

Hiperestrogenismo clínico asociado con la ingesta no intencional de soja fitoestrogénica

JOSH TIMMER, BVSC; DAMIAN HOLDEN, DVM; PETER C. SCOTT, BVSC, PHD; STEVEN MCO- RIST, BVSC, PHD.

JT, DH, PCS, SM: Scolexia Pig Consultancy Com- pany, Moonee Ponds, Victoria, Australia.

Fuente: Timmer J, Holden D, Scott PC, McOrist S. Clinical hyperestrogenism associated with unintentional phytoestrogenic soybean intake. *J Swine Health Prod.* 2020; 28(6): 3029.

RESUMEN

Este estudio caracteriza el desempeño reproductivo relacionado con la ingesta dietética no intencional de compuestos fitoestrogénicos. Las granjas reproductoras A (afectada) y B (no afectada) estaban bajo una misma administración y eran abastecidas por dos compañías diferentes de pienso no relacionadas. Los parámetros de reproducción se registraron durante dos años y el pienso se analizó en busca de micotoxinas e isoflavonoides. La granja B tuvo un rendimiento reproductivo consistentemente mejor. Los signos clínicos de hiperestrogenismo (tumefacción vulvar, disfunción de la glándula mamaria y estro retardado) fueron evidentes en el 5% al 10% de las hembras reproductoras en la granja A. Las concentraciones de micotoxinas fueron insignificantes, pero las concentraciones de isoflavonoides fitoestrogénicos asociados con una fuente de harina de soja fueron superiores a 55.000 µg/kg en la granja A.

Palabras clave: porcino, fertilidad, fitoestrógenos, hiperestrogenismo, harina de soja.

INTRODUCCIÓN

Varios compuestos exógenos de origen natural pueden ocupar y estimular los receptores de estrógeno ubicados en los órganos reproductivos y de otro tipo, imitando así la acción del estrógeno endógeno. Los cerdos tienen dos receptores de estrógenos principales (ER α y ER β), ambos se consideran altamente susceptibles a imitaciones exógenas. Los brotes clínicos de hiperestrogenismo debidos a la ingesta oral de la micotoxina de zearale- nona termoestable, derivada de la contaminación de cereales por *Fusarium*, en particular maíz, están bien documentados en cerdos y otros mamíferos^{1,2}.

La aparición de hiperestrogenismo debido a la ingesta oral de isoavonoides estrogénicos, como genisteína, daidzina y daidzeína, también está bien documentada en roedores^{3,4}, pero menos en cerdos. Los isoflavonoides aparecen particularmente como componentes fitoestrogénicos de cultivos de soja (*Glycine max*), y son mucho más abundantes en sus hojas y raíces en crecimiento⁵. Se han producido brotes clínicos de hiperestrogenismo en roedores alimentados involuntariamente con dietas comerciales que contienen ingredientes de soja con altos niveles de isoflavonoides⁴. El análisis de estas dietas sospechosas indicó que podrían producirse signos clínicos con niveles dietéticos de isoflavonas del orden de 1000 a 24.000 µg / kg de pienso⁴. La ingesta dietética de fitoestrógenos de la soja también se ha relacionado con una variedad de efectos sobre órganos reproductores humanos efectos, como la infertilidad debido a la interrupción del estro y el aumento de la densidad del tejido mamario⁶. Los estudios previos en cerdos se han limitado en gran medida a estudios de exposición a desafíos in vitro e intencionales^{7,8}. Los tests de los componentes del pienso para cerdos con el fin de detectar fitoestrógenos han sido mínimos debido a la disponibilidad limitada y la naturaleza costosa del análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) requerido.

En este estudio, describimos los signos clínicos hiperestrogénicos asociados con la ingesta dietética de isoflavonoides fitoestrógenos en dos hatos reproductores.

DESCRIPCIÓN DEL CASO

Granjas y hatos de cebo

Las granjas reproductoras A y B bajo un solo grupo de manejo estaban ubicadas en la zona de clima seco sub- tropical del centro de Queensland, Australia. La genética del grupo de reproducción para ambas granjas fue de una sola fuente de cerdos cruzados Large White-Landrace, con semen para inseminación artificial suministrado por un verraco semental comercial. No se introdujeron nuevas genéticas en las granjas entre 2017 y 2019. Durante este tiempo, las granjas A y B tenían una población media de 3.550 y 1.050 hembras en edad reproductiva, respectivamente, y los cerdos destetados se llevaron a instalaciones de cría separadas. Se seleccionaron cerdas de cría para su reentrada en ambos hatos reproductores a las 22



semanas de edad según la conformación de las patas, la conformación del pezón y las características de la vulva. La preparación de las primerizas consistió en la exposición física al verraco después de las 24 semanas de edad. Las primerizas ingresaron en el programa de detección del estro y apareamiento a las 27 semanas de edad, con el primer apareamiento tras el segundo estro entre las 30 y 36 semanas de edad. Ambos hatos de cría habían estado libres de signos clínicos u otra evidencia asociada con el parvovirus, virus de la peste porcina clásica (PPC), virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) y circovirus porcino patogénico, según lo monitoreado por necropsia, serología específica e inmunohistoquímica durante los 10 años anteriores y durante todo el proceso de estudio del caso (2017-2019).

SEGUIMIENTO DEL RENDIMIENTO DE LOS CERDOS DE CEBO

Los procedimientos de cría en ambas granjas estaban bajo la misma administración y de acuerdo con el estándar industrial para los mismos procedimientos operativos auditados. El reentrenamiento del personal para todos los procedimientos de reproducción se llevó a cabo cuatro veces al año bajo supervisión veterinaria. Las hembras reproductoras fueron monitoreadas por celo por reacción al verraco y prueba de contrapresión. Los procedimientos de apareamiento consistieron en inseminación artificial con presencia física de un verraco y la colocación de un dispositivo dorsal simulador de verraco. La inseminación en ambas granjas consistió en dos dosis de 80 ml (con

24 horas de diferencia) de semen Large White o Landrace del mismo grupo de verracos de la manada. La confirmación de la fecundación se realizó mediante un dispositivo de ultrasonido a los 28 y 56 días posteriores al apareamiento.

Después del parto, el destete se produjo entre 22 y 28 días después. Dos días después del destete, se proporcionó exposición física al verraco a las cerdas hasta el estro y el apareamiento. Se consideró normal un intervalo entre el destete y el apareamiento de 7 días o menos. Después de 7 días, las cerdas no apareadas se colocaron en un corral separado y se les proporcionó una mayor exposición física al verraco. Los cálculos se realizaron semanalmente (junio de 2017 a junio de 2019) para determinar la incidencia de celo, las tasas de concepción y gestación (positiva a los 28 y 56 días después del apareamiento, respectivamente), las tasas de partos, los intervalos de apareamiento, las camadas producidas por hembra/año, días de hembras reproductoras sin gestación ni lactancia, número de lechones nacidos vivos y lechones destetados por cerda por año. Se registró cualquier signo clínico en los cerdos de cebo y en las camadas.

DIETAS Y ANÁLISIS DE LABORATORIO

Las granjas A y B fueron suministradas de forma separada por dos fábricas de piensos no conectadas (A1 y B1, a 200 km de distancia una de otra), que formularon piensos compuestos específicos para cada fase de los cerdos. Cada dieta formulada consistió >

| Ingredientes dieta Kg/ ton métrica* | Fábrica de pienso A1 † | | | Fábrica de pienso B1 | |
|--|------------------------|------------------|------------------|----------------------|------------------|
| | Gestación | Lactación † | Wean-to-Service | Gestación | Lactación † |
| Cebada | 350 (200-500) | 200 (100-220) | 200 (100-370) | 450 (290-500) | 200 (200-200) |
| Sorgo | 300 (0-430) | 100 (0-100) | 200 (0-400) | 190 (100-460) | 100 (80-150) |
| Trigo | 0 (0-140) | 320 (270-450) | 250 (0-430) | 100 (0-230) | 450 (300-490) |
| Mezcla | 200 (150-200) | 120 (100-160) | 120 (100-200) | 0 | 0 |
| Garbanzo | 0 | 0 | 0 | 100 (100-100) | 50 (0-100) |
| Aceltes vegetales | 25 (10-27) | 25 (15-37) | 16 (10-28) | 25 (0-50) | 15 (7-18) |
| Harina de canola | 60 (50-120) | 50 (0-120) | 60 (40-90) | 70 (0-120) | 75 (60-100) |
| Harina de soja | 0 | 120 (60-130) | 85 (55-90) | 0 | 30 (0-40) |
| Harina de carne | 25 (15-45) | 25 (15-50) | 30 (20-60) | 10 (10-15) | 25 (15-50) |
| Alfalfa | 10 (0-12) | 10 (6-12) | 10 (6-12) | 25 (25-25) | 15 (12-18) |

* Se agregaron porciones de sal, producto de adsorción de micotoxinas, aminoácidos sintéticos y premezcla de minerales a toda las dietas en cantidades estándar cada una de menos de 5 kg / tonelada métrica.
† La fábrica de piensos A1 suministró a la granja A (afectada) 11 formulaciones entre 2017 y 2019. La fábrica de piensos B1 suministró a la granja B (no afectada) 8 formulaciones durante el mismo tiempo.
† Se analizaron las dietas de lactancia para determinar el contenido de micotoxinas y fitoestrógenos.

TABLA 1 Mediana (rango) de inclusión de ingredientes en las dietas para dos granjas de cerdas.

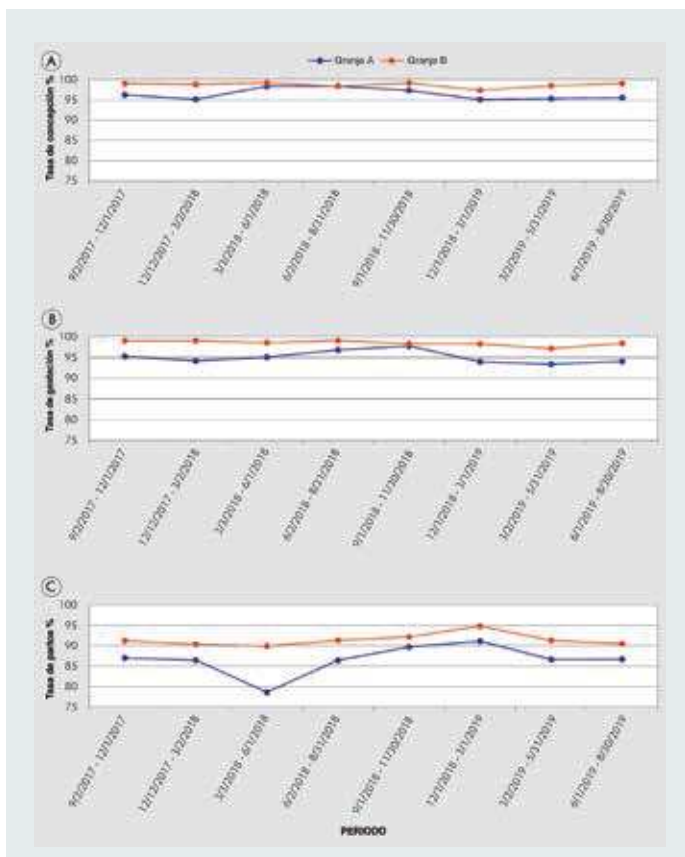


FIGURA 1 A) Concepción, B) Gestación, C) Tasas de partos en granjas A (afectadas) y B (no afectadas).

en cereales de trigo, sorgo y trigo proporcionados con fuentes de proteína de soja o canola y otros aditivos alimentarios estándar. Los cerdos se alimentaron a través de silos específicos, comederos en línea y tolvas de corral. Todos los antibióticos que ingirieron se suministraron con receta veterinaria y se incluyeron en las dietas destinadas exclusivamente al grupo objetivo de cerdos. Se agregaron a cada dieta productos adsorbentes de micotoxinas comerciales en las dosis recomendadas por los fabricantes.

En dos ocasiones en 2018 (febrero y mayo), se tomaron 9 cucharadas de alimento de varias tolvas de corral y luego se homogeneizaron para su análisis, y esto ocurrió en cada granja. El análisis de estos piensos compuestos se realizó para isoflavonoides conocidos mediante análisis de HPLC estándar junto con espectrometría de masas (MS)⁹. En resumen, se extrajeron 5 g de cada muestra de alimento con acetonitrilo/agua/ácido acético durante 90 minutos, se diluyeron, luego se cribaron y cuantificaron en el modo de monitoreo de reacción seleccionado dentro de la HPLC/MS (Agilent biosystems, IFATulln, University of Natural Resources and Life Ciencias, Viena, Austria). Se establecieron dos transiciones que conducen a cuatro puntos de identificación



para cada analito, con calibraciones realizadas mediante diluciones en serie de una solución multianalito. Para las pruebas de micotoxinas, también se tomaron muestras de los alimentos de la misma manera cada 2 meses (n= 10). El análisis de estos piensos compuestos se realizó para 23 micotoxinas conocidas mediante un análisis líquido-líquido comercial acoplado con espectrometría de masas (*Spectrum 380*; Biomin).

INVESTIGACIONES DE CASOS

Las cerdas reproductoras preñadas fueron alimentadas con una dieta específica por etapa para la gestación (dieta seca para cerdas) y luego se cambió a una dieta de lactancia comenzando 10 días antes del parto, y después se volvió a la dieta seca tras el siguiente celo y reposición. Solo en la granja A se proporcionó una dieta adicional (también de la fábrica de piensos A1) para las hembras durante el período de destete a la cubrición. Las formulaciones para estas dietas variaron ligeramente durante los 2 años dependiendo de la disponibilidad de ingredientes. Las fábricas de piensos A1 y B1 formularon respectivamente 500 y 100 toneladas métricas de pienso para cerdos por semana y, por lo tanto, formularon 11 y 8 dietas, respectivamente, durante el período de estudio. La mediana y el rango de ingredientes utilizados en estas formulaciones dietéticas se enumeran en la *Tabla 1*. Los componentes de la dieta a base de cereales, aceite y aditivos fueron generalmente similares; sin embargo, el contenido de harina de soja y de molienda (resto de la fábrica de alimentos) de las dietas de lactancia fueron consistentemente mayor en las dietas

de la granja A, mientras que la pasta de canola y garbanzos se utilizó más en las dietas de la granja B (*Tabla 1*). Los ingredientes dietéticos para las fábricas de piensos A1 y B1 se obtuvieron de diferentes fuentes locales e internacionales. La harina de soja utilizada en la fábrica de piensos A1 fue suministrada por una importante empresa multinacional de piensos y se obtuvo a través de contenedores de Argentina. La harina de soja importada se había vaciado y guardado en un solo silo a granel en un centro de distribución del puerto. Este silo a granel suministró harina de soja al molino de piensos A1 cada 2 semanas. >

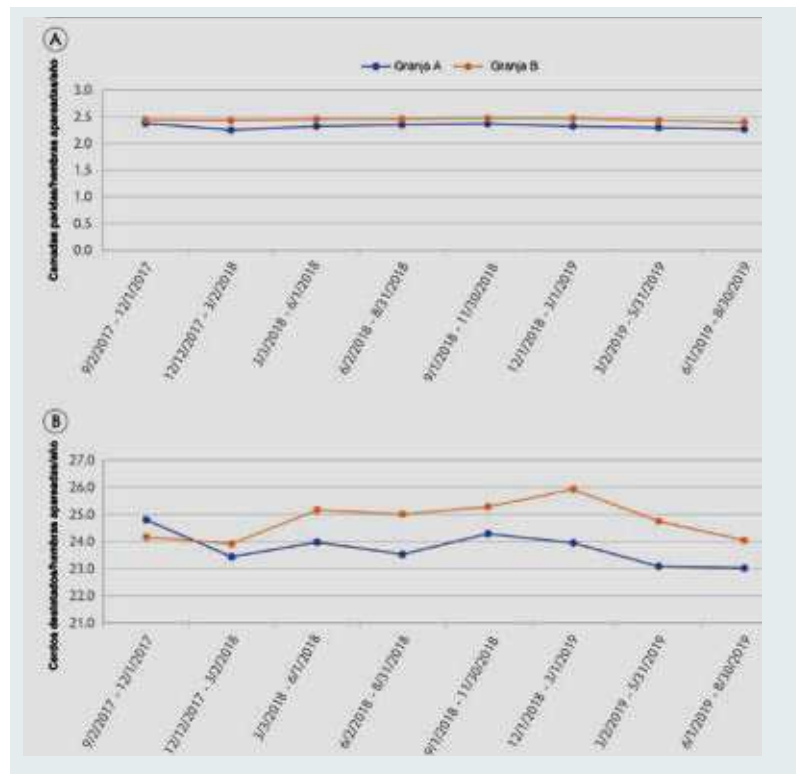


FIGURA 2 A) Camaradas paridas apor hembra/(año) y B) lechones destetados por cerda/año en granjas A (afectadas) y B (no afectadas).

| | Granja A Dieta de Lactación | Granja B Dieta de Lactación |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Micotoxina, * µg/kg | | |
| Toxina T-2 | 1.86 | 1.90 |
| Fumonisina B-4 | 2.44 | 2.50 |
| Zearalenona | ND | ND |
| Fitoestrógeno, µg/kg | | |
| Daidzeína | 1045 | ND |
| Daidzín | 53,658 | ND |
| Genisteína | 1733 | ND |
| Genistina | 55,977 | ND |
| Gliciteína | 328 | ND |
| Glicitina | 12,713 | ND |

* Se analizaron otras veinte micotoxinas pero por debajo del límite de detección, incluidas las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, fumonisina B1, B2 y B3, ocratoxina, nivalenol, deoxinivalenol, 3-acetil deoxinivalenol, 15 acetil deoxinivalenol, toxina HT-2, neosolanol, desacetoxiscirpenol, enniatin A1, B y B1, y grupo alcaloide del centeno.

ND. Debajo del límite de detección.

TABLA 2 Análisis de micotoxinas y fitoestrógenos de las dietas de las cerdas en la granja A (afectada) y la granja B (no afectada).

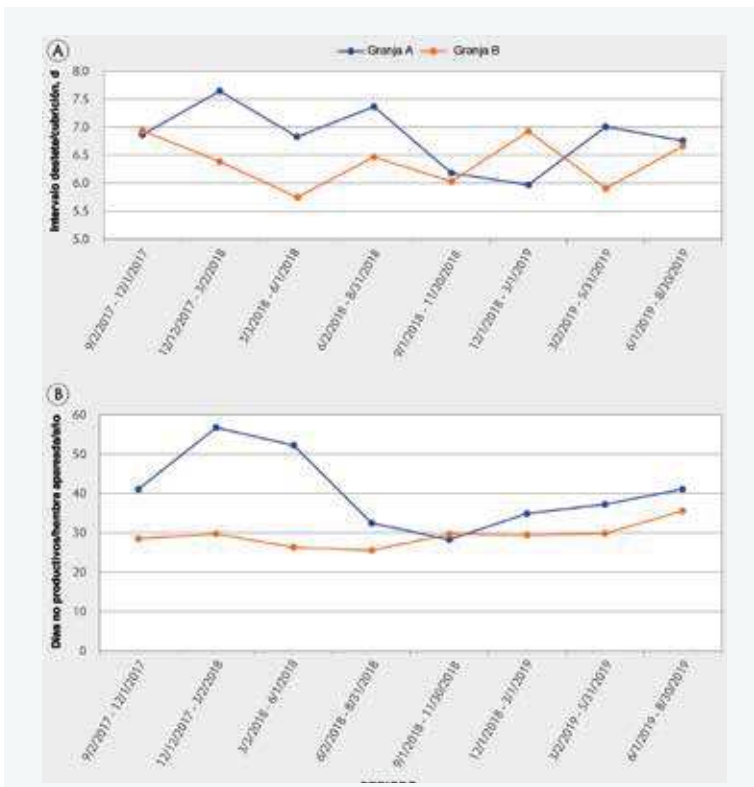


FIGURA 3 A) Intervalo entre destete y cubrición y B) Días no productivos por hembra apareada/año en granjas A (afectadas) y granjas B (no afectadas)

➤ Para las granjas A y B, las tasas de concepción fueron 96,4% y 98,6%, las tasas de gestación fueron 95,0% y 98,4% y las tasas de partos fueron 86,6% y 91,5%, respectivamente (Figura 1). Las camadas paridas por hembra/año fueron 2.32 y 2.43 y los lechones destetados por cerda/

año fueron 23.7 y 24.7 en las granjas A y B, respectivamente (Figura 2). El intervalo de cubriciones fue de 6.8 y 6.4 días y los días no productivos fueron de 40.8 y 30.4 en las fincas A y B, respectivamente (Figura 3). El número de lechones nacidos vivos por camada (11,7 y 11,6) y el número de lechones destetados por camada (10,2 y 10,1) fueron similares en las granjas A y B. Por lo tanto, observamos un rendimiento reproductivo consistentemente mejor en los cerdos de la granja B (considerada no afectada).

Los signos clínicos solo fueron evidentes en el 5% al 10% de las hembras reproductoras en la granja A durante aproximadamente 120 eventos de parto por semana. Los signos clínicos típicos fueron tumefacción vulvar (vulvas enrojecidas, hinchadas, “vidriosas”; Figura 4) y falla en el adecuado desarrollo mamario que se observó al ingresar al área de parto. Esta falla del desarrollo mamario generalmente se resolvió en los 4 días posteriores al parto. Aproximadamente el 5% de las cerdas en la granja A mostraron comportamiento de estro entre los 18 y 24 días después del parto. Estos comportamientos incluían masticaciones e inquietud, orejas erguidas y flujo vaginal claro. El intervalo del destete a la cubrición se retrasó notablemente en la granja A (Figura 3) con 7% a 14% de las cerdas mostrando comportamiento de estro 15 a 20 días después del destete. De manera intermitente, se observó enrojecimiento e hinchazón de la vulva en lechones hembras (nacidas en la granja A en mayo de 2018) desde el nacimiento hasta los 5 días de edad. Ninguno de estos hallazgos se observó en la finca B. El origen genético de los cerdos y los procedimientos de gestión de la explotación, incluida la cría, la recopilación de datos, el funcionamiento, la formación del personal y los procedimientos de auditoría, se consideraron idénticos.

TIPIFICACIÓN FITOESTROGÉNICA

El análisis de los alimentos compuestos derivados de la fábrica de alimentos A1 y consumidos por las hembras en la granja A antes, durante y después de la lactancia mostró niveles altos (hasta 55,977 µg/kg) de varios isoflavonoides, incluyendo genistina, glicitina y daidzina (Tabla 2). El

escrutinio de los ingredientes dietéticos en las granjas afectadas y no afectadas (*Tabla 1*) indicó que la presencia dietética de estos isoflavonoides se asoció con una fuente de componente de harina de soja en la fábrica de piensos A1, derivado de un lote importado de Argentina por un importante grupo mundial de productos alimenticios y se mantiene en un silo a granel. Este lote de soja se utilizó durante todo el período de prueba en 2018. Las pruebas repetidas (10 veces) del alimento en las granjas A y B indicaron que 23 micotoxinas conocidas, incluida la zearalenona, permanecieron por debajo de los niveles detectables o dentro de los rangos de referencia sin efecto (*Tabla 2*). Se instituyó un cambio de materiales de soja en la fábrica de piensos A1 al final del período de estudio (septiembre de 2019) y luego el síndrome clínico se disipó.

INVESTIGACIONES DE CASOS

En este estudio, identificamos la presencia de hiperestrogenismo clínico en una proporción de hembras reproductoras en una granja afectada con la presencia de isoflavonoides en dietas específicas de lactancia y desde el destete a la cubrición. Estos isoflavonoides aparentemente se derivaron de una fuente de harina de soja y no estaban presentes en la misma medida en las dietas de la granja B. Se desconoce la presencia de isoflavonoides en los cereales o en los principales componentes dietéticos de las dietas para cerdos, distintos de la harina de soja. Los signos clínicos observados en los animales reproductores afectados incluyeron tumefacción vulvar, disfunción de las glándulas mamarias y varios signos de infertilidad, como días más improductivos, presumiblemente debido a efectos estrogénicos en el ovario y el útero. Estos signos se asemejaban estrechamente a los observados en el síndrome de hiperestrogenismo debido a la toxicosis por zearalenona¹, pero el análisis del alimento para esta y otras micotoxinas fue consistentemente negativo y el uso constante de aglutinantes de micotoxinas comerciales en las dietas de las granjas no alivió el síndrome.

Los estudios previos de fitoestrógenos en cerdos se han limitado en gran medida a estudios de exposición *in vitro* y de exposición intencional^{7,8}. Este estudio documenta la aparición de hiperestrogenismo asociado con la ingesta oral de isoflavonoides fitoestrogénicos en cerdos de granjas comerciales. Las limitaciones del estudio incluyen que la comparación de los parámetros de reproducción y las investigaciones sobre alimentación solo fue posible en este sistema de granja, y no lo fue en todas las granjas de cerdos de la región que experimentan signos clínicos similares.

La actividad de los isoflavonoides detectados en las dietas, en particular la genistina y la daidzina, están bien documentadas como causas de hiperestrogenismo cuando están presentes en la dieta de animales de laboratorio y



FIGURA 4 Tumefacción vulvar típica observada en una cerda afectada en la granja A.

de otros mamíferos^{3,4}. A diferencia de las pruebas de micotoxinas, las pruebas de fitoestrógenos en piensos para cerdos mediante HPLC tienen una disponibilidad limitada y no se realizan de forma generalizada. Los isoflavonoides fitoestrogénicos y las micotoxinas son potentes estimuladores de ER α y ER β .

Debido a que no se detectaron micoestrógenos en los alimentos para cerdos en este estudio, consideramos que los isoflavonoides están involucrados en el síndrome de hiperestrogenismo en estas cerdas.

Los isoflavonoides se presentan como componentes fitoestrogénicos de los cultivos de soja y son particularmente abundantes en sus hojas y raíces en crecimiento⁵. La preparación comercial de lotes de harina de soja puede incorporar aproximadamente un 20% de los denominados desechos de soja, que generalmente incluye hojas y otros componentes¹⁰. Es posible que el lote particular de harina de soja utilizado durante este estudio contuviera una cantidad notable de tales desechos de soja. La agregación de lotes de soja, de una variedad de fuentes nacionales, en esta harina de soja comercial no permitió una identificación de una fuente más específica. Los ingredientes de maíz y soja se utilizan en menor medida en la preparación de dietas para cerdos en las fábricas de piensos en Europa, Asia y Oceanía en comparación con las dietas estadounidenses debido >

➤ a los costes de transporte. El porcentaje de harina de soja dentro de las dietas sospechosas en la fábrica de piensos A1 estuvo por debajo de las tasas de inclusión estándar para algunas dietas para cerdos estadounidenses. A diferencia de las pruebas de micotoxinas, las pruebas de la harina de soja y otros ingredientes para detectar fitoestrógenos no es una práctica de rutina. A diferencia del uso establecido de inhibidores de micotoxinas, existe una disponibilidad limitada de productos que inhiben los fitoestrógenos de la dieta. Por lo tanto, se sugiere que se investiguen los casos clínicos futuros de hiperestrogenismo en cerdos en busca de estas dos posibles fuentes de disruptores endocrinos.

También se han producido brotes clínicos de hiperestrogenismo en ratones alimentados involuntariamente con dietas comerciales que contienen soja con altos niveles de isoflavonoides⁴. La medición de los niveles de isoflavonoides en estas dietas comerciales para roedores, derivadas de materiales sospechosos de ingredientes de soja, indicaron que los signos clínicos podrían ocurrir con niveles del orden de 1000 a 24.000 µg/kg de alimento⁴, que eran similares o menores que los niveles de isoflavonoides observados en este estudio en las dietas de cerdos sospechosos.

Se sabe que los isoflavonoides se absorben y se distribuyen rápidamente en los órganos reproductores después de su ingestión oral^{3,7}. En este trabajo, por lo tanto, asociamos la ingesta de harina de soja sospechosa en las dietas de lactancia y en las dietas de cerdas posteriores al destete con la aparición de signos de hiperestrogenismo en infertilidad, particularmente notables en la fase de destete al apareamiento.

A partir de estudios previos⁷, la dosis exacta de isoflavonoides requerida en una granja para precipitar el hiperestrogenismo en las cerdas no está clara. Un cálculo de los isoflavonoides presentes en las dietas de cerdos analizadas y una ingesta promedio normal de 200 kg de alimento de la cerda de aproximadamente 6 kg/día tendería para indicar que los signos clínicos observados en este estudio podrían ocurrir con aproximadamente 1 kg de contenido de harina de soja que contenga aproximadamente 0,12 kg de isoflavonoides (Tabla 2) por día; es decir, 0,6 mg de isoflavonoides por kg de peso corporal. Es por tanto razonable esperar que la gravedad de los signos dependa de la dosis.

IMPLICACIONES

Bajo las condiciones de este estudio:

- Los isoflavonoides derivados de la soja se asociaron con hiperestrogenismo en las cerdas.

- Los signos clínicos fueron tumefacción vulvar, disfunción de las glándulas mamarias e infertilidad.

REFERENCIAS

1. Aucock HW, Marasas WF, Meyer CJ, Chalmers P. Field outbreaks of hyperoestrogenism (vulvo vaginitis) in pigs consuming maize infected by *Fusarium graminearum* and contaminated with zearalenone. *J S Afr Vet Assoc.* 1980;51:163-6.
2. Fink Gremmels J, Malekinejad H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim Feed Sci Technol.* 2007;137:326-41.
3. Franke AA, Halm BM, Kakazu K, Li X, Custer LJ. Phytoestrogenic isoflavonoids in epidemiologic and clinical research. *Drug Test Anal.* 2009;1:14-21.
4. Brown NM, Setchell KDR. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab Invest.* 2001;81:735-47.
5. Morgan HE, Dillaway D, Edwards TM. Estrogenicity of soybeans (*Glycine max*) varies by plant organ and developmental stage. *Endocr Disruptors.* 2014;2(1):e28490. doi:10.4161/endo.28490
6. Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol.* 2010;31:400-19.
7. Ford JA Jr, Clark SG, Walters EM, Wheeler MB, Hurley WL. Estrogenic effects of genistein on reproductive tissues of ovariectomized gilts. *J Anim Sci.* 2006;84:834-42.
8. Brookshire C, Necaise K, Moulton K, Christiansen D, Crenshaw M, Scanes C, Ryan P. Evaluation of thermal gradients of the external genitalia of neonatal pigs following oral exposure to the soyderived phytoestrogen genistein and estradiol. *Proc AASV Annual Meeting.* Dallas, TX. 2009:307-8.
9. Vishwanath V, Sulyok M, Labuda R, Bicker W, Krska R. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395:1355-72.
10. Thakur M, Hurburgh CM. Quality of US soybean meal compared to the quality of soybean meal from other origins. *J Amer Oil Chem Soc.* 2007; 84: 835-43.

El artículo original puede leerse en el QR adjunto:

<https://www.authorea.com/users/345604/articles/471773-stability-of-african-swine-fever-virus-in-soil-and-options-to-mitigate-the-potential-transmission-risk>

