

ACTIVIDAD FITO-ESTROGENICA DEL TREBOL BLANCO *IN VITRO* E *IN VIVO*
Y SU FLUCTUACION EN RELACION A VARIABLES CLIMATICAS, ESTADO
METABOLICO Y FERMENTACION RUMINAL¹ /

L. A. GIL*
M. C. DIAZ*
J. RAMIREZ*
M. MAYORGA*

Summary

There is no clear understanding of estrogen activity in white clover, nor its effects on animal fertility. Because this plant is a major protein source for livestock in Latin America, estrogen activity was measured during a one-year cycle, using methods for comparing radioactivity. Estrogen levels rose with rainfall, sunshine and ruminal fermentation, but was unaffected by environmental temperature and grazing.

In order to determine whether estrogen activity measured in vitro affected animal fertility, several reproductive parameters of the female mouse were measured after feeding the animal clover extracts, either in liquid form or in two injections. Estrus cycles were drastically lengthened in estrus and diestrus and fertility was suppressed. These effects were similar in both the injected application and the oral application, although accumulated oral doses contain one hundred times the amount in injected doses. The fermented extract, administered orally, appears to have affected fertility more than the unfermented extract, but parenteral action was undifferentiated.

Introducción

La baja fertilidad del ganado lechero de la Sabana de Bogotá, es uno de los mayores obstáculos en el desarrollo de esta industria. Entre las principales causas que se mencionan, están las deficiencias nutricionales y errores en el manejo reproductivo. Dado que en las praderas de esta región abunda el trébol blanco (*Trifolium repens* var. Ladino), fue necesario investigar si éste contiene estrógenos, que pudieran interferir con el comportamiento reproductivo del ganado.

Ciertas especies de trébol contienen estrógenos que afectan la fertilidad de los animales, entre ellas

Trifolium subterraneum (4, 17, 27), *Trifolium pratense* (6, 11, 14, 30), y *Trifolium repens* var. Ladino (26).

Las investigaciones realizadas en diferentes países en relación al trébol blanco, son contradictorias en lo referente a su actividad estrogénica. Bickoff *et al.* (6), determinaron que posee cumestrol, una sustancia estrogénica bastante activa. Newton y Betts (18) y Lindner (16), mencionaron débil estrogénica, mientras que Bennett *et al.* (3), no encontraron actividad estrogénica en esta variedad de trébol.

El presente trabajo tuvo como objetivo medir *in vitro* la actividad estrogénica del trébol blanco (*Trifolium repens* var. Ladino), durante un ciclo anual de crecimiento en dos praderas del altiplano de Bogotá, situadas a una altura de 2 600 msnm, y relacionar los valores estrogénicos con tres variables climáticas, con la edad de la planta y con el efecto de la fermentación *in vitro* mediante microorganismos del rumen.

¹ Recibido para publicación el 30 de marzo de 1983.
Se agradece al Organismo Internacional de Energía Atómica, OIEA, de Viena, por su apoyo financiero.

* Instituto de Asuntos Nucleares, Bogotá, Colombia.
Apartado Postal 8595, Bogotá, Colombia.

La segunda parte de este estudio, fue corroborar *in vivo* la actividad estrogénica medida previamente *in vitro*. Con tal fin, se examinó el efecto de extractos acuosos del trébol, sobre el ciclo estral, la receptividad sexual y la fertilidad del ratón hembra

Materiales y métodos

Material vegetal

El trébol bajo estudio crecía en asociación con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) en dos praderas colindantes: una fue pastoreada rotativamente permitiéndole periodos de recuperación, la otra se mantuvo sin ganado durante todo el periodo de muestreo. La población de tréboles en la pradera pastoreada estaba distribuida en zonas discretas, donde alcanzaba alturas superiores a las del pasto kikuyo, al final de los periodos de recuperación. En la pradera no pastoreada el tamaño del trébol fue siempre inferior al del kikuyo, el cual impidió una adecuada iluminación

Las muestras representativas de cada pradera fueron colectadas cada ocho días, entre marzo de 1979 y febrero de 1980. Este material se secó en estufa de aire forzado a 60°C por 48 horas. La materia seca fue determinada por secamiento total a 100°C por 48 horas. Las muestras secas se molieron con un molino Willey hasta polvo fino y se conservaron en recipientes herméticos

Extracción y fermentación

El polvo de trébol se sumergió en un exceso de agua, con agitación ocasional, durante 48 horas a 39°C y luego se exprimió entre gaza. Finalmente se adicionó agua para lograr las concentraciones requeridas

La fermentación consistió en incubar anaeróbicamente trébol seco con solución de McDougall y fluido ruminal filtrado (inóculo), a 39°C por 48 horas (29). El inóculo fue obtenido de una vaca con fistula en el rumen que pastaba tréboles y kikuyo. Los valores de estrógenos de los testigos en que como sustrato se usó papel filtro molido se sustrajeron de los valores de las muestras respectivas

Terminado el tiempo de extracción o fermentación, las muestras fueron centrifugadas a 2405 x G, separando los sobrenadantes a los cuales se les determinó la actividad estrogénica

Los extractos inyectables se isotonizaron con cloruro de sodio y se esterilizaron por filtración a través de una membrana miliporo (0.22 µ)

Cuantificación de la actividad estrogénica

Los anteriores extractos fueron incubados *in vitro* a 4°C y 18 horas, en presencia de una cantidad constante de 17-β-Estradiol-³H y una cantidad constante de citosol que contenía receptores específicos para estrógenos. La curva de calibración se elaboró incubando concentraciones entre 0 y 1280 pg de 17-β-Estradiol frío (E).

La valoración de cada muestra, se realizó extrapolando sobre la curva de calibración el porcentaje de radiactividad ligada al citosol, después de sedimentar la fracción de hormona no ligada adsorbida a gránulos de carbón recubiertos con dextrano (15)

El citosol se obtuvo por ultracentrifugación de un homogenizado de úteros de conejas adultas a 105000 x G durante 90 minutos a 4°C (9)

Efecto sobre ratones hembra

Se usaron ratones hembra púberes, cepa Suiza, aproximadamente de 8 semanas de edad y con pesos de 24 a 30 g. Se mantuvieron en grupos de 10 animales por jaula a 22°C y se sometieron a 10 horas de luz artificial y 14 horas de oscuridad diariamente

Los ratones consumieron una dieta balanceada, que fue modificada durante el experimento, por carencia de ingredientes, causando disturbios sobre el ciclo a todas las ratonas. El agua y los extractos fueron suministrados permanentemente. Se consideró como dosis administradas al promedio de las dosis bebidas durante los 25 días de tratamiento.

En los experimentos por vía intraperitoneal se administró a cada animal en diestro dos inyecciones de los extractos, a intervalo de 10 días entre inyecciones y a dosis de 1.6 y 3.0 g de trébol seco por kg de peso corporal

Evolución del ciclo estral

Se estudió mediante citología, observando diariamente el tipo de células presentes en el frotis vaginal de cada ratona. El frotis se obtuvo antes de las 8:00 a.m. introduciendo y succionando una gota de solución fisiológica estéril en la vagina, con ayuda de un gotero capilar. El material obtenido se extendió sobre un portaobjetos, se coloreó con solución azul de toluidina al 0.05% y se observó al microscopio

Los animales tuvieron un periodo de adaptación de 15 días. Durante los siguientes 15 días se estableció la evolución normal del ciclo y luego se inició

la administración de los extractos, continuando con las observaciones citológicas, para detectar las alteraciones que sobre el ciclo causaran los extractos. Posteriormente se introdujeron machos, uno por caja de cinco hembras, y se constató la cópula por presencia del tapón vaginal o espermatozoides en el frotis

Análisis estadístico

Los datos mensuales de precipitación pluvial, temperatura ambiente y brillo solar, fueron correlacionados con los valores de actividad estrogénica encontrados.

Los valores de actividad estrogénica en los tréboles pastoreados y no pastoreados, fermentados y no fermentados, fueron comparados por análisis de varianza (10).

Los parámetros reproductivos de las ratonas, fueron comparados entre tratamientos mediante pruebas de T.

Resultados y discusión

Fluctuaciones anuales

Los promedios mensuales de las tres variables meteorológicas, se representan en la Figura 1. Solamente la precipitación pluvial mostró una marcada fluctuación durante el año, presentándose dos períodos lluviosos; el primero, alcanzó su máximo valor en el mes de mayo, y el segundo entre los meses de octubre y noviembre.

La Figura 2, indica las fluctuaciones en la actividad estrogénica de las praderas pastoreadas y no pastoreadas. Se observa un incremento a partir del

mes de agosto en ambas praderas, lo cual coincide con el segundo período de lluvias

Esta relación se observa en forma más clara para la actividad estrogénica de los tréboles fermentados (Figura 3), donde los niveles de ambas praderas fluctúan en forma similar a las variaciones de la precipitación pluvial. El mayor aumento en estrogénicidad ocurrido durante y a continuación del segundo período lluvioso, tal vez fue consecuencia de la alta humedad que permaneció en el suelo, una vez que cesaron las lluvias (enero y febrero) y el concomitante aumento en el brillo solar, condiciones propicias a un acelerado crecimiento y metabolismo vegetal

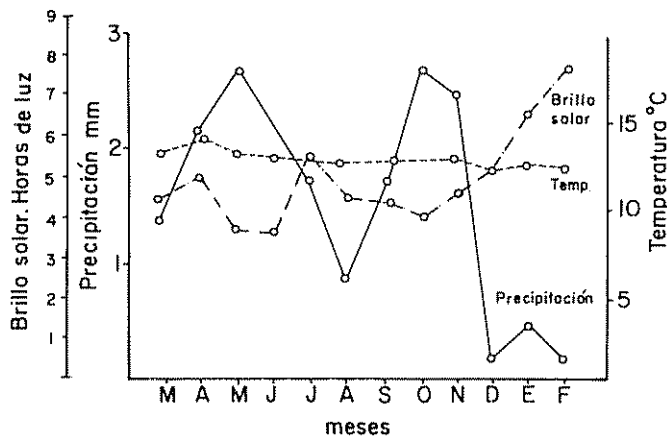


Fig. 1. Promedios mensuales de precipitación pluvial, temperatura y brillo solar.

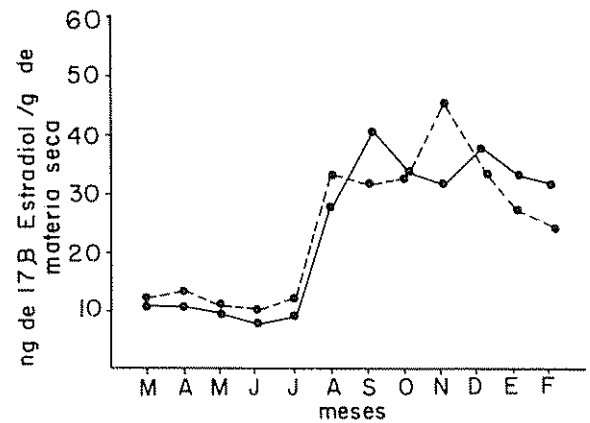


Fig. 2. Promedios mensuales de actividad estrogénica en las praderas pastoreada (---) y no pastoreada (—), sin fermentar

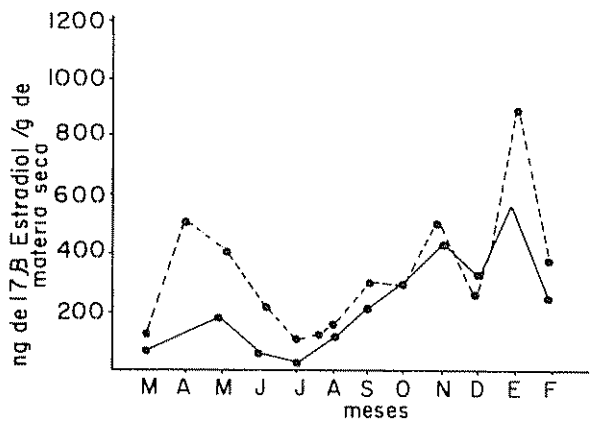


Fig. 3. Promedios mensuales de actividad estrogénica en tréboles fermentados de las praderas pastoreada (---) y no pastoreada (—)

Diferencias entre praderas pastoreada y no pastoreada

Los valores representados en la Figura 2, no difieren significativamente ($P > 0.05$) entre los tréboles sin fermentar de las praderas pastoreada y no pastoreada. Por el contrario, los niveles de estrógenos de las dos praderas después de la fermentación (Figura 3), difieren significativamente ($P < 0.01$).

Efecto de la fermentación ruminal sobre la actividad estrogénica

En promedio, el incremento en actividad estrogénica causada por acción de los microorganismos ruminales (fermentación), fue hasta de 15 veces para la pradera pastoreada y de 8.7 para la no pastoreada.

El valor promedio anual para la pradera no pastoreada, sin fermentar, fue de 22.5 ng de 17β -estradiol/g de materia seca (E/g MS) \pm DS = 13.9, mientras que para las muestras fermentadas fue de 195.6 ng E/g MS \pm DS = 177.8. Para la pradera pastoreada, sin fermentar, el promedio fue de 22.5 ng E/g MS \pm DS = 13.9 y para los fermentados 341.3 ng E/g MS.

Según los trabajos de Rossiter y Beck (24), la genisteína, formononetina y biochanina A, decrecen a medida que avanza la edad de la planta, en contraste con la daidzeína, cuya presencia sólo ocurre en hojas próximas a la senectud.

Puesto que las plantas no pastoreadas son generalmente viejas, y las pastoreadas están en continua recuperación, estas últimas contendrían mayores cantidades de formononetina, genisteína y biochanina A. Sin embargo, en términos de actividad biológica, la formononetina y biochanina A, tienen solamente una veinteava parte de la actividad correspondiente a la daidzeína (28); esto permitiría explicar por qué la actividad biológica de las dos praderas no difirió antes de la fermentación. Es también sabido que la fermentación por microorganismos ruminales desmetila a la biochanina A y a la formononetina para convertirlas en genisteína y daidzeína, sustancias de mayor actividad estrogénica (28). Este hecho explicaría por qué la fermentación incrementó la actividad, y por qué este incremento fue más marcado para las plantas jóvenes (pastoreadas), ricas en biochanina A y formononetina.

Se desconoce cómo fluctúa la cantidad de cumestrol con la edad u otros factores que afecten el metabolismo vegetal; sin embargo Bickoff *et al.* (6), han demostrado que el cumestrol posee una actividad estrogénica superior a la de las isoflavonas y es abundante en el trébol blanco.

Efectos sobre el ciclo y la reproducción del ratón hembra

Vía oral. Las dosis suministradas en los extractos bebidos, fueron para cada experimento de 16.6 y de 18.2 g de trébol seco por kg de ratón (g/kg) para el extracto digerido y de 12.9 y 18.9 g/kg para el no digerido. Estas dosis alteraron la ciclicidad, pero no causaron disturbios colaterales visibles sobre el ratón.

La Figura 4, muestra las alteraciones típicas del ciclo estral, inducidas por la administración oral diaria de los extractos durante 25 días. Se presentan los ciclos estrales de un animal representativo de cada tratamiento y uno del grupo testigo.

A partir de la iniciación del tratamiento con los extractos, se observa un alargamiento de los períodos de estro y diestro. Las leves alteraciones que se observan en el grupo control, se deben quizá a que fue necesario hacer un cambio en el régimen alimenticio. Mientras los testigos copularon en su primer estro después de la introducción del macho, las ratonas tratadas con los extractos no fueron receptivas hasta un lapso 1.6 veces más largo (digerido) y 1.3 (no digerido), a pesar de sus prolongados estros (Cuadro 1). Este efecto continuó aún después de la suspensión del tratamiento para algunas ratonas que no aceptaron al macho.

Para los dos tratamientos con trébol, el promedio en días por animal, en diestro más estro desde el primer día en tratamiento hasta la cópula, fue de 13.7 días para el digerido y de 13.0 para el no digerido (Cuadro 1), y fueron significativamente ($P < 0.05$) mayores que para el testigo (10.1). La diferencia entre tratamientos no fue significativa ($P > 0.05$).

La administración del extracto digerido causó alteraciones del ciclo estral en el 84% de las hembras, el extracto no digerido en el 85%, mientras que en el grupo control sólo el 35.5% mostraron alteraciones.

El promedio de días para copular fue de 9.8 y 8.1 para los tratamientos y 6.1 para el control. Para los animales que no habían copulado al retirar el macho, se contaron el total de días que permanecieron en presencia del macho.

El tratamiento con el extracto digerido disminuyó la receptividad en un 30% y el no digerido en un 10%.

Como se observa en el Cuadro 1, solamente el 70% de las ratonas testigo gestaron, sin que exista explicación para esta baja reproducción. El número de crías por grupo, incluyendo las hembras que no

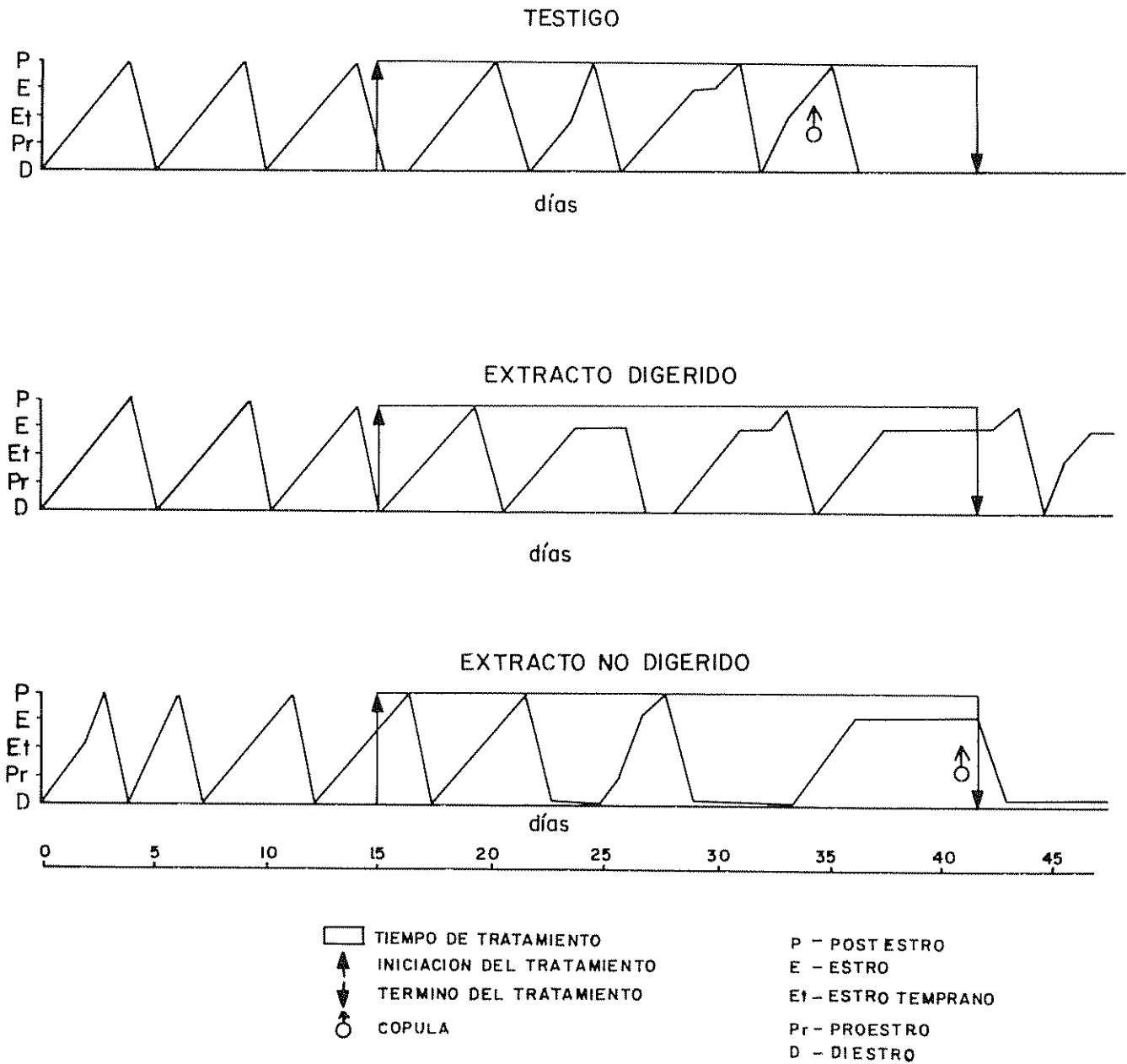


Fig. 4. Alteraciones típicas del ciclo estral causadas por la administración de dosis diarias por vía oral de extracto de *Trifolium repens* durante 25 días.

gestaron, muestra una reducción cercana a la mitad en el caso del tratamiento con el extracto digerido, en relación al testigo (Cuadro 1). No computando las ratonas vacías, se produjeron entre dos y tres crías menos que el testigo; no obstante, estas diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$)

Vía intraperitoneal: Las tres dosis ensayadas intraperitonealmente para ambos extractos (0.4, 1.6 y 3.0 g/kg) fueron efectivas y no causaron intolerancia o toxicidad.

La Figura 5, muestra la evolución de los ciclos de un animal testigo y uno de cada tratamiento, e indica que los animales inyectados intraperitonealmente en diestro, presentan el mismo efecto que oralmente. Cuando se inyectan en otras fases, en general el efecto se retrasa hasta el siguiente ciclo. La segunda inyección no intensificó el efecto de la primera, supuestamente porque sus efectos aún persistían.

El promedio de días que las hembras tratadas permanecieron en diestro y en estró, fue mayor que para

Cuadro 1. Alteraciones en el ciclo estral, la receptividad y la fertilidad causadas por la administración oral de dosis diarias, durante 25 días de *Trifolium repens*

| Parámetros | Extractos de trébol | | |
|--|---------------------|-------------------|-------------------|
| | Testigo | Digerido | No digerido |
| Dosis g/kg/día ^{1/} | 0.0 | 17.7 | 18.2 |
| Número de animales en dos experimentos | 20 | 20 | 20 |
| Días en diestro + estro ^{2/3/} | 10.1 ^a | 13.7 ^b | 13.0 ^b |
| Ratonas afectadas (%) | 35.5 | 84.0 | 85.0 |
| Días para copular o en experimento ^{4/5/} | 6.1 | 9.8 | 8.1 |
| Receptividad % ^{5/6/} | 100 | 70 | 90 |
| Preñez % ^{5/} | 70 | 50 | 80 |
| Promedio crías/ratona (incluyendo las que no gestaron) ^{5/} | 6.4 | 3.4 | 5.6 |
| Promedio crías/ratona (incluyendo las que no gestaron) ^{5/} | 9.1 | 6.8 | 7.0 |

1 Gramos de material vegetal seco por kilogramo de peso corporal.

2 Diferencia (a ≠ b) estadísticamente significativa (P < 0.05). Prueba de T.

3 Promedio por animal, desde el primer día en tratamiento hasta la cópula, o fin del experimento.

4 Promedio por animal, desde la introducción del macho.

5 Calculado sobre 10 animales por tratamiento en un sólo experimento.

6 Porcentaje de ratonas que copularon.

el control. Mientras que en los tratamientos el 88% y el 82.5% de los animales se vieron afectados en su ciclo, sólo el 27.5% del control presentaron alteraciones (Cuadro 2).

No hubo diferencia (P > 0.05) entre los animales tratados y los testigos en cuanto al índice de preñez, pero el número de crías por ratona disminuyó, aunque no significativamente para los animales en tratamiento (Cuadro 2).

Los valores de la actividad estrogénica medidos *in vitro*, fueron 15 veces mayores para el extracto digerido; esta diferencia no fue significativa *in vivo*, aunque los animales que recibieron el extracto digerido por vía oral en forma continua, se vieron más afectados que los que recibieron el extracto no digerido, en cuanto a receptividad, preñez y número de crías por madre.

La discrepancia de los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* puede deberse a que las dosis utilizadas fueron de saturación para ambos extractos, como se corroboró al observar que las dosis intraperitoneales de 1.6 y 3.0 g/kg no difirieron en su respuesta y tuvieron efecto similar a las dosis orales que fueron entre 60 y 120 veces superiores para todo el periodo experimental.

Otra posible explicación a la discrepancia entre los resultados *in vivo* es la de que los métodos miden diferentes respuestas; *in vitro* se mide la afinidad de los fitoestrógenos por receptores uterinos aislados, mientras que *in vivo* se mide el efecto sobre todo el organismo, lo cual incluye no sólo la afinidad por receptores del útero, sino por receptores de la hipófisis, hipotálamo y demás órganos, y la permanencia de la unión entre receptor y estrógeno, o "avidez", la cual es prolongada, juzgando por el efecto durable que tiene una dosis única. Los informes de Underwood y Shier (1951), demostraron que ovejas después de pastorear forrajes estrogénicos, seguían infértiles varios años. Además, ésta "avidez" puede ser igual para ambos extractos, causando efectos similares para el digerido y el no digerido.

El método aquí utilizado mide, *in vitro*, la actividad estrogénica del trébol en términos de ng de E. Con base a estos resultados, podría calcularse que una vaca que consuma 5 kg de trébol seco con 200 ng de E/g, ha consumido estrógenos en cantidad equivalente a un millón de ng de estradiol, los cuales diluidos en 50 l de sangre, causarían una concentración de 20 ng/ml. Esta cifra sería mil veces superior a la concentración de Estradiol circulante durante el proestro en la vaca (20 pg/ml). Tal concentración sería suficiente para causar disturbios reproductivos, a

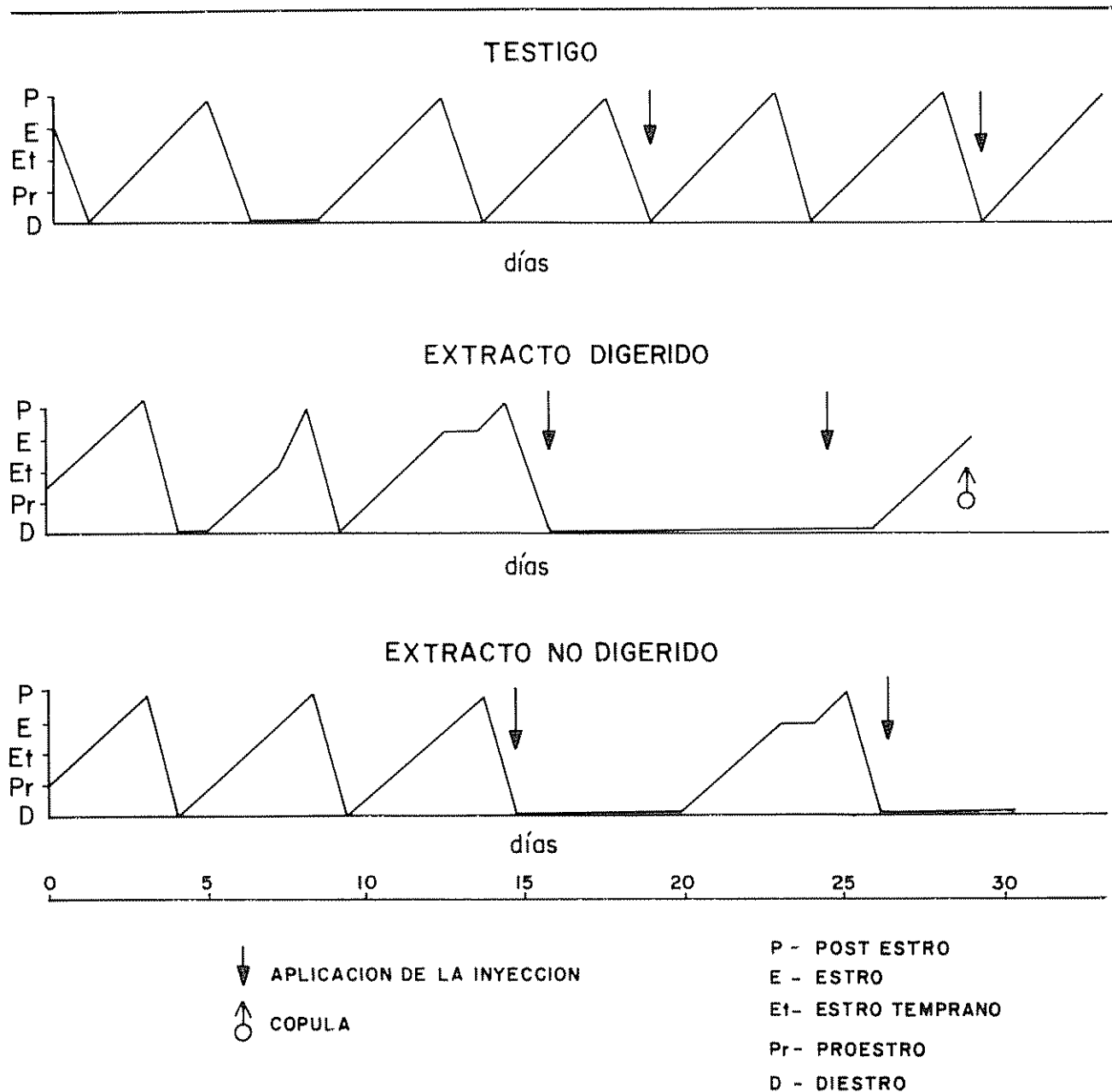


Fig 5 Alteraciones típicas del ciclo estral causadas por la administración de dos inyecciones intraperitoneales de extracto de *Trifolium repens* (Dosis: 1.6 g/kg)

menos que como comenta Shutt (27), las isoflavonas sean inactivadas en el rumen del animal, no sean absorbidas en forma de conjugados de muy baja actividad, lo cual puede ser contrario a lo reportado por numerosos estudios en ovejas

Una explicación más adecuada puede basarse en el hecho de que la equivalencia en Estradiol que arroja el análisis por competencia, no corresponda a la misma equivalencia *in vivo* como aquí se informa.

De todas maneras, este estudio pone en evidencia la necesidad de estudiar el efecto de los fitoestrógenos sobre la fertilidad del bovino

Del presente trabajo se deduce:

1. El trébol blanco, conocido anteriormente como dudosamente estrogénico, presentó una elevada actividad, en condiciones o suelos del trópico alto frío

Cuadro 2. Alteraciones en el ciclo estral, la receptividad y la fertilidad causadas por la administración de dos inyecciones I. P. de extracto de *Trifolium repens* con 10 días de intervalo.

| Parámetros | Extractos de trébol | | |
|---|---------------------|------------------------|------------------------|
| | Control | Digerido | No digerido |
| Dosis g/kg/día | 0.0 | 3.0 y 1.6 ¹ | 3.0 y 1.6 ¹ |
| Número de animales en dos experimentos | 18 | 17 | 17 |
| Días en diestro + estro ^{2/3/} | 6.7 ^a | 10.2 ^b | 10.0 ^b |
| Ratonas afectadas % | 27.5 | 88.0 | 82.5 |
| Días para copular en experimento ^{4/5/} | 5.4 | 6.5 | 5.5 |
| Receptividad % ^{5/6/} | 100 | 87 | 89 |
| Preñez (%) ^{5/} | 90 | 87 | 78 |
| Promedio de crías/ratona (incluyendo las que no gestaron) ^{5/} | 5.9 | 4.8 | 4.1 |
| Promedio crías/ratona (excluyendo las que no gestaron) ^{5/} | 6.5 | 5.5 | 5.3 |

1 Gramos de material vegetal seco por kilogramo de peso corporal 3.0 g en el primer experimento y 1.6 g en el segundo.

2, 3, 4, 5 y 6 Ibid Cuadro 1

- La actividad estrogénica se incrementa al aumentar la humedad del suelo y el brillo solar, condiciones que estimulan el crecimiento de la planta
- El metabolismo microbial del rumen, aumentó la actividad estrogénica de los tréboles medidos *in vitro*, pero este efecto no fue detectable en ratonas bajo las condiciones experimentales usadas

Resumen

No hay claridad sobre la estrogénicidad del trébol blanco, ni sus efectos sobre la fertilidad animal. Siendo éste una importante fuente proteica para la ganadería de América Latina, se midió mediante un método de competencia radio-receptor la actividad estrogénica durante un ciclo anual. La estrogénicidad aumentó con las lluvias, el brillo solar y la fermentación ruminal, pero no fue afectada por la temperatura ambiente ni el pastoreo.

Con el fin de dilucidar si la estrogénicidad medida *in vitro* influye sobre la fertilidad de un animal, se midieron algunos parámetros reproductivos del ratón hembra, sometida a beber extractos acuosos del trébol, o a dos inyecciones de los mismos. Los ciclos estrales se vieron drásticamente alargados en sus estros y diestros y la fertilidad deprimida. Estos efectos fueron similares para las dosis inyectadas y las orales, aunque estas últimas acumuladas constituyeron cantidades cien veces mayores que las inyectadas. El suministro oral del extracto fermentado parece haber deprimido la fertilidad más que el no fermentado, pero no difirieron en su acción por vía parenteral.

Literatura citada

- ALEXANDER, G., y WATSON, R. H. The assay of oestrogenic activity of *Trifolium subterraneum* L. by increase in uterine weight in spayed guinea pig. II. Assay. Journal of Agricultural Research 2:480 1951
- BECK, A. B. The oestrogenic isoflavones of subterranean clover. Australian Journal of Agricultural Research 15:223. 1964.
- BENNETT, D., MORLEY, F. H. W., y AVELSEN, A. Bioassay responses of ewes to legume swards II. Uterine weight results from swards. Australian Journal of Agricultural Research 18:495. 1967.
- BENNETTS, H. W. Metaplasia in the sex organs of castrated male sheep maintained on early subterranean clover pastures. Australian Veterinary Journal 22:70. 1946.
- BENNETTS, H. W., UNDERWOOD, E. J., y SHIER, F. L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. Australian Veterinary Journal 22:2. 1946.
- BICKOFF, E. M., BOOTH, A. N., LYMAN, R. L., LIVINGSTON, A. L., THOMSON, C. R., y DEEDS, F. Coumestrol a new estrogen isolated from forage crops. Science 126:969. 1957.

7. BICKOFF, E. M., BOOTH, A. N., LIVINGSTON, A. L., y HENDRICKSON, A. P. Observations on the effect of drying on oestrogenic activity of alfalfa samples of varying maturity. *Journal of Animal Science* 19:189. 1960.
8. BICKOFF, E. M., LIVINGSTON, A. L., BOOTH, A. N., THOMSON, C. R., HOLLOWELL, E. A. y BEINHART, E. G. Some variation in oestrogenic activity in fresh and dried white clover and the ladino variety. *Journal of Animal Science* 19:143. 1960b.
9. CORKER, C. S., EXLEY, D., y NAFTOLIN, F. Assay of 17- β -oestradiol by competitive protein binding methods. *Acta Endocrinológica*, 1970 Suppl 147:305 p.
10. CROW, E. L., DAVIES, F. A., y MAXFIELD, M. W. *Statistics Manual*. Dover Publications, Inc. New York. 1960.
11. CHENG, E., STORY, C. D., PAYNE, L. C., YODER, L., y BURROUGHS, W. Detection of estrogenic substances in alfalfa and clover hays fed to fattening lambs. *Journal of Animal Science* 12:507. 1953.
12. FRANCIS, C. H. y MILLINGTON, A. I. Varietal variation in the isoflavone content of subterranean clover: Its estimation by a micro-technique. *Australian Journal of Agricultural Research* 16:557. 1965.
13. GUGGOLZ, J., LIVINGSTON, A. L., y BICKOFF, E. M. Detection of daidzein, formononetin, genistein and biochanin A in forages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 9:30. 1961.
14. KITTS, W. D., SWIERSTRA, E., BRINK, V. C. y WOOD, A. I. The estrogenlike substances in certain legumes and grasses. I. The quantitative determination of such substances in red clover and oats. *Canadian Journal of Animal Science* 39:396. 1959.
15. KORENMAN, S. G., PERRIN, L., y McCALLUM, T. P. A radioligand binding assay system for estradiol measurement in human plasma. *Journal Clinical Endocrinology* 29:879. 1969.
16. LINDNER, H. R. Study of the fate of phyto-oestrogens in the sheep by determination of isoflavones and coumestrol in the plasma and adipose tissue. *Australian Journal of Agricultural Research* 18:305. 1967.
17. MOULE, G. R., BRADEN, A. W. H., y LAMOND, D. R. The significance of oestrogens in pasture plants in relation to animal production. *Animal Breeding Abstracts* 31(2):139. 1967.
18. NEWTON, J. E. y BETTS, J. E. Seasonal oestrogenic activity of various legumes. *Journal of Agricultural Sciences* 70:77. 1968.
19. NILSSON, A. Demethylation of the plant oestrogen biochanin A in the rat. *Nature, London* 192:358. 1961.
20. NILSSON, A. Demethylation of the plant oestrogen formononetin to daidzein in rumen fluid. *Arkiv for Kemi* 19:549. 1962.
21. PIETERSE, P. J. S., y ANDREWS, F. N. The estrogenic activity of alfalfa and other feedstuffs. *Journal of Animal Science* 15:25. 1956.
22. ROSSITER, R. C., y BECK, A. B. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) I. Effects of temperature. *Australian Journal of Agricultural Research* 17:29. 1966.
23. ROSSITER, R. C., y BECK, A. B. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) III. Effects of light. *Australian Journal of Agricultural Research* 18:23. 1967a.
24. ROSSITER, R. C., y BECK, A. B. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) V. Ontogenetic Changes. *Australian Journal of Agricultural Research* 18:561. 1967b.
25. ROSSITER, R. C. Factors affecting the oestrogenic content of subterranean clover pastures. *Australian Veterinary Journal* 46:141. 1970.

26. SANGER, V. L., ENGLE, P. H., y BELL, O. S. Evidence of estrogenic stimulation in anestrus ewes pastured on ladino clover and birdsfoot trefoil, as revealed by vaginal smears. *American Journal of Veterinary Research* 19:288. 1958.
27. SHUTT, D. A. Los efectos de los estrógenos vegetales sobre la reproducción animal. *Endeavour* 35:126. 1976.
28. SHUTT, A. R., y COX, R. I. Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors *In vitro*. *Journal of Endocrinology* 52:209. 1972.
29. TILLEY, J. H., y TERRY, R. A. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18:104. 1963.
30. WONG, E. Detection and estimation of oestrogenic constituents in red clover. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 13:304. 1962.

Notas y comentarios

La corriente del Niño y el maíz

Los rendimientos del maíz en los Estados Unidos están correlacionados con la temperatura de la superficie del Océano Pacífico. La perturbación climática de 1983 ha sido achacada a la corriente de El Niño, que ese año bajó por la costa Norte del Perú con tal inusitada fuerza que sus efectos han sobrepasado los límites normales y ha roto los records históricos de este fenómeno. Hay algunos que achacan a El Niño mismo el causar ese año la erupción del volcán mejicano El Chichón; otros especulan que las cenizas de este volcán fueron las que, al subir hasta partes muy altas de la atmósfera, provocaron cambios que intensificaron la fuerza de la corriente. En los años venideros, se van a estudiar las implicaciones y efectos de esta peculiar corriente marina.

Por lo pronto, Paul y Ellen Handler, de la Universidad de Illinois, han encontrado que en los años en que El Niño ha hecho que la temperatura de la superficie del Pacífico tropical sea más alta que lo normal, hay una probabilidad más alta de que la cosecha de maíz en los Estados Unidos aumente.

En su estudio (*Science*, vol. 220, p. 1155), usan datos de producción de maíz que van desde 1869 hasta 1979, periodo en que El Niño se presentó en 49 de los 112 años. El efecto, que influye en una pequeña proporción del rendimiento del cultivo, es estadísticamente significativo y puede explicarse por un desplazamiento de la corriente de chorro, esa faja de vientos de varios cientos de kilómetros por hora, situada en los confines de la tropósfera (de 10 a 15 kilómetros de altura sobre el nivel del mar), que se mueve en el mismo periodo que El Niño, permitiendo que más lluvia llegue a las zonas productoras del grano. Sin embargo, no se sabe todavía con certeza si El Niño causa el desplazamiento de la corriente de chorro, o si el cambio en la circulación atmosférica afecta la temperatura del océano. Adalberto Gorbitz