

---

## BIOMARCADORES DE ESTRÉS COMO INDICADORES DE BIENESTAR ANIMAL EN GANADO DE CARNE

Marlyn Hellen Romero Peñuela<sup>1</sup>  
Luis Fernando Uribe-Velásquez<sup>1</sup>  
Jorge Alberto Sánchez Valencia<sup>1</sup>

### RESUMEN

La presente revisión presenta los cambios fisiológicos que presentan los bovinos durante el estrés agudo, así como los biomarcadores sanguíneos utilizados para medir su impacto en el bienestar animal. Durante el presacrificio, el ganado es expuesto con frecuencia a diferentes factores que causan agotamiento físico y estrés fisiológico, los cuales pueden tener efectos adversos para la salud, el bienestar animal y la calidad de la carne. Los más comunes factores son: velocidad y movimientos bruscos del camión, ruido, fuerza centrífuga, ruptura de la estructura social debido a la mezcla de animales, ambiente extraño, manejo rudo de los bovinos durante el cargue y descargue, condiciones climáticas, privación de alimento y agua, entre otros. El estrés ha sido utilizado como un indicador de bienestar animal. Este altera la homeostasis interna de los animales induciendo cambios en la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-adrenocortical (HPA) y el sistema simpático-adreno-medular. La activación endocrina promueve la liberación de varias hormonas: catecolaminas, especialmente adrenalina y noradrenalina; hormona liberadora de corticotropina (CRH); hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y corticosteroides, principalmente cortisol. Diferentes autores han utilizado distintos constituyentes sanguíneos para determinar el estrés. El cortisol, a pesar de su variabilidad y vida corta, sigue siendo

uno de los indicadores más usados. Estos autores también han usado el volumen celular acumulado (VGA), la concentración de glucosa, la actividad de la enzima creatinfosfoquinasa (CK), las concentraciones de  $\beta$ -hidroxibutirato y lactato, como indicadores de estrés. La determinación de estos biomarcadores es un método práctico para monitorear el bienestar animal en ganado bovino de carne.

**Palabras clave:** catecolaminas, cortisol, fisiología del estrés, presacrificio.

### STRESS BIOMARKERS AS INDICATORS OF ANIMAL WELFARE IN CATTLE BEEF FARMING

#### ABSTRACT

The present review presents the physiological changes that occur in cattle during acute stress, as well as blood biomarkers used to measure their impact on animal welfare. During the pre-slaughter process, cattle are often exposed to different factors that cause physical exhaustion and physiological stress which can have adverse effects on health, animal welfare, and meat quality. The most common stressors are: fast and forced movements of the truck, centrifuged force, breakdown of the social structure due to mixing of the animals, strange environment,

---

<sup>1</sup> Profesores Departamento Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10, Manizales. Tele-fax: 8781516. E-mail: marlyn.romero@ucaldas.edu.co, lfuribe@ucaldas.edu.co, jorge.sanchez@ucaldas.edu.co

rough treatment of cattle during loading and unloading, weather conditions, deprivation of feed and water among others. Stress has been identified as an indicator of animal welfare. Stress alters the internal animal homeostasis inducing changes in the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis and the sympatho-adreno-medullary system. The endocrine activation promotes the release of several hormones: catecholamines, mainly adrenaline and noradrenaline; corticotrophin-releasing hormone (CRH); adrenocorticotrophin (ACTH) and corticosteroids, mainly cortisol. Different

authors have used several blood constituents to determine stress. Cortisol, despite its variability and short life, is still one of the most used indicators of stress. These authors have also used the packed cell volume (PCV), glucose concentration, creatine phosphokinase (CK) activity,  $\beta$ -hidroxybutyrate and lactate concentration as stress indicators. The determination of these biomarkers is a practical method to monitor animal welfare in cattle beef.

**Key words:** catecholamines, cortisol, stress physiology, preslaughter.

## INTRODUCCIÓN

Las actividades previas al sacrificio incluyen las prácticas y condiciones aplicadas al bovino durante el período comprendido entre la movilización y el transporte, desde la granja hasta su ingreso al cajón de insensibilización en la planta de sacrificio (1). Durante este período los animales son sometidos a factores desencadenantes de estrés que incluyen: a) incremento del manejo, recolección y arreo con elementos punzantes o con tábano eléctrico; b) mezcla de bovinos de diferente procedencia y contacto con personal extraño; c) transporte y desafíos físicos como rampas, superficies resbaladizas, densidad de carga, movimiento, ruido y vibración del vehículo; d) contacto con ambientes nuevos y no familiares; e) privación de alimento y agua; f) cambios en la estructura social; g) cambios en las condiciones climáticas como temperatura, radiación y humedad; h) imposibilidad de descanso; i) métodos inapropiados durante el sacrificio (insensibilización y sangría), entre otros aspectos (2, 3, 4, 5). Estos factores desencadenan reacciones inevitables en el ganado que se traducen en estrés físico, fisiológico y psicológico (6, 7) afectando el bienestar animal (BA). El primero se genera por el esfuerzo físico de los bovinos durante el arreo, el cargue y descargue del

camión, así como el intento para mantenerse en pie durante el movimiento del vehículo. El estrés fisiológico puede ser medido en términos de cambios de la homeostasis del animal, por la privación de alimento y agua, la capacidad de utilizar sus reservas en el mantenimiento de la temperatura corporal y actividad física, o para superar alguna lesión o enfermedad. El psicológico, es el percibido por la conciencia animal, siendo por lo tanto difícil de medir (8, 9).

La alteración del BA producido por un desafío ambiental, puede ser evaluado en dos niveles: en primer lugar, la magnitud de las respuestas fisiológicas y de comportamiento y, en segundo lugar, el costo biológico de estas respuestas (10, 11). La medición objetiva del BA es un proceso complejo, siendo necesario combinar indicadores fisiológicos, productivos y etológicos relacionados con la presencia de estrés. Las variables fisiológicas pueden ayudar a entender el costo biológico de la adaptación de los bovinos a los procesos del manejo previo en la finca, durante el transporte, descargue, permanencia en el frigorífico y durante el sacrificio (insensibilización y sangría) (6, 12). Así mismo, la identificación de biomarcadores de la condición fisiológica o de la predisposición a la enfermedad en los animales, puede aumentar la habilidad de los médicos veterinarios para

prevenir brotes de afecciones como la fiebre de embarque, en bovinos de reemplazo que ingresen al hato y que han sido expuestos al estrés del transporte (4, 13). El objetivo de la presente revisión consiste en describir los cambios fisiológicos que presentan los bovinos durante el estrés agudo, los biomarcadores sanguíneos utilizados para medir su impacto en el bienestar animal y la relación de los biomarcadores con la calidad de carne bovina (BA).

### Estrés y bienestar animal

El concepto de BA está basado en la relación armoniosa del animal con el medio. En esta relación, entran a jugar un papel importante su estado físico y psicológico, así como la capacidad de entrar en funcionamiento los sistemas de reparación del cuerpo, las defensas inmunológicas, la respuesta al estrés fisiológico y a una variedad de respuestas de comportamiento (10, 14). Se han descrito como condiciones básicas que aseguran el BA, cinco componentes que se han denominado “las cinco libertades”: a) libre de hambre, sed o un nivel de nutrición insuficiente; b) no presentar dolor, heridas o enfermedad; c) libre de temor o angustia; d) no presentar incomodidad; e) libre de manifestar un comportamiento natural; las cuales deben regir el BA (15). El concepto de calidad de vida de los bovinos no solo incluye la ausencia de sufrimiento, sino también la calidad de las relaciones de estos con el ambiente de manera que puedan satisfacer sus necesidades preferenciales (16, 17).

El estrés ha sido utilizado como indicador de la pérdida de BA (18), y es definido como la acción de estímulos nerviosos y emocionales provocados por el ambiente sobre los sistemas nervioso, endocrino, circulatorio y digestivo de un animal, produciendo cambios medibles en los niveles funcionales de estos sistemas, en especial, altera la homeostasis interna induciendo cambios en la actividad del sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenocortical-

HPA (14). Se ha denominado “diestrés”, cuando la repuesta del animal al factor estresante provoca riesgos a su bienestar y su vida (19). De acuerdo con la duración y sus efectos, el estrés puede ser agudo (transitorio) o crónico (de largo efecto). En cualquier caso, una vez que el sistema nervioso central percibe una amenaza, se desarrolla una respuesta que consiste en una combinación de las cuatro respuestas generales de defensa biológica: comportamiento, sistema nervioso autónomo, inmune y neuroendocrino. A pesar de que los cuatro sistemas biológicos de defensa están disponibles para que el animal responda a un factor estresante, no todos los cuatro son necesariamente utilizados contra todos los factores de estrés. En particular, la homeostasis se mantiene cuando solo los dos primeros mecanismos están involucrados; por el contrario, cuando los cuatro mecanismos de defensa han sido implicados, algunas de las funciones biológicas pueden verse modificadas adversamente y los animales estarán en peligro (20).

Dentro de la respuesta neuroendocrina tienen vital importancia los sistemas simpático/suprarrenal (SS) y el HPA, donde la activación de cualquiera de los dos depende del factor estresante que está produciendo el estímulo (8, 21). En la activación del primero, denominado “síndrome de emergencia”, el organismo se prepara para hacer frente a peligros súbitos generando una respuesta de carácter rápida y breve, que conlleva a la activación neuronal del hipotálamo y la liberación de adrenalina desde la médula adrenal, así como noradrenalina de las fibras nerviosas del locus coeruleus (LUC-NE), región localizada en el tronco cerebral. Estas catecolaminas son las encargadas de poner al animal en estado de alerta, preparándolo para luchar o huir, provocando un aumento de la frecuencia cardíaca, vasoconstricción periférica, aumento de la glicemia, dilatación pupilar, hiperventilación y aumento del volumen sanguíneo (22). En el eje HPA, los centros cognitivos del cerebro como la corteza cerebral, al percibir amenazas externas inician los

mecanismos de respuesta vía señales nerviosas que activan la liberación del factor liberador de corticotropina (CRH) y la vasopresina, especialmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo (23). La CRH es liberada por terminales de axones que se proyectan hacia la región de la eminencia media, y es transportada por el sistema sanguíneo portal hipofisiario hacia la hipófisis anterior estimulando la liberación de la hormona adenocorticotrópica (ACTH), la cual es liberada al torrente sanguíneo para estimular la síntesis y secreción de glucocorticoides (GC), especialmente cortisol desde la corteza adrenal, cuya secreción es pulsátil, con una periodicidad de 90 minutos (19). Simultáneamente, se estimula la liberación de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) desde la médula adrenal, así como hormonas tiroideas (20, 23). Por su parte, el cortisol aumenta la disponibilidad de energía y las concentraciones de glucosa en la sangre, porque estimula la proteólisis, lipólisis, la

gluconeogénesis en el hígado aumentando la síntesis de enzimas implicadas en la conversión de aminoácidos, glicerol y lactato en glucosa, aumentando la movilización de los aminoácidos desde el músculo (24). También disminuye el transporte de glucosa y su utilización por las células, produciendo una elevación de la concentración de glucosa sanguínea hasta un 50% sobre el nivel normal (véase la Figura 1) (20, 22). En esta compleja respuesta fisiológica se presenta un proceso de retroalimentación negativa, permitiendo que el cortisol actúe sobre el hipotálamo y la hipófisis disminuyendo la producción de CRH y ACTH (22). En esta etapa el organismo intenta adaptarse o afrontar la presencia de los factores que percibe como amenaza, en donde se presenta una normalización de los niveles de corticosteroides y, por ende, la desaparición del estado de estrés, etapa que se ha denominado “de resistencia o relajación” (19, 25).

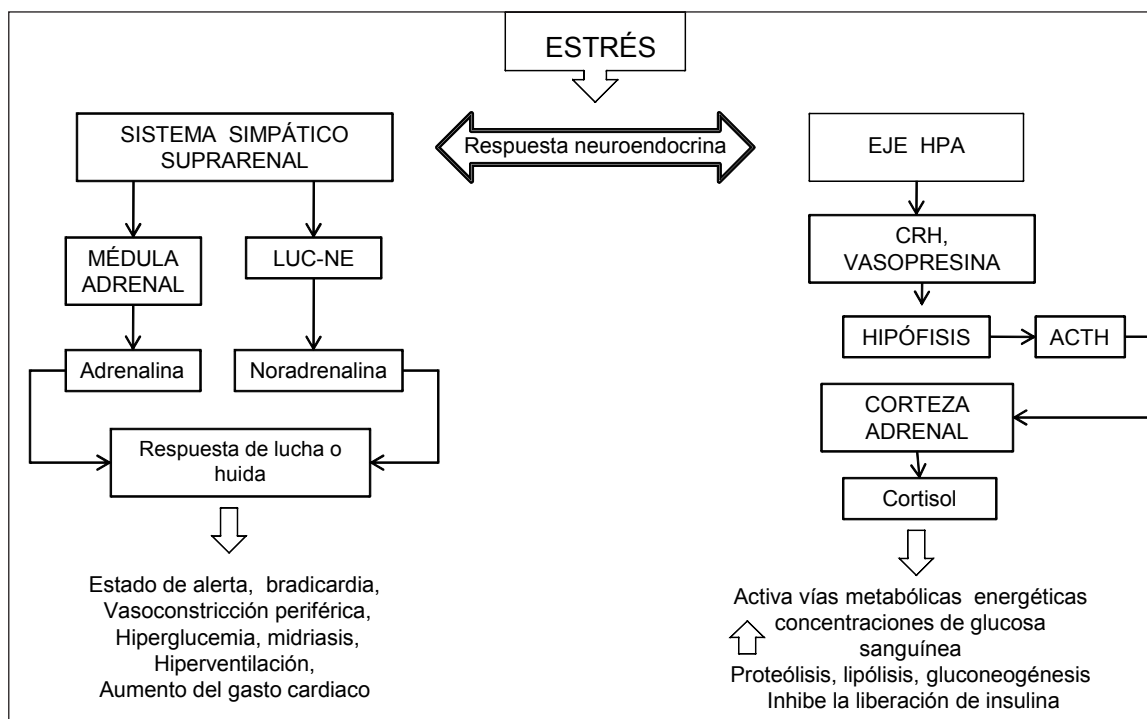


Figura 1. Esquema de la respuesta general del estrés.

El estrés crónico consiste en un estado de activación fisiológica en curso, que se presenta cuando el cuerpo experimenta estrés por varios factores o la exposición repetida a los mismos estresores agudos, etapa en la cual el sistema nervioso autónomo rara vez tiene la oportunidad de activar la respuesta de relajación. En este caso, se presenta una sobreexposición a las hormonas del estrés, que produce un costo biológico suficiente para alterar las funciones biológicas y producir diestrés. El estrés crónico coincide con un estado de larga duración en el animal, como un problema de salud grave, que no permite su recuperación satisfactoria, en donde la intensidad y duración del sufrimiento contribuye a la severidad de la respuesta del animal. Por lo tanto, el estrés crónico es una condición de mala adaptación que puede estar asociada con una reducción directa en el nivel de bienestar. Por otra parte, esta condición puede afectar la susceptibilidad a las enfermedades, o favorecer su progresión (20).

Aunque la respuesta al estrés es muy variable y dependiente de la capacidad de cada animal para responder, resulta evidente que si el agente estresante actúa por largo tiempo (transporte y ayuno prolongado), el efecto encontrado será mayor, sea alta o baja la capacidad de respuesta de cada animal. Por ello, mientras más largo son los tiempos de transporte y ayuno, mayores probabilidades existen de presentar estrés,

afectando negativamente el bienestar de los animales, aumentando las pérdidas de peso de la canal, mayor presencia de contusiones y efectos negativos en la calidad de la carne como la aparición de corte oscuro, que se caracteriza por la presentación de carnes de consistencia dura, color rojo oscuro y apariencia seca. Estas carnes por su pH alto, favorecen la proliferación de microorganismos y, por lo tanto, tienen una vida útil más corta (26).

### **Biomarcadores del estrés**

Existe una variedad de parámetros de comportamiento, fisiológicos, bioquímicos, inmunológicos y patológicos que han sido propuestos para evaluar la capacidad de respuesta de los animales ante el estrés agudo (Tabla 1). Dentro de los biomarcadores descritos sobresalen la medición de cortisol y progesterona, las concentraciones de albúmina plasmática, urea, globulina, proteínas totales, la actividad de creatinfosfoquinasa (CK),  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -OHB), haptoglobina, fibrinógeno, el volumen celular acumulado (VCP) y el conteo de leucocitos (27). Amtmann et al. (26) reportan que las variables anteriormente descritas se utilizan como indicadores de estrés, especialmente cuando se están comparando valores previos y posteriores a un determinado manejo que se cree induce estrés.

**Tabla 1.** Principales indicadores de estrés agudo en bovinos, que permiten evaluar el bienestar animal durante el transporte. Adaptado de Knowles & Warriss (28).

| Indicadores            | Índices   | Referencia             |
|------------------------|---|------------------------|
| Comportamiento         | Vocalización, agitación, lucha, dejar de avanzar, erizamiento y temblor.  | (14, 16, 18, 21, 29)   |
| Fisiológicos           | <i>Hipertermia-hipotermia:</i> incremento y variabilidad de tasa cardiaca, presión sanguínea, tasa respiratoria, transpiración, temperatura corporal.<br><br><i>Estrés fisiológico:</i> mortalidad.<br><br><i>Debilidad:</i> aumento vasopresina.<br><br><i>Marcadores de miedo/excitación:</i> aumento tasa cardiaca.  | (16, 18, 30)           |
| Desempeño              | Reducción del rendimiento de leche, interferencia con la deyección láctea.  | (22)                   |
| Medidas endocrinas     | Incremento de cortisol, oxitocina, catecolaminas (epinefrina y norepinefrina), CRH, ACTH, vasopresina, β-endorfinas.  | (30)                   |
| Marcadores bioquímicos | <i>Índices de privación de alimento:</i> incremento de Ac. Grasos no esterificados, β-hidroxibutirato, urea. Disminución de glucosa.<br><br><i>Indicadores de deshidratación y/o hemoconcentración:</i> incremento de la osmolaridad, VGA, proteína total, albúmina.<br><br><i>Índices de esfuerzo físico:</i> incremento de CK, lactato, lactato deshidrogenasa.<br><br><i>Índices de miedo/excitación y la liberación de catecolaminas:</i> aumento VGA, glucosa, urea, β-HOB.<br><br><i>Indicadores de ayuno:</i> peso vivo, β-HOB, Ac. Grasos libres, glucógeno muscular. | (8, 16, 18, 26, 31 32) |

## Cortisol

El cortisol, a pesar de su variabilidad y corta vida, es uno de los biomarcadores más utilizados para evaluar el estrés experimentado por animales, aunque el aumento de su concentración plasmática solo sería un indicador neuroendocrino primario (31). Las mediciones de los niveles de cortisol basal y de su variación después de la exposición a un factor estresante, son buenos biomarcadores para la evaluación de estrés crónico. Sin embargo, se puede encontrar aumentado en procesos de estrés agudo, mostrando variaciones antes y durante el diestrés, relacionándose con mala-adaptación, especialmente cuando se presentan fallas para restablecer la homeostasis o tras un estrés repetido (20). Las concentraciones de cortisol plasmático se aumentan cuando los animales son expuestos a condiciones adversas como el aislamiento, la restricción de movimiento, reagrupamiento y transporte, pobres condiciones de rodamiento y transporte intermitente (12). Los niveles de cortisol basal en plasma se encuentran por debajo de 10 ng/ml, pero se ha descrito que fluctúa en un rango entre 0 y 20 ng/ml (19). La interpretación de los niveles basales de cortisol se dificulta porque se afecta por múltiples factores, incluyendo los siguientes: el ritmo circadiano (concentraciones aumentadas en la mañana y baja en la tarde), aunque estudios recientes han indicado que el ritmo circadiano en bovinos es débil; otros factores como el muestreo, la restricción de movimiento, la lactancia, el coito, el ordeño, el grado de habituación, otras hormonas (p.e. la vasopresina puede potenciar la secreción de ACTH) y las infecciones, así como las endotoxinas (20, 25, 33). Es bien conocido que el ganado muestra bajos niveles de cortisol después de la exposición repetida a un factor estresante, y la habituación a este depende del tipo de estresor, su intensidad, la duración y experiencias previas individuales; por esta razón, no todos los individuos responden de la misma forma ante cambios ambientales (10, 34). Teniendo en cuenta estas dificultades, en especial cuando el análisis de cortisol se realiza en sangre, se han propuesto diferentes muestras biológicas para su análisis como heces, orina y saliva; sin

embargo, su interpretación se puede dificultar porque los niveles de cortisol en estos materiales pueden ser más bajos que en sangre (p.e. cerca de 10 veces menos en saliva), la hormona puede ser conjugada antes de la excreción (p.e. en orina y heces), o puede ser transformada por bacterias en el intestino. Sin embargo, se ha considerado promisorio la evaluación de cortisol en heces acompañadas de otros biomarcadores fisiológicos y de comportamiento, porque proporciona una medición integrada de la producción de hormonas durante un período de tiempo prolongado (35, 36). La medición del cortisol es dependiente del tiempo porque requiere entre 10 y 20 minutos para alcanzar valores máximos y tiene una vida media de 60 minutos, eliminándose principalmente por el hígado (27, 37, 38). En la Tabla 2 se presentan algunas ventajas y desventajas de los métodos para medir cortisol en los bovinos.

Se ha sugerido que las manifestaciones conductuales de los animales ante un agente estresor están íntimamente asociadas con el incremento de cortisol, debido a que sus receptores se encuentran localizados en regiones específicamente involucradas con la regulación hormonal (hipotálamo e hipófisis) y particularmente con el sistema límbico, que juega un papel relevante en las conductas emocionales, por lo tanto, las concentraciones plasmáticas de cortisol, en combinación con las mediciones de glucosa y CK, han sido usadas como un confiable indicador de estrés físico agudo y estrés emocional; este último, causado por el ruido durante el cargue y descargue, vibración del vehículo durante el transporte del ganado y cambios en la estructura social (40).

Debido a la alta variabilidad de los niveles plasmáticos de cortisol, no se recomendaría hacer comparaciones absolutas entre los diferentes estudios que evalúan las condiciones de estrés previas al sacrificio de bovinos de abasto público, requiriéndose para tal efecto, la medición de los niveles basales para realizar comparaciones antes y después del evento a evaluar (transporte, estadía en planta, sacrificio, entre otros).

**Tabla 2.** Ventajas y desventajas de medir cortisol o sus metabolitos en los fluidos más usuales para su evaluación (31, 35, 39).

| <b>Muestras</b> | <b>Ventajas</b>   | <b>Desventajas</b>  |
|-----------------|---|---|
| Sangre          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Muestra más usada en estudios de BA.</li> <li>- El nivel sérico de cortisol aumenta en minutos y permanece elevado durante horas.</li> <li>- Medición directa del cortisol.</li> <li>- Permite hacer la medición de otros biomarcadores de estrés que se evalúan en suero o plasma.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Invasivo.</li> <li>- Sus niveles son influenciados por el manejo, la restricción y manipulación.</li> <li>- Se puede presentar una disminución de las concentraciones sanguíneas porque los animales se tornan refractarios al estímulo estresante.</li> </ul>   |
| Saliva          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- No invasivo.</li> <li>- El cortisol presente en forma libre y no unido a proteína.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentración menor al 10% del valor en sangre.</li> <li>- Problemas de contaminación con alimento o fluido ruminal durante la recolección de la muestra.</li> <li>- Manipulación excesiva.</li> <li>- Baja sensibilidad y especificidad de la técnica.</li> <li>- Posibles lesiones bucales durante la recolección de la saliva (ovinos y caprinos).</li> </ul>   |
| Leche           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- No invasivo.</li> <li>- Medición directa.</li> <li>- Útil en ganado lechero.</li> <li>- Se correlaciona altamente con las concentraciones plasmáticas.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Manipulación de los animales.</li> <li>- Las condiciones climáticas pueden afectar la secreción.</li> <li>- Concentración menor al (4 y 10%) del valor en plasma.</li> </ul>   |
| Orina           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- No invasivo.</li> <li>- Se puede medir por radioinmunoanálisis (RIA) o por cromatografía líquida con UV.</li> <li>- Permite medir catecolaminas y sus metabolitos.</li> <li>- Mayor uso en porcinos y ovinos.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Niveles de cortisol muy bajos.</li> <li>- La hormona es conjugada antes de la secreción.</li> <li>- En bovinos y equinos se dificulta la obtención de la muestra.</li> <li>- Se presenta un retraso entre la liberación de cortisol y su excreción.</li> <li>- La muestra debe ser recogida a lo largo del día.</li> </ul>   |
| Heces           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- No invasivo.</li> <li>- Útil para la medición de estrés en animales silvestres.</li> <li>- Se puede medir por la técnica ELISA.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Se presenta un retraso entre la liberación de cortisol y su excreción.</li> <li>- La muestra debe ser recogida a lo largo del día.</li> <li>- Tener en cuenta el volumen de las heces para el muestreo y el tránsito intestinal.</li> <li>- Las concentraciones presentan fluctuaciones diurnas.</li> <li>- Validar la técnica según la especie y el sexo.</li> <li>- Congelar la muestra a -20°C inmediatamente después de obtenerla hasta su procesamiento.</li> </ul> |



### El volumen celular acumulado (VGA)

El VGA o hematocrito es el porcentaje del volumen sanguíneo ocupado por células, principalmente eritrocitos; el excedente está conformado por fluido y la diferencia permite tener una aproximación del volumen plasmático. El VGA permite evaluar la alteración de electrolitos y fluidos, siendo considerado como un indicador moderadamente bueno de estrés (41). El transporte, el ayuno y la baja ingesta de agua producen un aumento del VGA, teniendo en cuenta que el valor promedio para bovinos es de 28 a 38% (28). La principal función del bazo de los mamíferos es almacenar glóbulos rojos, los cuales son fácilmente liberados en respuesta a una excitación o factor estresante (42). El aumento de VGA durante el ayuno se puede deber al movimiento de fluidos fuera del compartimiento vascular y a la contracción esplénica durante el estrés, inducida por actividad nerviosa simpática o por catecolaminas circulantes (28, 31). Se ha descrito como valioso el uso de la proteína total y de albúmina plasmáticas en relación con el VGA cuando se desea evaluar los niveles de hidratación. Se supone que la cantidad de proteína total presente en el plasma sigue siendo la misma, por lo tanto, las proteínas totales y albúmina plasmáticas deben mostrar el mismo tipo de cambio, si este se debe a la deshidratación y no a un efecto de la dieta. Se ha reportado también que cuando el estrés es crónico el VGA puede estar disminuido (43). Es necesario tener en cuenta que este parámetro se puede aumentar durante la sangría por contracción esplénica, debido a la acción de las catecolaminas secretadas en ese momento (35).

### Indicadores de ayuno

El peso vivo, el  $\beta$ -hidroxibutirato, los ácidos grasos libres y el glucógeno muscular son indicadores de ayuno (44). Una vez el bovino es privado de alimento y agua, recurre a sus reservas de energía, que se encuentran principalmente en forma de lípidos, especialmente triacilglicerol o triglicéridos,

a partir de los cuales se obtienen glicerol y ácidos grasos libres o no-esterificados; estos últimos son transportados unidos a proteínas a la sangre. Los triglicéridos son sintetizados principalmente en el hígado, tejido adiposo e intestino delgado. Si la cantidad de grasa movilizada excede la capacidad de oxidación del hígado se produce un incremento de los cuerpos cetónicos como el  $\beta$ -OHB, acetona y acetato, que son el producto del metabolismo energético de los bovinos. Estos cuerpos cetónicos funcionan como sustitutos energéticos aportando un 60 a 80% de la energía de la dieta de los rumiantes (28, 31). Durante el ejercicio la glucosa, los cuerpos cetónicos y los ácidos grasos libres son usados totalmente. Después de este proceso, la oxidación de cetona muscular se reduce y se aumentan los niveles de ácidos grasos libres y  $\beta$ -OHB hasta seis veces por encima de los valores previos al ejercicio, sin embargo, unos minutos inmediatamente después del ejercicio intenso estos valores pueden disminuir momentáneamente como un ajuste metabólico. Los valores promedio de la concentración de  $\beta$ -OHB en sangre bovina son de 0,02 a 0,46 mmol/L. Cuando estos niveles basales aumentan, los bovinos tardan entre uno a dos días para alcanzar nuevamente su valor normal (28). El  $\beta$ -OHB no es un buen indicador de estrés agudo. Así mismo, se ha indicado que durante las primeras 24 h de transporte el  $\beta$ -OHB puede disminuir, debido a la utilización del "pool" circulante aportado por el rumen. Las concentraciones plasmáticas de este cuerpo cetónico se pueden ver afectadas por la variabilidad animal y la alimentación previa recibida por los bovinos antes del sacrificio (en la finca), motivo por el cual se pueden encontrar valores contradictorios de este indicador en diferentes investigaciones que lo han evaluado (41).

### Glucosa

Debido a la acción de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) liberadas desde las glándulas adrenales hacia la circulación sanguínea durante la respuesta inicial al estrés,

se incrementa la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea, y se estimula la gluconeogénesis hepática, lo cual incrementa la disponibilidad de glucosa plasmática (glicemia) en minutos. Este proceso también es producido por el cortisol y por hormonas específicas que participan en la regulación de la glucosa, como el glucagón y la insulina (42). Dentro de la respuesta al estrés los niveles de cortisol activan la glicólisis hepática, la gluconeogénesis e incremento del catabolismo de las proteínas libres (28, 31). Por lo anterior, se ha descrito que la concentración de glucosa es un buen indicador indirecto de estrés (31). La concentración de glucosa sanguínea en bovinos es de 3,0 a 4,4 mmol/L (28). Se ha descrito, que cuando los bovinos son transportados bajo condiciones climáticas de baja temperatura, se puede presentar un incremento de la concentración plasmática de glucosa debido al frío y no a las condiciones de manejo previas al sacrificio (4).

### **Creatín fosfoquinasa (CK)**

Esta enzima muscular cataliza la reacción para obtener adenosín trifosfato (ATP) a partir del adenosín difosfato (ADP) más el fosfato de creatinina en la mitocondria (28, 37). El transporte prolongado es un factor extenuante; los bovinos tienen que mantener el balance y el contacto entre bovinos produce fatiga y contusiones, que afectan la permeabilidad de la membrana celular y la liberación de CK hacia el torrente sanguíneo. De igual forma, los niveles basales de CK se pueden aumentar debido al ayuno y al ejercicio, siendo mayor el incremento durante la insensibilización y sangría (44, 45). La enzima es ampliamente evaluada porque es órgano-específica, es decir, permite identificar el tejido que la está produciendo, debido a que presenta cuatro isoformas diferentes (28, 40). Los valores de referencia de CK para el bovino son de 35-280 U/L (46).

### **Lactato**

Independientemente del tiempo de transporte y de permanencia en la planta de sacrificio, el

lactato es considerado un indicador de estrés, relacionado especialmente con las condiciones de manejo de los animales, especialmente de ejercicio físico (47). Una vez el músculo esquelético entra en estado de hipoxia durante el ejercicio o la fatiga, se activa la vía anaerobia de la glicólisis interrumpiéndose la entrada del piruvato al ciclo de Krebs para la obtención de ATP; se desvía hacia la formación de lactato o ácido láctico que satura el ciclo de Cori, produciendo unos ácidos de origen metabólico dentro de la fibra muscular, siendo liberado desde las células musculares a la circulación sanguínea. Por lo anterior, la concentración plasmática de lactato es utilizada como indicador de actividad física, agotamiento y daño muscular durante el presacrificio (47, 48). Se ha demostrado que el manejo y transporte presacrificio de los bovinos, causa incrementos significativos en las concentraciones plasmáticas o séricas del lactato, siendo mayor su recuento durante la sangría, debido quizás, a aumentos en los niveles de catecolaminas (31). Los valores promedio de lactato plasmático se encuentran en el rango de 0,6-2,2 mmol/L. El lactato es un indicador de estrés agudo, durante el cual sus concentraciones plasmáticas aumentan debido a la liberación de catecolaminas que pueden inducir una rápida glicólisis y su excesiva producción. Generalmente, la concentración de lactato durante el sacrificio no es un predictor de la aparición de corte oscuro (DFD), porque esta condición de calidad es una consecuencia del estrés crónico desde la granja hasta la planta (49).

### **Catecolaminas**

Las catecolaminas son un grupo de sustancias que incluyen la adrenalina (epinefrina), noradrenalina (norepinefrina) y la dopamina, las cuales son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina. Durante el estrés agudo se produce su liberación como resultado del miedo y excitación de los bovinos (49). Las catecolaminas pueden ser producidas en la médula de la glándula adrenal ejerciendo una función hormonal, o en las terminaciones nerviosas,

por lo que se consideran neurotransmisores. Durante situaciones de estrés, la adrenalina y noradrenalina son liberadas rápidamente (uno o dos segundos después de la percepción del estímulo) y tienen una vida media corta (minutos) cuando circulan en la sangre, motivo por el cual sus concentraciones plasmáticas son una medida de BA durante procesos de estrés agudo, pero solo cuando las muestras pueden ser tomadas inmediatamente (43). La adrenalina generalmente refleja estrés fisiológico, mientras que la noradrenalina está relacionada con actividad física del ganado (28). Se ha establecido que estas dos hormonas tienen un valor limitado para evaluar el estrés producido por el sacrificio (insensibilización y sangría), porque durante la insensibilización eléctrica o con perno cautivo, los animales liberan de forma masiva estas sustancias, que pueden causar además la elevación de la concentración sanguínea de glucosa (50).

### **Urea**

Los niveles de urea se incrementan como respuesta al estrés, ya que se aumenta el catabolismo proteico y los grupos amino desechados por este proceso son transformados en urea por el hepatocito, para ser eliminados posteriormente por filtración glomerular y excretados por medio de la orina. La concentración plasmática de urea es indicadora de privación de alimento (48).

### **Hemograma: relación neutrófilos/linfocitos**

Existe una estrecha relación entre el perfil de leucocitos y el nivel de glucocorticoides plasmáticos durante el estrés fisiológico (8). Estas hormonas pueden actuar incrementando el número y el porcentaje de neutrófilos (neutrofilia), mientras que decrecen los linfocitos (linfopenia o linfocitopenia) (33). Teniendo en cuenta que el número de estos leucocitos son afectados por el estrés en direcciones opuestas, los investigadores usan la relación neutrófilos/linfocitos como una medida complementaria de la respuesta al estrés, siendo relacionado

con la magnitud del estresor y con la concentración de glucocorticoides circulantes (16, 51). Los neutrófilos son fagocitos primarios que proliferan en la circulación como respuesta a infecciones, inflamaciones y al estrés. Por otra parte, los linfocitos tienen una variedad de funciones inmunológicas, como la producción de inmunoglobulinas y la modulación de la respuesta inmune (27, 51). La proporción de cada tipo de células blancas (neutrófilos, basófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos), usualmente obtenida al observar al microscopio de luz extendidos de sangre teñidos es lo que se denomina "perfil de leucocitos" o "hemograma" (51). Como respuesta al incremento de los glucocorticoides durante el estrés, los linfocitos circulantes se adhieren a las células endoteliales que cubren las paredes de los vasos sanguíneos y, posteriormente, pasan de la circulación a otros tejidos como los ganglios linfáticos, médula ósea, bazo y piel, donde son secuestrados, produciendo por lo tanto una reducción del número de linfocitos circulantes (linfopenia). Así mismo, los glucocorticoides estimulan el flujo de neutrófilos desde la médula ósea hacia la sangre y atenúan el paso de estos hacia otros compartimentos, generando neutrofilia, que consiste en un incremento de los neutrófilos maduros e inmaduros en la circulación sanguínea (13). Estos cambios aseguran que los diferentes tipos de células sean dirigidas a los tejidos donde se requieran durante el estrés (51). El transporte, además, aumentaría los niveles de adrenalina, provocando consigo un aumento en los leucocitos (41).

### **El estrés y la calidad de la carne**

El manejo de los bovinos durante el presacrificio les provoca estrés, que conlleva a cambios de tipo metabólico y hormonal en el animal vivo, descritos previamente, produciendo efectos adversos en la calidad de la carne, específicamente en el pH, color, textura y la capacidad de retención de agua (52, 53). Así mismo, pueden causar disminuciones de peso, que se traducen en menor cantidad de

carne producida, lesiones como hematomas canales. En la Tabla 3, se presenta un resumen de diverso grado que implican recortes y de estas alteraciones. disminución de precio o categoría de las

**Tabla 3.** Alteraciones de la calidad de la carne obtenida de animales manejados bajo condiciones de estrés.

| Alteraciones  | Características   | Referencias  |
|---|---|--------------|
| Pérdidas de peso vivo y canal                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pérdidas por transporte entre el 5 y 12%.</li> <li>- Aumento directamente proporcional con el tiempo de transporte, ayuno y tiempo de espera en la planta de sacrificio.</li> <li>- Relacionadas con ejercicio previo al transporte, alimentación, condiciones climáticas.</li> </ul>  | (52, 53)     |
| Contusiones   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Prevalencias variables:</i></li> <li><i>Bos indicus:</i> 12,3% (Chile), 54,9% de contusiones leves y 12,0% de lesiones severas (Italia),</li> <li><i>Bos indicus:</i> África Occidental (20,9%),</li> <li>- Factores de riesgo: tiempos de transporte, temperamento de los animales, manejo, procedencia (finca o feria ganadera), mezcla de animales durante presacrificio, sexo (mayor en hembras que machos), edad (mayor en vacas de descarte y toros), densidad de carga durante el transporte, características de los vehículos, estilos de conducción, entre otros.</li> </ul> | (3, 54, 55)  |
| Alteraciones del pH, color y capacidad de retención de agua | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Consumo excesivo de glucógeno muscular en el animal vivo.</li> <li>- Disminución de la formación de ácido láctico en el músculo post-mortem.</li> <li>- Canales con <math>pH_{24} &gt; 5,8</math> (corte oscuro).</li> <li>- Carnes con coloración oscura, alta capacidad de retención de agua.</li> <li>- No aptas para empaque al vacío.</li> <li>- Mayor proliferación microbiana.</li> <li>- Menor vida útil.</li> </ul>   | (17, 26, 53) |

### CONCLUSIONES

La evaluación del BA basada en biomarcadores de estrés, es un proceso complejo porque la respuesta de los bovinos a las condiciones cambiantes y novedosas del presacrificio puede alterar los resultados, teniendo en cuenta, además, que la diversidad de respuestas

depende de factores que los investigadores en ocasiones no pueden controlar como la edad, dieta, nutrición, variabilidad individual y las experiencias de manejo previas, entre otros aspectos. La complejidad de la biología del estrés requiere de estudios más profundos, que incluyan una muestra importante de animales, con el fin de identificar los mejores indicadores

de estrés agudo y crónico, que puedan ser útiles y fáciles de medir en condiciones de campo.

En el futuro, con la finalidad de entender con mayor claridad la respuesta fisiológica y endocrina de los bovinos sometidos a manejos estresantes como el cargue, descargue, transporte, ayuno, insensibilización y sangría, sería conveniente integrar indicadores de comportamiento, como número de animales que reposan o se paran, montas, cornadas, vocalizaciones (mugidos), defecación, caídas y otras interacciones, que pueden generar respuestas distintas de los indicadores sanguíneos de estrés.

Teniendo en cuenta que el BA se ha convertido en un elemento diferenciador y un valor agregado en la comercialización de la carne bovina, la legislación colombiana ha integrado este componente dentro de los requerimientos de las buenas prácticas de producción primaria y secundaria. Por tal motivo, se hace necesario incentivar y fortalecer la introducción del BA en los currículos de los programas de Medicina Veterinaria y/o Zootecnia, la conformación de líneas de investigación aplicada en el área, y la vinculación de la academia en la resolución de problemas de la industria, relacionados con su falta de implementación.

## REFERENCIAS

1. Ferguson DM, Warner RD. Have we underestimated the impact of pre-slaughter on meat quality in ruminants? *Meat Sci* 2008; 80:12-19.
2. Grandin T. Transferring results of behavioral research to industry to improve animal welfare on the farm, ranch and the slaughter plant. *Appl Anim Behav Sci* 2003; 81:215-228.
3. Minka NS, Ayo JO. Effects of loading behaviour and road transport stress on traumatic injuries in cattle transported by road during the hot-dry season. *Livest Sci* 2007; 107:91-95.
4. Costa NL. Short-term stress: the case of transport and slaughter. *Ital J Anim Sci* 2009; 8(Suppl.1):241-252.
5. De Witte K. Development of the Australian Animal Welfare standards and guidelines for the land transport of livestock: Process and philosophical considerations. *J Vet Behav* 2009; 4:148-156.
6. Gregory NG. Animal welfare at markets and during transport and slaughter. *Meat Sci* 2008; 80:2-11.
7. Fisher AD, Colditz IG, Lee C, Ferguson DM. The influence of land transport on animal welfare in extensive farming systems. *J Vet Behav* 2009; 4:157-162.
8. Gupta S, Earley B, Crowe MA. Effect of 12-hour road transportation on physiological, immunological and hematological parameters in bulls housed at different space allowances. *Vet J* 2007; 173:605-616.
9. Minka NS, Ayo JO. Physiological responses of food animals to road transportation stress. *Afr J Biotechnol* 2009; 8(25):7415-7427.
10. Solano J, Galindo F, Orihuela A, Galina CS. The effect of social Rank on the physiological response during repeated stressful handling in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Physiol Behav* 2004; 82:679-683.
11. Colditz IG, Ferguson DM, Greenwood PL, Doogan VJ, Petherick JC, Kilgour RJ. Regrouping unfamiliar animals in the weeks prior to slaughter has few effects on physiology and meat quality in *Bos Taurus* feedlot steers. *Aust J Agri Res* 2007; 47:763-769.
12. Miranda-de la Lama GC, Rivero L, Chacón G, Garcia-Belenguer S. Effect of the pre-slaughter logistic on some indicators of welfare in lambs. *Livest Sci* 2010; 128:52-59.
13. Buckham Sporer KR, Weber PSD, Burton JL, Earley B, Crowe A. Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. *J Anim Sci* 2008; 86:1325-1334.
14. Broom DM. The effects of land transport on animal welfare. *Rev Sci Tech Off int Epiz* 2005; 24(2):683-691.
15. Cockram MS, Baxter EM, Smith LA, Bell S, Howard CM, Prescott RJ, et al. Effect of driver behaviour, driving events and road type on the stability and resting behaviour of sheep in transit. *J Anim Sci* 2004; 79:165-176.
16. Stockman CA, Collins T, Barnes AL, Miller D, Wickham SL, Beatty DT, et al. Qualitative behavioural assessment and quantitative physiological measurement of cattle naïve and habituated to road transport. *J Anim Prod Sci* 2011; 51:240-249.
17. Romero MH, Sánchez JA. Implicaciones de la inclusión del bienestar animal en la legislación sanitaria colombiana. *Rev Colomb Cien Pecu* 2011; 24:93-101.

18. Broom DM. Transport stress in cattle and sheep with details of physiological, ethological and other indicator. *Dtsch Tierärztl Wschr* 2003; 110:83-89.
19. Mormède P, Andanson S, Aupérin B, Beerda B, Guémené D, Malmkvist J, et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* 2007; 92:317-339.
20. Trevisi E, Bertoni G. Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Ital J Anim Sci* 2009; 8(Suppl.1):265-286.
21. Herskin MS, Munksgaard L, Ladewig J. Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiol Behav* 2004; 83:41-420.
22. Lay D, Wilson M. Physiological indicators of stress in domestic livestock. Symposium on Concentrated Animal Feeding Operations Regarding Animal Behavior, Care, and Well-Being, Indiana; 2001. p. 1-25.
23. Borell EH. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J Anim Sci* 2001; 79:260-267.
24. Muchenje V, Dzama K, Chimonyo M, Strydom PE, Raats JG. Relationship between pre-slaughter stress responsiveness and beef quality in three cattle breeds. *Meat Sci* 2009; 81:653-657.
25. Sapolsky RM, Romero ML, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrinol Rev* 2000; 21(1):55-89.
26. Amtmann VA, Gallo C, van Schaik G, Tadich N. Relaciones entre el manejo ante-mortem, variables sanguíneas indicadoras de estrés y pH de la canal en novillos. *Arch Med Vet* 2006; 38(3):259-264.
27. Buckham Sporer KR, Xiao L, Tempelman RJ, Burton JL, Earley B, Crowe MA. Transportation stress alters the circulating steroid environment and neutrophil gene expression in beef bulls. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 121:300-320.
28. Knowles T, Warriss P. Stress physiology of animals during transport. In: *Livestock handling and transport*, eds. Temple Grandin. 3 ed.; 2006.
29. Grandin T. Cattle vocalizations are associated with handling and equipment problems at beef slaughter plants. *Appl Anim Behav Sci* 2001; 71:191-201.
30. Mounier L, Dubroeuq H, Andanson S, Veissier I. Variations in meat pH of beef bulls in relation to conditions of transfer to slaughter and previous history of the animals. *J Anim Sci* 2006; 84:1567-1576.
31. Tadich N, Gallo C, Bustamante H, Schwerter M, van Schaik G. Effects of transport and lairage time on some blood constituents of Friesian-cross steers in Chile. *Livest Prod Sci* 2005; 93:223-233.
32. Cooke RF, Bohnert DW. Technical note: Bovine acute-phase response after corticotrophin-release hormone challenge. *J Anim Sci* 2011; 89:252-257.
33. Blanco M, Casasús I, Palacio J. Effect of age at weaning on the physiological stress response and temperament of two beef cattle breeds. *Animal* 2009; 3(1):108-117.
34. Parker AJ, Hamlin GP, Coleman CJ, Fitzpatrick LA. Excess cortisol interferes with a principal mechanism of resistance to dehydration in *Bos indicus* steers. *J Anim Sci* 2004; 82:1037-1045.
35. Möstl E, Palme R. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23:67-74.

36. Cafe LM, Robinson DL, Ferguson DM, Geesink GH, Greenwood PL. Temperament and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function are related and combine to affect growth, efficiency, carcass, and meat quality traits in Brahman steers. *Domest Anim Endocrinol* 2011; 40(4):230-240.
37. Averós X, Martín S, Riu M, Serratosa J, Gosálvez LF. Stress response of extensively young being transported to growing-finishing farms under Spanish summer commercial conditions. *Lives Sci* 2008; 119:174-182.
38. Souza MIL, Uribe-Velásquez LF, Ramos AA, Oba E. Níveis plasmáticos de colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL) e cortisol, e sua biorritmicidades, em carneiros Ideal-Polwarth. *Cien Anim Bras* 2006; 7(4):433-438.
39. Tsigos C, Chrousos P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Pshychosom Res* 2002; 53(4):865-871.
40. Kannan G, Kouakou B, Terril TH, Gelaye S. Endocrine, blood metabolite, and meat quality changes in goats as influenced by short-term, preslaughter stress. *J Anim Sci* 2003; 81:1499-1507.
41. Tadich N, Gallo C, Echeverría R, van Schaik G. Efecto del ayuno durante dos tiempos de confinamiento y de transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. *Arch Med Vet* 2003; 2:171-185.
42. Bórnez R, Linares MB, Vergara H. Haematological, hormonal and biochemical blood parameters in lamb: effect of age and blood sampling time. *Lives Sci* 2009; 121:200-206.
43. Broom DM. Behaviour and welfare in relation to pathology. *Appl Anim Behav* 2006; 97:73-83.
44. Vogel KD, Claus JR, Grandin T, Oetzel GR, Schaefer DM. Effect of water and feed withdrawal and health status on blood and serum components, body weight loss, and meat and carcass characteristics of Holstein slaughter cows. *J Anim Sci* 2010; 89(2):538-548.
45. Munhoz CD, García-Bueno B, Madrigal JLM, Lepsch LB, Scavone C, Leza JC. Stress-induced neuroinflammation: mechanism and new pharmacological targets. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41(12):1037-1046.
46. Radostits OM, Houston DM, Mayhew IG. Examen y diagnóstico clínico en veterinaria. 1ª ed. Philadelphia: Ed. Elsevier; 2002.
47. Hambrecht E, Eissen JJ, Newman DJ, Smits CHM, den Hartog LA, Verstegen MWA. Negative effects of stress immediately before slaughter on pork quality are aggravated by suboptimal transport and lairage conditions. *J Anim Sci* 2005; 83:440-448.
48. Kaneko J, Harvey J, Bruss M. Clinical Biochemistry of domestic animals. 6th ed. San Diego, USA: Academic Press; 1997.
49. Warner RD, Ferguson DM, Cottrel JJ, Knee BW. Acute stress induced by the preslaughter use of electric prodders causes tougher beef meat. *Aust J Agri Res* 2007; 47:782-788.
50. Grandin T. Progress and challenges in animal handling and slaughter in U.S. *Appl Anim Behav Sci* 2006; 100:129-139.
51. Davis AK, Maney DL, Maerz JC. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecol* 2008; 22:760-772.
52. Van de Water G, Verjans F, Geers R. The effect of short distance transport under commercial conditions on the physiology of slaughter calves; pH and colour profiles of veal. *Livest Prod Sci* 2003; 82:171-179.



53. Gallo C, Lizondo G, Knowles G. Effects of journey and lairage time on steers transported to slaughter in Chile. *Vet Rec* 2003; 152:361-364.
54. Nanni Costa L, Lo Fiego DP, Tassone F, Russo V. The relationship between carcass bruising in bulls and behavior observed during pre-slaughter phases. *Veterinary Research Communications* 2006; 30:379-381.
55. Strappini AC, Frankena K, Metz JHM, Gallo B, Kemp B. Prevalence and risk factors for bruises in Chilean bovine carcasses. *Meat Sci* 2010; 86:859-864.