

Efecto de la raza y la edad sobre las concentraciones de hormonas tiroideas T3 y T4 de bovinos en condiciones tropicales

Effect of the breed and age on the thyroid hormones T3 and T4 concentrations in bovines under tropical conditions

Rómulo Campos Gaona, Leonidas Giraldo P.

Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. AA 237. Palmira, Colombia. (Autor para correspondencia: rcamposg@unal.edu.co).

REC.: 15-06-2007

ACEPT.: 02-04-08

RESUMEN

Para estudiar el efecto en condiciones de trópico seco de la edad y del grupo racial sobre las concentraciones séricas de las hormonas tiroideas T3 y T4, se muestrearon 158 animales de los grupos raciales Holstein, Lucerna, Hartón del Valle, Cebú Brahman y mestizo F1 (Cebú Brahman x Pardo Suizo), distribuidos en cuatro grupos de edad desde el nacimiento hasta el destete (8 meses). La concentración media de T3 fue 2.25 mmol/L y la de T4, 57.37 mmol/L. La correlación entre T3 y T4 fue de 0.53. Se encontró diferencia estadísticamente significativa para el efecto grupo racial, grupo de edad ($P < 0.001$) pero no para la interacción grupo racial x edad ($p = 0.286$). Los grupos raciales con concentraciones más elevadas fueron Holstein y Lucerna; la concentración más baja se presentó en los bovinos mestizos. La mayor concentración de hormonas tiroideas según la edad ocurrió en recién nacidos, luego descendió progresiva y linealmente. El trabajo encontró que en condiciones de trópico seco, en zona límite de termoneutralidad según el índice ITH, los bovinos jóvenes presentaron diferencias marcadas en las concentraciones de hormonas tiroideas.

Palabras claves: Adaptación; Bovinos; Crecimiento; Tiroides.

ABSTRACT

To study the effect of age and breed on blood concentration of thyroid hormones T3 and T4 under the dry tropic conditions, 158 animals from the groups Holstein, Lucerna, Hartón del Valle, Brahman and crossbred F1 Brahman x Brown Swiss were sampled. The animals were allocated in four age groups from newborns calves until eight month old. The average T3 concentration was of 2.25 mmolL⁻¹ and the T4 was of 57.37 mmolL⁻¹. The correlation between T3 and T4 was of 0.53. A statistical significant difference ($p < 0.001$) was found for the effects of age breed and group, but not difference was found for the interaction between breed and age ($p = 0.286$). The breeds with higher blood concentrations of T3 and T4 were Holstein and Lucerna. The lowest concentration was found among the crossbred group. The higher concentration of T3 and T4 of thyroid hormones was found in the newborn group. As the calves grow, the concentrations of T3 and T4 decrease progressively. This study found that under dry tropic conditions, in a thermo-neutral borderline zone (according to the THI index) the young bovines show clear differences in the concentration of the thyroid hormones.

Key words: Adaptation; Bovine; Growth; Thyroids.

INTRODUCCIÓN

Las hormonas tiroideas T3 y T4 se han asociado con procesos metabólicos relacionados con el consumo de oxígeno y la calorigénesis. En animales en crecimiento la dinámica del desarrollo óseo y la ganancia de peso elevan la tasa metabólica e incrementan los requerimientos y generan mayor consumo de oxígeno (Davis y Drackley, 1998). La estricta regulación metabólica que

demanda el crecimiento estimula las vías anabólicas a nivel celular mediante acciones permisivas de tipo endocrino. Como las hormonas tiroideas controlan la mitocondria los mamíferos dependen de la regulación tiroidea para garantizar el aporte de ATP (Matamoras *et al.*, 2002).

El retardo en el crecimiento, en especial de tejido neural, se ha asociado con la exposición a condiciones

de sub o hipotiroidismo, originada en deficiencias de yodo o en alteraciones patofisiológicas de la glándula tiroidea y se han definido valores mínimos basales de hormonas tiroideas para desarrollar sin tropiezos los procesos fisiológicos (Norman y Litwack, 2002; Rudas *et al.*, 2005).

Debido a la estrecha relación entre la adecuada ingestión de yodo y la síntesis de los precursores de las hormonas tiroideas en la glándula tiroidea, se ha utilizado corrientemente el análisis de la concentración sérica de T3 y T4 como indicador de la función tiroidea y la ingestión de yodo respectivamente, ya que a nivel celular la única hormona con función biológica es T3, pero el mayor potencial de síntesis proviene de la deiodinización de la molécula de T4, por tanto, esta marca la concentración como precursora y como depósito del yodo en circulación (Matamoros *et al.*, 2002).

El crecimiento en bovinos comprende sensibles cambios en los mecanismos de absorción de alimentos, debido a que en poco tiempo cambia de monogástrico a poligástrico funcional y en los procesos de destete pierde la leche como fuente potencial de yodo. Así mismo, la adecuada ingestión depende ahora de los procesos de transformación bacteriana, de la calidad de los substratos y de la integridad de la mucosa del tracto gastrointestinal, no siempre en óptimas condiciones debido a la alta incidencia de parasitismo gastrointestinal en condiciones tropicales.

La tasa de crecimiento difiere según la raza, las condiciones medioambientales, del suministro adecuado de alimento y del estado de salud. Así mismo, en el medio tropical las razas importadas exhiben curvas irregulares de crecimiento (Randall *et al.*, 2003).

Actualmente se considera que se deben duplicar los esfuerzos en los estudios sobre crecimiento y desarrollo de bovinos, con el fin de disminuir la mortalidad, reducir drásticamente los factores negativos asociados con las bajas ganancias de peso y potenciar el crecimiento con el fin de llegar rápidamente a la pubertad y al primer parto en la hembra y acortar la edad al sacrificio en los machos.

Trabajos previos sobre efecto racial han demostrado variación en la dinámica hormonal tiroidea en condiciones de trópico (Campos, 1995). Igualmente se ha evidenciado efecto de la edad sobre los valores de T3 y T4 en bovinos (Kühne *et al.*, 2000).

El objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto de la edad y del grupo racial sobre la dinámica de las hormonas tiroideas T3 y T4, principal mecanismo de regulación de consumo de oxígeno y modulador del crecimiento en bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ciento cincuenta y ocho animales pertenecientes a cinco grupos raciales, tres de origen *Bos taurus* (Holstein, Lucerna, Hartón del Valle), uno de origen *B. indicus* (Cebú Brahman) y un grupo F1 *B. indicus* x *B. taurus* (Cebú Brahman x Pardo Suizo), se dividieron en cuatro edades: recién nacidos hasta 30 días (neonatos grupo 1), entre 31 y 90 días (grupo 2), entre 91 y 150 días (grupo 3), entre 150 a 240 días (grupo 4). El número de animales por grupo racial y de edad no fue homogéneo; los animales Holstein se criaron con una dieta de 4 litros de leche/día en promedio y concentrado a voluntad. Los restantes grupos (Lucerna, Hartón, Cebú Brahman y el cruce *B. indicus* x *B. taurus*) permanecieron con las madres. La base de la dieta era calostro y leche residual en los menores (grupos 1 y 2) y leche residual y pastoreo en los mayores (grupos 3 y 4). Los sistemas de producción están situados en el Valle del Cauca (Colombia), en la zona de vida de bosque seco montano bajo (20-28°C, 650-980 msnm, humedad relativa entre 70-80%) clasificada como termoneutra según el índice temperatura humedad (ITH) (Torres de Campos *et al.*, 2001).

Los grupos raciales Holstein, Hartón del Valle y Lucerna provenían de sistemas de producción independientes, mientras el grupo Cebú Brahman y el mestizo correspondían al mismo sistema de producción. En cada grupo etéreo se seleccionaron como mínimo seis animales sin considerar el sexo, en total se evaluaron en media 32 animales por grupo racial. Con excepción del grupo Holstein, los sistemas de producción manejaban oferta alimentaria a través de pastoreo sin suplementación energética o proteica, únicamente se proveía sal mineralizada y agua *ad libitum*.

Los animales seleccionados en el estudio estaban en perfecto estado de salud. La sangre se extrajo, una vez por grupo etéreo, mediante venipunción coccígea en tubo sin anticoagulante, recolectada en horas de la mañana (08:00-09:30) después del consumo de leche y se refrigeró en hielo. El suero se extrajo mediante centrifugación (3.500 rpm) y se congeló a -20°C hasta el momento de las determinaciones hormonales.

Para la determinación de T3 y T4 se utilizó la técnica de radioinmunoanálisis en fase sólida usando reactivos comerciales (DPC®, Los Angeles, CA), las muestras se trabajaron en duplicado y la radiactividad se leyó mediante contador gamma (Nucleus®, modelo 600B). La lectura en desintegraciones por minuto se incorporó al programa de cálculo Riaccalc de la Universidad de Guelph para calcular la concentración de las hormonas tiroideas.

El diseño experimental se basó en un planteamiento completamente al azar, donde se buscó comprobar la posible influencia de la edad y la raza sobre las concentraciones séricas de T3 y T4. Se empleó análisis multivariado opción GLM del paquete estadístico SAS V-8 (SAS Institute, 2005), para número desigual de muestras. Cuando se encontró efecto significativo se determinó la diferencia mínima significativa (dms) a través del test de Scheffe, finalmente se realizó correlación de Pearson entre hormonas tiroideas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración media de triyodotironina (T3) fue 2.25 ± 0.83 nmol/L, superior a los valores de referencia para adultos, que en promedio oscilan entre 1.80 y 1.90 nmol/L; el valor medio de tiroxina (T4) fue 57.37 ± 22.14 nmol/L; para T4 en adultos la literatura informa valores entre 42 y 160 nmol/L (Campos y Rodas, 1999; Spicer *et al.*, 2001), valores similares a los de animales jóvenes aun con pesos diferentes (Kühne *et al.*, 2000). Gerrits *et al.*, 1998, en un experimento con animales en levante entre 80 y 160 kg, encontraron valores de 2.01 para T3 y de 77 nmol/L para T4 y de 1.45 y 45 nmol/L, para animales entre 160-240 kg. Los investigadores han relacionado efectos del Factor insulínico del crecimiento (IGF-I) sobre las hormonas tiroideas, enfatizando la incidencia sobre el desarrollo y el crecimiento, tal vez como moduladores de la expresión génica de las hormonas del crecimiento (Gerrits *et al.*, 1998; Morales y Rodríguez, 2005). La anterior evidencia explicaría la marcada relación entre desarrollo y tiroides, cuya relación inversa predispondría a la presentación de retardos del crecimiento (cretinismo) en las especies mamíferas (Rudas *et al.*, 2005; Norman y Litwack, 2002).

En las últimas semanas de vida fetal y en las primeras de vida extrauterina la concentración sérica de hormonas tiroideas es más alta que en otros períodos fisiológicos (Cassar-Malek *et al.*, 2006; Rowntree *et al.*, 2004, Campos *et al.*, 1993). En la investigación se registró dramática caída en las concentraciones de T3 y T4 entre los grupos 1 y 2; así mismo existió marcada diferencia entre animales más jóvenes (0-30 días) y mayores (grupos 3 y 4), los valores de las hormonas descendieron gradualmente y se estabilizaron a medida que la edad aumentaba, lo cual evidencia cambios metabólicos relacionados con el crecimiento y los procesos de manejo nutricional en la transición de monogástrico a rumiante (Rowntree *et al.*, 2004).

Kühne *et al.* (2000), al comparar el efecto del suministro de calostro y la alimentación con lacto-

reemplazador, encontraron descenso progresivo de T3 y T4 en ambos grupos, sin embargo, los descensos más sensibles ocurrieron en el grupo alimentado con lacto-reemplazador, lo que atribuyeron a la presencia de factores de crecimiento en el calostro. Los valores reportados por Kühne y colaboradores (2000), de 3.7 nmol/L, estuvieron más cercanos a los encontrados para animales cuya parte de la dieta se suministró a través de leche residual y calostro en los primeros días de vida. El promedio en la concentración de T3 para los dos primeros grupos de edad fue de 3.35 mmol/L en el presente trabajo.

El modelo estadístico no mostró significancia ($p=0.286$) en la interacción grupo racial-edad, mientras que para el efecto edad fue altamente significativo ($p<0.001$).

Las altas tasas metabólicas y fisiológicas que presentan los animales recién nacidos (alta frecuencia respiratoria y cardiaca, menor tiempo de tránsito de alimento, altas necesidades energéticas) se describen como procesos adaptativos fundamentales (Randall *et al.*, 2003), en especial la regulación térmica en neonatos requiere soporte nutricional y mediación hormonal adecuada para permitir la homeostasis y el desarrollo (Morales y Rodríguez, 2005). Estas tareas fisiológicas requieren control endocrino donde la función tiroidea ejerce alto efecto, por esta razón a mayor tasa metabólica, mayor concentración de T3 en circulación. A medida que aumenta la edad del animal, las funciones vitales se regularizan y disminuyen las exigencias metabólicas y homeostáticas. En dichas fases (grupos 3 y 4) no serían necesarias altas concentraciones de reguladores metabólicos, situación que se determinó en el presente trabajo donde los valores séricos de T3 y T4 descendieron progresivamente a medida que el animal estabilizaba el metabolismo después de las primeras semanas de vida (Tabla 1).

Rowntree *et al.* (2004) muestran la secuencia más clara del descenso en las concentraciones de T3 en las primeras seis semanas de vida, dichos autores encontraron valores de 6.29 nmol/L al nacimiento y 2.25 nmol/L en la semana 6. La drástica reducción solo puede deberse a los ajustes metabólicos compensados en el tiempo. La estabilización homeostática y la regulación de la absorción de nutrientes, al igual que la mejor termorregulación, permiten el ajuste endocrino regular y la disminución del control tiroideo sobre los procesos adaptativos. En la medida en que avanzó la edad de los animales y se estabilizaron las ganancias de peso, los valores de T3 y T4 ya no mostraron oscilaciones significativas.

Tabla 1. Valores medios y desviación estándar para T3 y T4 en cuatro grupos de edad en bovinos jóvenes en condiciones de trópico.

Hormonas tiroideas (nmol/L)	Grupos de edad (días)			
	0-30 n= 28	31-90 n= 30	91-150 n= 32	151-240 n= 34
T3	4.4167 ^a ± 0.41	2.3117 ^b ± 0.81	2.0952 ^b ± 0.57	2.0900 ^b ± 0.77
T4	146.137 ^a ± 21.7	56.400 ^b ± 19.9	52.424 ^b ± 18.3	52.060 ^b ± 19.8

* Filas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa (P < 0.001).

La tiroxina (T4) presentó valor elevado para el grupo 1 (recién nacidos hasta 30 días). La concentración sérica de 146.137 nmol/L fue más elevada que en otros trabajos con terneros; sin embargo, cuando se comparó con las concentraciones de tejidos fetales y en la última fase de gestación (Cassar-Malek *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 1993), los valores fueron mayores, adicionalmente el 71% de los animales que conformaron este grupo tuvieron en promedio cinco días de vida. Si bien la concentración de T3 fue elevada en esta primera fase, no llegó al doble de la concentración en edades más avanzadas (grupos 3 y 4), mientras que la concentración de T4 en el grupo 1 triplicó el valor de los grupos 3 y 4; esta concentración puede indicar alto depósito de tiroxina, la cual fisiológicamente sufre monodeiodación en diferentes tejidos para convertirse en triyodotironina (T3) (Norman y Litwack, 2002). Los valores de T3 y T4 en los grupos 3 y 4 (edades entre 91 a 240 días) fueron similares a los valores encontrados para animales adultos (Kaneko *et al.*, 1997; Matamoros *et al.*, 2002).

En el estudio el efecto racial mostró significancia estadística (p<0.001). Si bien algunos trabajos han mostrado que los bovinos provenientes de líneas *B. indicus* presentan concentraciones de hormonas tiroideas inferiores a los grupos *B. taurus* (Thrift *et al.*, 1999), en terneros este comportamiento también se evidenció, es posible que la fase de crecimiento y el efecto de estar en amamantamiento no permitiera la expresión única de la regulación tiroidea por parte del neonato, ya que la leche contiene yodo y hormonas tiroideas en proporciones relativas a la cantidad de sólidos totales

(Walstra y Jennes, 1986). Los mecanismos adaptativos para la compensación de la regulación de la temperatura en cebuinos pueden generar menor dependencia del control termogénico de las hormonas tiroideas (Thrift *et al.*, 1999). Se han encontrado diferencias en las concentraciones de T3 y T4 en animales *B. taurus* sometidos a diferentes condiciones medioambientales (Campos & Rodas, 1999) y en animales de diversa composición racial en condiciones semejantes a las del presente estudio (Campos, 1995), similares valores se aprecian en grupos raciales nativos colombianos, considerados como adaptados a condiciones semejantes a las del presente estudio (Campos *et al.*, 2004). De los grupos raciales analizados en el trabajo, Holstein presentó los mayores valores en los parámetros endocrinos tiroideos, observación que permite probar que los mecanismos fisiológicos de control de temperatura y adaptación al medio son diferentes para esta raza. Así mismo, es posible mayor influencia de la dieta, dado que este grupo se mantuvo en condiciones de cría artificial. Los restantes grupos raciales de alguna manera compensaron por adaptación los mecanismos homeostáticos. Posiblemente los altos valores de T3 (2.40 nmol/L) y de T4 (52.22 nmol/L) en Hartón del Valle tenga que ver con las extremas condiciones de manejo para este núcleo durante el período experimental. Las concentraciones de hormonas tiroideas en el grupo mestizo fueron las más bajas (Tabla 2), evidencia que pone de manifiesto el vigor híbrido y las ventajas adaptativas que la fusión racial de líneas *B. taurus* y *B. indicus* presenta para la producción bovina en condiciones de trópico.

Tabla 2. Valores medios y desviación estándar para T3 y T4 en animales en crecimiento pertenecientes a cinco grupos raciales bovinos en condiciones de trópico.

Hormonas tiroideas (nmol/L)	Holstein n = 34	Brahman n = 32	Hartón n = 31	Lucerna n = 32	Mestizo n = 33
T3	2.69 ^a ± 0.92	2.11 ^{b,c} ± 0.66	2.40 ^{a,b} ± 0.73	1.87 ^c ± 0.83	1.79 ^c ± 0.61
T4	77.34 ^a ± 32.7	44.74 ^b ± 15.5	52.22 ^b ± 17.8	46.34 ^b ± 19.5	66.43 ^a ± 25.2

• Filas con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa (P < 0.001).

La correlación entre T3 y T4 (0.53; $P < 0.001$) se consideró como media, mientras que en otros trabajos se encontraron correlaciones más elevadas (Morais y Pérez, 1988; Matamoros *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2004). Es posible que la correlación se deba a los elevados valores de T4 y a las bajas tasas de deiodación en las primeras cuatro semanas de vida. Takahashi *et al.* (2001) propusieron alternativas de análisis basadas en la relación T4:T3, como una probabilidad de lograr mayor veracidad biológica al momento de la determinación de algunas situaciones específicas de la glándula mamaria. Esta observación se debe tener en cuenta en los análisis del comportamiento tiroideo en terneros, como en el presente estudio, donde la correlación no mostró el alto valor informado en trabajos con animales adultos, probablemente por la alteración de las concentraciones de las hormonas tiroideas en los neonatos producto del efecto racial y del tipo de dieta, en la cual la presencia de leche materna pudo influir en la concentración de T3 y T4.

CONCLUSIONES

Se encontró diferencia estadística en los valores de hormonas tiroideas (T3 y T4) en los cinco grupos raciales estudiados.

La interacción entre los grupos raciales y el grupo etáreo no mostró significancia, por el contrario, la edad fue el factor que más afectó la concentración sérica de T3 y T4 en animales en crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Campos, R.; González, F.H.D.; Rodas, A.; Cruz, C. 2004. Thyroid hormones in native Colombian bovine breeds. *Rev Bras Ci Vet* 11 (3):174-177
- Campos, R.; Rodas, A. 1999. Triiodotironina (T3), Tiroxina (T4) y Colesterol (CHO) en cuatro grupos de bovinos Holstein ubicados en sistemas de producción en trópico alto y bajo. *Acta Agron (Palmira)* 49 (1/2):67-71
- Campos, R. 1995. Triiodotironina, tiroxina y comportamiento reproductivo en diferentes grupos raciales bovinos. *Acta Agron (Palmira)* 45 (2/4):140-145
- Campos, R.; Díaz, F.; Wilches, M. 1993. Hormonas tiroideas durante la gestación: niveles séricos en la madre y en el feto. *Acta Agron (Palmira)* 43 (1/4): 156-159
- Cassar-Malek, I.; Picard, S.; Kahl, B.; Hocquette, J.F. 2006. Relationships between thyroid status, tissue oxidative metabolism, and muscle differentiation in bovine fetuses. *Dom Anim Endocrinol* In press
- Davis, C.L.; Drackley, J.K. 1998. The development, nutrition, and management of the young calf. Ames: Iowa State University Press, 339p.
- Gerrits, W. J. J.; Decuyper, Eddy; Verstegen M. W. A.; Carabinas, V. 1998. Effect of Protein and Protein-Free Energy Intake on Plasma Concentrations of Insulin-Like Growth Factor I and Thyroid Hormones in Preruminant Calves. *J Anim Sci* 76: 1356-1363
- Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. 1997. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego: Academic Press, 932p.
- Kühne, S.; Hammon, H. M.; Bruckmaier, R. M. R.; Morel, R.; Zbinden, Y.; Blue, J. W. 2000. Growth performance, metabolic and endocrine traits, and absorptive capacity in neonatal calves fed either colostrum or milk replacer at two levels. *J Anim Sci* 78: 609-620
- Matamoros, R.; Gómez, C.; Andaur, T.M. 2002. Hormonas de utilidad diagnóstica en Medicina Veterinaria. *Arch Med Vet* 34 (2): 167-182
- Morais, M.; Pérez, H. 1988. Niveles de tiroxina y triiodotironina en vacas Holstein antes y después del parto y en sus crías. *Rev Salud Animal* 10: 323-327
- Morales, C. A.; Rodríguez, N. 2005. Hormonas tiroideas en la reproducción y en la producción láctea del ganado lechero: revisión de literatura. *Rev Col Cienc Pec* 18 (2): 136-148
- Norman, A.W.; Litwack, G. 2002. Hormones. 2nd ed. San Diego: Academic Press, p.169-191
- Randall, D.; Burggren, W.; French, K. 2003. Fisiología Animal de Eckert. Mecanismos e adaptações. 5ta ed. Ed. Guanabara-Koogan, 729p.
- Rowntree, J. E.; Hill, G. M.; Hawkins, D. R.; Link, J. E.; Rincker, M. J.; Bednar, G. W.; Kreft, Jr. R. A. 2004. Effect of Se on selenoprotein activity and thyroid hormone metabolism in beef and dairy cows and calves. *J Anim Sci* 82: 2995-3005
- Rudas, P.; Rónai, Zs.; Bartha, T. 2005. Thyroid hormone metabolism in the brain of domestic animals. *Dom Anim Endocrinol* 29:88-96
- SAS Institute. 2005. SAS® User's Guide: Statistics. Cary, NC: SAS Institute. 355p
- Spicer, L.J.; Alonso, J.; Chamberlain, C.S. 2001. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. *J Dairy Sci* 84: 1069-1076
- Takahashi, K.; Takahashi, E.; Ducusin, R.J.; Tanabe, S.; Uzuka, Y. et al. 2001. Changes in serum thyroid hormone levels in newborn calves as a diagnostic index of goiter. *J Vet Med Sci* 62: 175-178
- Thrift, T. A.; Bernal, A.; Lewis, A. W.; Neuendorff, D. A.; Willard, C. C.; Randel, R. D. 1999. Effects of Induced Hypothyroidism or Hyperthyroidism on Growth and Reproductive Performance of Brahman Heifers. *J Anim Sci* 77: 1833-1843
- Torres de Campos, A.; Ávila, M de J.; Verneque, R da S.; Campos, A.T.; Santos, D. 2001. Pronóstico de declínio na produção de leite em função do clima para a região de Goiânia. p.11-13. In: Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38. Anais
- Wastra P.; Jenness R. 1986. Química y Física Lactológica. Zaragoza: Acribia, 486p.