. *Trop. Grassland* 1: 1-11.
- Hughes, T. A., and P. Cook. 1996. Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase. *Exp. Cell Res.* 222: 275-80.
- Iranloye, B. O., and F. Bolarinwa. 2008. Effect of nicotine administration on estrous cycle in female albino rats. *Nigerian J. Health Biomed. Sci.* 6: 7-12.

## CONCLUSION

Mimosine included in the consumption of leucaena accumulates in the endometrial tissue and can cause atrophy in the endometrial glands of early postpartum cows. This is the first study that proves that mimosine accumulates in the cows' endometrial tissue and that establishes a probable activity of this alkaloid on gland development.

—End of the English version—



- James, L., K. Panter, D. Nielsen, and R. Molyneux. 1992. The Effect of natural toxins on reproduction in livestock. *J. Anim. Sci.* 70: 1573-1579.
- Jones, R. M., M. McLennan, and K. Dowsett. 1989. The effect of *Leucaena leucocephala* on the reproduction of beef cattle grazing leucaena/grass Pastures. *Trop. Grassland* 23: 108-114.
- Klotz, J. 2015. Activities and effects of ergot alkaloids on livestock physiology and production. *Toxins* 7: 2801-2821.
- Kojima, Y., and U. Selander. 1970. Cyclical changes in the fine structure of bovine endometrial gland cells. *Z. Zellforsch* 104: 69-86.
- Krude, T. 1999. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp. Cell Res.* 247: 148-59.
- Lecce, G., G. Meduri, M. Ancelin, C. Bergeron, and M. Perrot-Applanat. 2001. Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: Expression in glandular, stromal, and vascular cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism.* 86: 1379-86.
- Lessey, B. A., I. Yeh, A. Castelbaum, M. Fritz, A. Ilesanmi, P. Korzeniowski, and K. Chwalisz. 1996. Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil. Steril.* 65: 477-83.
- Murgueitio, E., Z. Calle, F. Uribe, A. Calle, and B. Solorio. 2011. Native trees and shrubs for the productive rehabilitation of tropical cattle ranching lands. *Forest Ecol. Manag.* 261: 1654-1663.
- Naranjo, R., J., A. Tarazona M., E. Murgueitio R., J. Chará O., and J. Ku V., F. Solorio S., and R. Barahona R. 2014. Contribution of intensive silvopastoral systems to animal performance and to adaptation and mitigation of climate change. *Rev. Colomb. C. Pec (Colom. J. Anim. Sci. Vet. Med).* 27: 114.
- Oluyemi, K., U. Okwuonu, D. Baxter, and T. Oyesola. 2007. Toxic effects of methanolic extract of *aspilia africana* leaf on the estrous cycle and uterine tissues of wistar rats. *Inter. J. Morphol.* 25: 609-614.
- Phaikaew, C., W. Suksaran, J. Nakamane, G. Saichuer, S. Seejundee, N. Kotprom, and H. Shelton. 2012. Incidence of subclinical toxicity in goats and dairy cows consuming leucaena (*Leucaena leucocephala*) in Thailand. *Anim. Prod. Sci.* 52: 283-286.
- Reis, P. J., R. Puchala, T. Sahl, and A. Goetsch. 1999. Effects of mimosine and 2,3-dihydropyridine on fiber shedding in Angora goats. *J. Anim. Sci.* 77: 1224-1229.
- Sahl, T., R. Puchala, P. Reis, J. Davis, K. Tesfai, J. Fernandez, and A. Millamenat. 1995. Technical note: Tissue residues of mimosine and 2, 3-Dihydropyridine after intravenous infusion in goats. *J. Anim. Sci.* 73: 172-176
- Statistical Analysis Systems Institute (SAS) statistics, version 9.2, SAS institute, Cary, NC, USA.
- Shelton, H., and S. Dalzell. 2007. Production, economic and environmental benefits of leucaena pastures. *Trop. Grasslands* 41: 174-190.
- Udoh, F. 2012. Evaluation of pharmacodynamic effects of ethanolic extract of the leaves of *Gnetum africanum* on uterine and ovarian tissues morphology of rats. *J. Natural Sci. Res.* 2: 37-42.
- Walsh, S. W., E. Williams, and A. Evans. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Rep. Sci.* 123: 127-138.
- Wu, C. M., H. M. Yuan, G. Jia, Z. S. Wang, and X. Q. Wu. 2012. Determination of mimosine and 2,3-Dihydropyridine in *Leucaena leucocephala* by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Applied Mech. Mat.* 140: 296-301.
- Yacout, M. 2016. Anti-nutritional factors and its roles in animal nutrition. *J. Dairy, Vet. and Anim. Res.* 4(1). 00107. DOI:10.15406
- Yakubu, M. 2012. Effect of a 60-day oral gavage of a crude alkaloid extract from *Chromolaena odorata* leaves on hormonal and spermatogenic indices of male rats. *J. Andrology.* 33: 1199-1207.