

# EFECTO DE MEDIANO PLAZO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO SOBRE EL CRECIMIENTO, PARÁMETROS ENDÓCRINOS Y PUBERTAD EN TERNERAS HEREFORD PASTOREANDO CAMPO NATURAL

D. Guggeri<sup>1</sup>, A. Meikle<sup>2</sup>, M. Carriquiry<sup>3</sup>,  
F. Montossi<sup>1</sup>, I. De Barbieri<sup>1</sup>, C. Viñoles<sup>1</sup>

## RESUMEN

Este trabajo compara diferentes sistemas de manejo aplicados a edad temprana sobre el desarrollo corporal, parámetros endócrinos y edad a la pubertad en terneras para carne pastoreando campo natural. Las terneras fueron asignadas a tres tratamientos: 1) Destete precoz (DP, n = 15) a los 75±1,5 días de edad; 2) Destete tradicional (DTr, n = 14) a los 158±1,5 días de edad; 3) Destete tradicional con creep feeding (DTr+CF, n = 17). Las terneras DP y las DTr+CF recibieron un suplemento con 26±1,1 % de proteína cruda y 11,7±0,04 MJ de energía metabolizable/kg de materia seca desde los 75 a los 158±1,5 días. Las terneras DTr tuvieron una mayor ganancia de peso diario respecto a las terneras DP, asociado a mayores concentraciones de IGF-I al momento del DTr, pero la edad a la pubertad fue similar en ambos grupos. Las terneras DTr+CF (P<0,05) tuvieron una mayor ganancia de peso diario, mayores concentraciones de IGF-I al destete, fueron más pesadas y altas desde el destete hasta los 539±1,5 días (P<0,02) y la pubertad ocurrió más temprano que en las DP (P<0,05) y tendió a ocurrir antes que en las terneras DTr (P=0,06). Concluimos que la edad al destete tiene un impacto de corto plazo sobre el crecimiento corporal y las concentraciones de IGF-I, que no tienen efecto sobre la edad a la pubertad. El CF indujo un desarrollo corporal más rápido, relacionado a una manifestación más temprana de la pubertad.

## INTRODUCCIÓN

La edad a la pubertad y al primer parto afectan la productividad de la vaca en toda su vida reproductiva (Lesmeister *et al.*, 1973). En el ganado de carne bajas ganancia

de peso antes del destete y bajos pesos al destete están asociados con un retraso en la edad a la pubertad (Arije y Wiltbank, 1971). En sistemas de cría extensivos la variabilidad en la cantidad y calidad de las pasturas durante el verano e invierno

<sup>1</sup> INIA, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.

<sup>2</sup> Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria.

<sup>3</sup> Producción Animal y de Pasturas, Facultad de Agronomía.

(Berretta *et al.*, 2000), limita la cantidad de energía y proteína que consumen los terneros e impacta negativamente en su tasa de crecimiento antes y después del destete (Viñoles *et al.*, 2009). La suplementación con concentrados de terneras al pie de la madre o destetadas en forma precoz, son dos estrategias de manejo que pueden ser utilizadas en épocas de escasez de comida para aumentar los pesos al destete (Holloway y Totusek, 1973; Neville y McCormick, 1981) y lograr una pubertad anticipada.

Las vaquillonas alcanzan la pubertad a una proporción constante de su peso adulto proyectado (Freetly *et al.*, 2011), lo cual está asociado con las concentraciones de insulina, factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), glucosa y leptina, que señalan directa o indirectamente sobre las neuronas hipotalámicas (Brito *et al.*, 2007). Se ha encontrado que las terneras destetadas precozmente alcanzan la pubertad a la misma edad que las terneras destetadas en forma tradicional (600 días de edad; de Castro *et al.*, 2004), pero se puede inducir una pubertad precoz (menos de 300 días) si las terneras destetadas precozmente son alimentadas con una dieta rica en concentrados (Gasser *et al.*, 2006). A pesar de que está bien establecido que el eje somatotrófico, las hormonas metabólicas y los metabolitos están involucrados en el crecimiento de los tejidos y la maduración sexual, hay falta de información sobre el impacto de los diferentes sistemas de manejo sobre estos parámetros (Loy *et al.*, 2002).

La hipótesis de este trabajo es que un sistema de manejo que a edad temprana estimule altas tasas de ganancia de peso, va a estimular un aumento en las concentraciones de hormonas metabólicas, acelerar el crecimiento y desarrollo corporal y adelantar la manifestación de la pubertad.

El objetivo de este trabajo fue comparar diferentes grupos de terneras que fueron destetadas precozmente con terneras que fueron destetadas en forma tradicional con o sin suplementación rica en energía/proteína, sobre el crecimiento y desarrollo corporal, parámetros endócrinos y edad a la pubertad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento fue realizado en «Glencoe» Campo Experimental del «Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria» (INIA Tacuarembó), Paysandú, Uruguay (S31° W42°), desde Diciembre (verano) a Mayo (otoño) de su segundo año de vida.

Se utilizaron 46 terneras Hereford (hijas de vacas multíparas) nacidas en la primavera, de  $75 \pm 1,5$  días de edad y  $79,4 \pm 2,9$  kg de peso vivo, las que fueron distribuidas en tres grupos experimentales: 1) Destete precoz (DP; n=15); terneras destetadas a los  $75 \pm 1,5$  días de edad suplementadas desde los 75 a los  $158 \pm 1,5$  días de edad (Período I) a una tasa de 1,5 % del peso vivo; 2) Destete tradicional (DTr; n = 14; tratamiento control), terneras destetadas a los  $158 \pm 1,5$  días de edad 3) Destete tradicional con suplementación al pie de la madre (DTr+S, n = 17), fueron suplementadas desde los  $75 \pm 1,5$  días hasta el destete (158 días de edad) al 1,3 % del peso vivo. Los tres grupos experimentales pastorearon campo natural, la asignación de forraje y la composición química de las pasturas no difirió entre tratamientos y fue de  $4,0 \pm 0,6$  kg de materia seca (MS)/kg peso vivo (Sollenberger *et al.*, 2005) con un contenido de  $8,7 \pm 0,3$  % de proteína cruda y  $7,9 \pm 0,04$  MJ de energía metabolizable (EM)/kg MS. El suplemento utilizado durante el Período I aportó  $26 \pm 1,1$  % de proteína cruda y  $11,7 \pm 0,04$  MJ EM/kg MS (Ternero 1 Premium, Colonia el Ombú, Río Negro, Uruguay).

Desde los 158 a los  $539 \pm 1,5$  días de edad (Período II), las terneras fueron manejadas bajo las mismas condiciones nutricionales pastoreando campo natural inmediatamente después del destete tradicional (asignación de forraje: 28 kgMS/kg peso vivo) y posteriormente pastorearon campo natural mejorado con trébol blanco y lotus a una asignación de forraje de  $3,9 \pm 0,8$  kg MS/kg peso vivo. La composición química de las pasturas fue de  $9,6 \pm 0,4$  % proteína cruda y  $8,6 \pm 0,13$  MJ EM / kg MS. Todas las terneras recibieron un suplemento desde los 435 a los  $539 \pm 1,5$  días de edad, a una tasa del 1 % del peso vivo, el cual aportó  $14,4 \pm 0,5$  % proteína cruda y  $12,1 \pm 0,08$  MJ EM/kg MS.

Se evaluó el peso vivo desde los 75 a los 539±1,5 días de edad cada 14 días (balanza True-test GR 3000®, True-test Corporation Limited, Montevideo, Uruguay) y se calculó el promedio de ganancia de peso diario.

La altura de anca fue medida cada 56 días desde los 158 a los 539±1,5 días de edad, con una regla en paralelo a los huesos de la cadera, con la ternera parada sobre una superficie nivelada. La información fue utilizada para calcular el crecimiento.

El espesor de grasa subcutánea (espesor de grasa subcutánea sobre el músculo *longissimus dorsi* entre la costilla 12 y la 13, medido en mm), marmoleado (porcentaje de grasa intramuscular dentro del músculo *longissimus dorsi* entre la costilla 12 y la 13; medido en porcentaje), área de ojo de bife (área del músculo *longissimus dorsi* entre la costilla 12 y la 13; medido en cm<sup>2</sup>) y el depósito de grasa en el anca (P8, depósito de grasa arriba de los músculos glúteos, entre las tuberosidades coxal e isquiática, medida en mm), fueron estimadas por ultrasonografía, desde los 176 a 539±1,5 días de edad, cada 56 días por el mismo operador utilizando un ecógrafo modo B en tiempo real, con un transductor lineal de 3,5 MHz (Aloka SSD 500 Echo camera, Overseas Monitor Corp. Ltd., Richmond, BC). Las imágenes logradas fueron guardadas en una computadora portátil (Houghton y Turlington, 1992) y analizadas utilizando el programa Biosoft® (Biotronics Inc., Ames, Iowa, EEUU).

Se extrajeron muestras de sangre por punción de la vena yugular desde los 158 a los 539±1,5 días de edad cada 28 días, para determinar las concentraciones de glucosa mediante el uso de tiras reactivas (Ascensia® ENTRUST® Blood Glucose Test Strips, Bayer, Montevideo, Uruguay), y analizar concentraciones de IGF-I y leptina en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de IGF-I fueron determinadas cada 56 días, mientras que la leptina fue determinada cada 28 días. Las concentraciones de IGF-I fueron determinadas utilizando un Radio Inmuno Análisis (RIA) con un kit comercial (IGF-I-RIACT Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, Francia) previamente validado

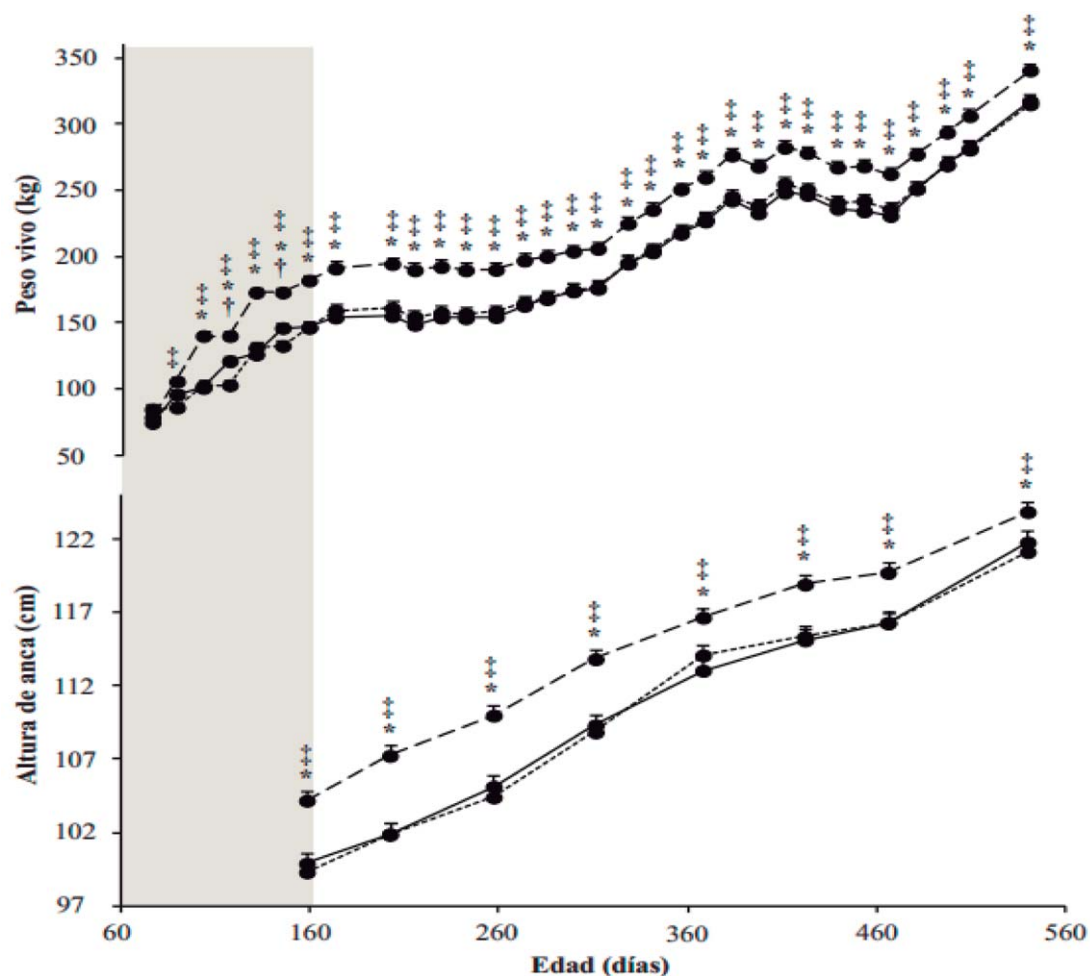
(Adrien *et al.*, 2012). La sensibilidad del ensayo fue de 0,8 ng/mL y el CV interensayo para los controles de calidad fueron de 11,7% y 13,5%, para las concentraciones bajas (74 ng/mL) y altas (535 ng/mL) respectivamente. Las concentraciones de leptina fueron determinadas por un RIA de fase líquida utilizando un kit comercial multi especies, (RIA kit, Millipore, Cat XL-85K) previamente validado para bovinos (Pinotti y Rosi, 2006). La sensibilidad del ensayo fue de 1,4 ng/mL y el CV interensayo para los controles de calidad fueron de 19,7% y 14,0%, para las concentraciones bajas (4,2 ng/mL) y altas (18,8 ng/mL) respectivamente.

Los ovarios fueron examinados desde los 158 a los 539±1,5 días de edad cada 14 días mediante ultrasonografía transrectal, utilizando un ecógrafo en modo B en tiempo real, con un transductor de 7,5 MHz (Aloka SSD 500 Echo camera, Overseas Monitor Corp. Ltd., Richmond, BC), para determinar la presencia de un cuerpo lúteo, la cual fue interpretada como el comienzo de la pubertad (Bergfeld *et al.*, 1994).

## RESULTADOS

Durante el Período I el peso vivo y el promedio de las ganancias de peso diarias fueron superiores en las terneras DTr+CF (1,25±0,03 kg/día) que en las terneras DTr y DP (0,86±0,03 kg/día, 0,75±0,03 kg/día, respectivamente), y mejores en las terneras DTr que en las terneras DP. Al destete y durante el Período II, el peso vivo y la altura de anca fueron superiores en las terneras DTr+CF que en las terneras DTr y DP (Figura 5), pero el promedio de la ganancia de peso diaria durante el Período II fue menor en las terneras DTr+CF (0,39±0,01 kg/día), que en las terneras DTr (0,42±0,01 kg/día) y DP (0,41±0,01 kg/día). No se observó diferencia entre tratamientos para crecimiento durante el período II (0,06±0,04 cm/día).

Las terneras DTr+CF tuvieron una mayor área de ojo de bife al destete y durante el Período II (36,1±0,7 cm<sup>2</sup>) que los grupos DTr (31,4±0,8 cm<sup>2</sup>) y DP (33,7±0,8 cm<sup>2</sup>; P<0,001), mientras que en las DP fue mayor que en las terneras DTr. Las terneras DTr+CF



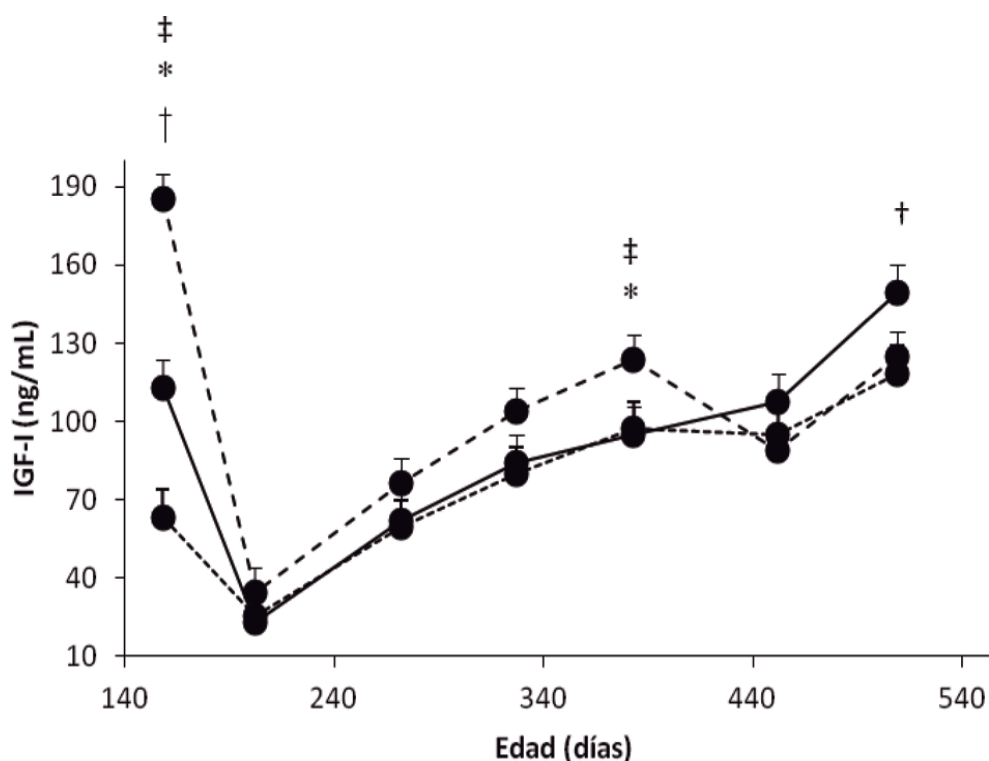
**Figura 5.** Peso vivo (panel superior) desde los 75 a los 158 días de edad (Período I: indicado por el área sombreada) y desde los 158 a los 539 días de edad (Período II) y cambios en la altura de anca (panel inferior) durante el Período II en terneras destetadas en forma precoz (DP, línea de punteo fino), terneras destetadas en forma tradicional (DTr, línea continua) y terneras destetada en forma tradicional que recibieron creep feeding (DTr+CF, línea de punteo grueso). †P<0,05 entre DP y DTr; \* P<0,05 entre DTr y DTr+CF; ‡ P<0,05 entre DTr+CF y DP

( $2,4 \pm 0,08$  mm) tuvieron un mayor espesor de grasa subcutánea en el periodo II, que las terneras DTr ( $2,1 \pm 0,09$  mm) y DP ( $2,2 \pm 0,08$  mm;  $P < 0,04$ ). No se observaron diferencias en marmoleado ( $1,7 \pm 0,09\%$ ) ni en el espesor de grasa en el sitio P8 ( $2,5 \pm 0,1$  mm) entre grupos.

Las concentraciones de IGF-I fueron mayores a los 158 y 383 días en las terneras DTr+CF que en las DP y DTr (Figura 6). A los 158 y 509 días de edad las terneras DTr tuvieron mayores concentraciones de IGF-I que las terneras DP (Figura 6). A los 158 días

de edad las concentraciones de glucosa fueron similares en todos los grupos, pero bajaron abruptamente entre los 158 y los 202 días de edad y variaron mucho durante el resto del experimento. Las concentraciones de leptina fueron similares entre grupos durante todo el período experimental.

La pubertad ocurrió antes en las terneras DTr+CF ( $472 \pm 8,0$  días) que en las terneras DP ( $526 \pm 7,2$  días;  $P < 0,01$ ) y tendió ( $P = 0,06$ ) a ocurrir antes en las terneras DTr+CF comparada con las terneras DTr ( $484 \pm 3,4$  días). Una proporción similar de terneras DTr y DP



**Figura 6.** Concentraciones de IGF-I entre los 158 y 539 días de edad en terneras destete precoz (DP, línea de punteado fino), destetadas tradicional (DTr, línea continua) y destete tradicional con suplementación (DTr+CF, línea de punteado grueso). †P<0,05 entre DP y DTr; \* P<0,05 entre DTr y DTr+CF; ‡ P<0,05 entre DTr+CF y DP.

alcanzaron la pubertad al final del experimento. Las variables que mejor explicaron la variación en la edad a la pubertad, fueron la ganancia de peso diario durante el Período II (29 %) y I (23 %), el área de ojo de bife (19 %), altura de anca (15 %) y las concentraciones de IGF-I (7 %).

## DISCUSIÓN

La hipótesis de que en un sistema de manejo que a edad temprana induce altas tasas de ganancia de peso, estimularía un aumento de las concentraciones de hormonas metabólicas, el crecimiento y desarrollo corporal y una pubertad más temprana fue aceptada. Las terneras DTr+CF tuvieron una mayor ganancia de peso diario (durante el Período I) y peso al destete comparadas con las terneras DTr y DP, lo cual es consistente con reportes previos (Holloway y Totusek, 1973). Esto estuvo asociado con una mayor

altura de anca y una mayor área de ojo de bife y mayor espesor de grasa comparado con las terneras DTr, al momento del destete. Este resultado era esperado, ya que existe un orden en la deposición de los tejidos durante la curva de crecimiento de los animales jóvenes, donde el hueso y los músculos anteceden a la acumulación de grasas, cuyo depósito será estimulado en animales alimentados con una dieta con altos contenidos de energía y proteína (Owens *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1998). Los pesos al momento del destete tradicional fueron similares entre las terneras DTr y DP, en contraste con los resultados reportados por de Castro *et al.* (2004) en terneras sometidas a condiciones similares de pastoreo. Las contradicciones pueden atribuirse a la duración del período de tiempo que las terneras recibieron el suplemento y a la cantidad del mismo. El mayor promedio de ganancia de peso diario durante el Período I de las terneras DTr+CF comparadas con las terneras DP y



DTr y de estas últimas comparadas con las terneras DP estuvo asociado a mayores concentraciones de IGF-I, aunque al destete las concentraciones de glucosa y leptina fueron similares. El IGF-I, que juega un rol esencial en la regulación del crecimiento y desarrollo (Laron 2001), aumenta en animales que son alimentados con dietas no restrictivas (Armstrong *et al.*, 1993). La finalización de la suplementación en las terneras de los tratamientos DTr+CF y DP, la finalización del amamantamiento de las terneras de los tratamientos DTr y DTr+CF y el descenso en la asignación de forraje que ocurrió a mediados de otoño, determinaron un período de subnutrición típico de terneras que se alimentan sobre campo natural (Gutiérrez *et al.*, 2013). Durante éste período todos los grupos de terneras movilizaron músculo y depósitos de grasas, lo que estuvo asociado con una disminución en las concentraciones de glucosa e IGF-I. A pesar de que la glucosa decreció de manera similar en todos los grupos, la disminución en los niveles de IGF-I fue más pronunciado en las terneras DTr+CF y DTr que en las terneras DP, sugiriendo una respuesta metabólica diferente dependiendo del sistema de manejo que recibieron entre los dos y los cinco meses de edad.

La superioridad de las terneras DTr+CF en peso vivo, altura de anca y área de ojo de bife comparada con las terneras DTr y DP, duró hasta el final del experimento, aunque la magnitud de esta diferencia fue decreciendo hacia el final del mismo. Se ha reportado que terneras nutricionalmente restringidas a una edad de siete meses, requieren de 14 a 18 meses para compensar su retraso en el crecimiento (Berge, 1991), lo que concuerda con nuestros resultados. Se ha descrito que terneras alimentadas con un alto plano nutricional a edad temprana, mantuvieron la diferencia en tamaño corporal hasta los 1,5 años de edad (Holloway y Totusek, 1973). De cualquier manera, las terneras DTr y DP tuvieron un mayor promedio de ganancia de peso diario durante el Período II comparadas con las terneras DTr+CF. A pesar de que las terneras DP y DTr, tenían un peso vivo y altura de anca similar, las terneras DP mantuvieron una mayor área de ojo de

bife hasta el final del experimento. Las diferencias pueden ser explicadas por la administración de concentrados en la dieta de las terneras DP comparada con la dieta exclusivamente a base de campo natural de las terneras DTr, como ha sido demostrado en novillos de carne alimentados en base a concentrados comparado con aquellos alimentados a base de pasturas (Realini *et al.*, 2004). El aumento en los parámetros que estiman la composición corporal, asociados con el aumento en las concentraciones de IGF-I que ocurrió en todos los grupos de terneras hacia el final del experimento, pueden ser indicativos de la presencia de un crecimiento compensatorio (Hornick *et al.*, 2000), ya que aumentaron los niveles de comida por administración del suplemento que recibieron todos los grupos al final del período experimental. Estos hallazgos refuerzan el concepto de que el plano nutricional que las terneras reciben antes y después del destete, determinan la trayectoria de crecimiento de las mismas y el momento que alcanzan la pubertad (Hall *et al.*, 1995; Gasser *et al.*, 2006).

Las terneras DTr+CF alcanzaron antes la pubertad que las terneras DP y tendieron a alcanzarla antes comparadas con las terneras DTr, siendo similar entre las terneras DP y DTr. Las terneras que tuvieron tasas de crecimiento mayores antes del destete, alcanzaron la pubertad a edades más tempranas comparadas con sus contemporáneas que crecieron más lento (Wiltbank *et al.*, 1966; Arije y Wiltbank, 1971). En este experimento las variables que mejor explicaron la edad a la pubertad estuvieron relacionadas con el crecimiento, desarrollo corporal y concentraciones de IGF-I, de acuerdo con hallazgos previos (Chelikani *et al.*, 2003).

Concluimos que aumentando el plano nutricional de terneras al pie de la madre sobre campo natural en suelos de Basalto, tiene un efecto de corto plazo en la productividad del rodeo, aumentando los pesos vivos al destete de las terneras y un efecto a mediano plazo relacionado con una pubertad más temprana en las vaquillonas de reemplazo, potencialmente reduciendo la edad al

primer servicio y al primer parto. En este estudio a pesar de que la edad al destete tuvo un impacto de corto plazo en el crecimiento corporal y las concentraciones de IGF-I, no tuvo un efecto negativo de mediano plazo sobre el crecimiento y desarrollo corporal, concentraciones de hormonas metabólicas y edad a la pubertad.

## BIBLIOGRAFIA

- Arije GF, Wiltbank JN (1971) U . S . Department of Agriculture , Nebraska Agriculture Experiment Station/ ; Journal of Animal Science 33:401–406.
- Armstrong JD et al. (1993) Effect of feed restriction on serum somatotropin, insulin-like growth factor-I-(IGF-I) and IGF binding proteins in cyclic heifers actively immunized against growth hormone releasing factor. Domestic Animal Endocrinology 10:315–324.
- Berge P (1991) Long - term effects of feeding during calthood on subsequent performance in beef cattle. Livestock Production Science 28:179–201.
- Berretta EJ et al. (2000) Campos in Uruguay. In: Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology. Lemaire, G, Hodgson, J, De Moraes, A, Nabinger, C, & Carvalho, PC d F, editors. CAB International, New York, USA pp. 377–394.
- Brito LFC et al. (2007) Effect of improved nutrition during calthood on serum metabolic hormones, gonadotropins, and testosterone concentrations, and on testicular development in bulls. Domestic Animal Endocrinology 33:460–469.
- de Castro T et al. (2004) 15th International Congress of Animal Reproduction. In: Does early weaning influence age at puberty in beef heifers?., p. 21.
- Chelikani PK, Ambrose JD, Kennelly JJ (2003) Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty, and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. Theriogenology 60:707–725.
- Davis TA et al. (1998) Roles of Insulin and Amino Acids in the Regulation of Protein Synthesis in the Neonate. The Journal of nutrition 128:347S–350S.
- Freetly HC, Kuehn LA, Cundiff L V (2011) Growth curves of crossbred cows sired by Hereford, Angus, Belgian Blue, Brahman, Boran, and Tuli bulls, and the fraction of mature body weight and height at puberty. Journal of Animal Science 89:2373–2379.
- Gasser CL et al. (2006) Effect of timing of feeding a high-concentrate diet on growth and attainment of puberty in early-weaned heifers. Journal of Animal Science 84:3118–3122.
- Gutiérrez V et al. (2013) Calf Foetal And Early Life Nutrition On Grazing Conditions: Metabolic And Endocrine Profiles And Body Composition During The Growing Phase. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 97:720–731.
- Hall JB et al. (1995) Body composition and metabolic profiles associated with puberty in beef heifers. Journal of animal science 73:3409–3420.
- Holloway JW, Totusek R (1973) Relationship between Prewaning Nutritional Management and Subsequent Performance of Angus and Hereford Females through Three Calf Crops. Journal of Animal Science 37:807–812.
- Hornick JL et al. (2000) Mechanisms of reduced and compensatory growth. Domestic Animal Endocrinology 19:121–132.
- Laron Z (2001) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. Mol Pathol 54:311–316.
- Lesmeister JL, Burfening PJ, Blackwell RL (1973) Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. Journal of Animal Science 36:1–6.
- Loy TW et al. (2002) Effects of supplementation on intake and growth of nursing calves grazing native range in southeastern North Dakota The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at/ : Effects of supplem. Journal of Animal Science 80:2717–2725.
- Neville WE, McCormick WC (1981) PERFORMANCE OF EARLY- AND NORMAL-WEANED AND THEIR DAMS. Journal of Animal Science 52.

- Owens FN, Dubeski P, Hansont CF (1993) Factors that Alter the Growth and Development of Ruminants1f2 ABSTRACT/ : Journal of Animal Science 71:3138–3150.
- Realini CE et al. (2004) Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. Meat Science 66:567–577.
- Viñoles C et al. (2009) Estado actual de la investigación vinculada a la Producción Animal Limpia, Verde y Ética en Uruguay. Agrociencia XIII:59–79.
- Wiltbank JN et al. (1966) Effects of Heterosis on Age and Weight at Puberty in Beef Heifers. Animal Science 25:744–751.