

# Uso de *Saccharomyces cerevisiae* y monensina sódica en raciones con distinto nivel de proteína para vaquillas Holstein<sup>a</sup>

Cecilia Zaragoza Hernández<sup>b</sup>, José Ayala Oseguera<sup>c</sup>, Germán David Mendoza Martínez<sup>b</sup>

## RESUMEN

Zaragoza HC, Ayala OJ, Mendoza MGD. *Téc Pecu Méx* 2001;39(3):207-214. Se ha mencionado que los ionóforos y el cultivo de levadura pueden modificar el flujo de aminoácidos al duodeno, por lo que se estudió el efecto de su inclusión en raciones con tres niveles de proteína en raciones para vaquillas. Se usaron 27 vaquillas Holstein en corraletas individuales, con un peso promedio de 180 kg y 10 meses de edad, las cuales fueron distribuidas de acuerdo a un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3 x 3, en tratamientos que consistieron en niveles de proteína dietaria (12, 14 y 16 % PC), y aditivos (ninguno, 10 g/día de *Saccharomyces cerevisiae*, y 30 ppm de monensina sódica). No hubo interacción entre nivel de proteína y aditivo en ninguna de las variables. No se encontraron efectos de aditivos en consumo de materia seca, ganancia de peso, conversión alimenticia y condición corporal. El consumo de materia seca fue reducido con el nivel intermedio de proteína, sin afectar otras variables. La estimación de lisina y metionina metabolizable no mostró diferencias para los tratamientos. La ausencia de interacción indica que los aditivos no tuvieron efectos en el aprovechamiento de la proteína y que se pueden usar niveles de 12% de PC si los aminoácidos metabolizables cubren los requerimientos estimados.

**PALABRAS CLAVE:** Vaquillas, Proteína, *Saccharomyces cerevisiae*, Monensina sódica.

## INTRODUCCIÓN

La crianza de vaquillas de reemplazo sigue siendo un aspecto limitante en la producción de leche especializada<sup>(1)</sup>. Se estima que en México su crianza podría representar un ahorro de alrededor de 20 % en los costos de producción, al

comparar con la importación de vaquillas<sup>(2)</sup>, por lo que es importante buscar alternativas de manejo nutricional que permitan hacer más eficiente la utilización de los alimentos.

Se ha considerado que la proteína metabolizable es el principal nutriente limitante en el crecimiento de bovinos<sup>(3)</sup> por lo que es necesario evaluar raciones que difieren en contenido de proteína y en el flujo de aminoácidos al duodeno. Para

a Recibido el 4 de junio de 2001 y aceptado para su publicación el 19 de octubre de 2001.

b Colegio de Postgraduados Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, México 56230. Tel 01 (595) 2-02-00 ext. 1716 y fax (595) 2-02-79 gmendoza@colpos.colpos.mx. Correspondencia y solicitud de separatas al tercer autor.

c Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

aumentar la cantidad de aminoácidos disponibles que pueden ser absorbidos en el intestino delgado, se deben incluir en la ración diaria fuentes de proteína de lenta degradabilidad en el rumen, y optimizar la fermentación ruminal a fin de incrementar la síntesis de proteína microbiana<sup>(4)</sup> y suministrar ingredientes con aminoácidos que resistan la fermentación de los microorganismos del rumen<sup>(5)</sup>.

Se han usado diversos aditivos que pueden tener un impacto en la utilización de la proteína en los rumiantes. Los ionóforos tienen un efecto ahorrador de proteína al reducir la degradación ruminal<sup>(6)</sup>, y los cultivos de levadura han logrado incrementar el flujo de aminoácidos al duodeno<sup>(7,8)</sup>, por lo que el uso de estos aditivos en raciones para vaquillas podrían permitir reducir la concentración de proteína, o bien mejorar la tasa de crecimiento al favorecer el flujo de lisina y metionina, que son considerados los aminoácidos esenciales que pueden limitar el crecimiento y desarrollo corporal de los rumiantes jóvenes<sup>(9)</sup>.

Este estudio tuvo como objetivo el evaluar el comportamiento de vaquillas alimentadas con tres niveles de proteína con la inclusión de ionóforo (monensina sódica) o de un cultivo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo fue realizado en las instalaciones del módulo de bovinos para carne de la granja experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, Méx., cuyo clima es

templado subhúmedo con lluvias en verano (C(W)(w)b(i')), temperatura media anual de 16.5°C, precipitación media de 644.7 mm y altitud de 2,250 msnm<sup>(10)</sup>.

Se utilizaron 27 vaquillas Holstein alojadas en corraletas individuales, con un peso promedio de 180 kg y 10 meses de edad, las cuales fueron aleatorizadas en nueve tratamientos que consistieron en tres raciones (Cuadro 1) con tres niveles de proteína (12, 14 y 16 % PC), y tres niveles de aditivos (ninguno, probiótico e ionóforo). Se usó una dosis de 10 g/animal/día de un cultivo microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sacc, Alltech). El ionóforo monensina sódica (Rumensin, ELANCO) fue incorporado a la ración en una concentración de 30 ppm/kg.

Antes de iniciar el experimento los animales fueron desparasitados internamente y recibieron una dosis de vitaminas A, D y E. El alimento se proporcionó en forma individual a las 0700 con acceso *ad libitum* a sales minerales y agua. Las dietas se formularon variando el nivel de proteína con las recomendaciones de otros nutrientes sugeridos por el INRA<sup>(11)</sup> y NRC<sup>(12)</sup>. El alimento se preparó en forma integral con el forraje molido.

El contenido de proteína se determinó por el método de Kjeldahl. Los análisis de MS, PC, FDN, FDA y cenizas fueron hechos mediante las técnicas de AOAC<sup>(13)</sup> y de Van Soest<sup>(14)</sup>. La degradabilidad de la proteína y la concentración de aminoácidos se calculó con datos del NRC<sup>(12)</sup> y del INRA<sup>(11)</sup>. Los aminoácidos absorbidos se estimaron con el programa Mepron<sup>(15)</sup>. La proteína metabolizable de

**Cuadro 1. Composición de las raciones experimentales (%)**

	Proteína (%)		
	12	14	16
Sorgo grano	40.29	37.28	35.92
Rastrojo de maíz	33.68	32.51	32.00
Melaza	11.96	11.98	11.98
Harina de alfalfa	4.99	4.99	4.99
Harina de sangre	2.93	5.45	5.86
Harina de pescado	2.89	4.82	6.27
Pasta de soya	0.99	0.98	0.99
Urea	0.27	-	-
Bicarbonato de Na	0.91	0.91	0.91
Sal	0.36	0.36	0.36
Minerales traza	0.36	0.36	0.36
Sulfato de Mg	0.32	0.32	0.32
Composición:			
Proteína cruda	12.50	14.86	16.00
PDR, % MS	6.04	6.39	7.00
FDN	23.10	22.80	22.00
FDA	18.42	17.80	17.55
Ca	0.62	0.66	0.82
P	0.29	0.40	0.34
Lisina	0.39	0.65	0.75
Metionina	0.09	0.15	0.18

PDR= Proteína degradable en rumen.

FDN= Fibra detergente neutro.

FDA= Fibra detergente ácido

origen dietaria y microbiana, se estimaron con el nivel I del modelo NRC<sup>(16)</sup>.

El ensayo tuvo una duración de 190 días de los cuales 15 fueron de adaptación y los 175 restantes se destinaron a la medición de consumo y cambios de peso. Se registró la condición corporal con una escala de 1 a 5<sup>(17)</sup>.

Los resultados fueron analizados de acuerdo a un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3 x 3<sup>(18)</sup>, donde

los factores fueron el nivel de proteína y el tipo de aditivo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se detectó interacción entre el nivel de proteína y la combinación de aditivos en ninguna de las variables de respuesta, por lo que en los Cuadros 2 y 3 se presentan los efectos principales de los tratamientos. El nivel de proteína mostró una respuesta cuadrática ( $P < 0.01$ ) en el consumo de MS, mostrando un menor consumo con el

nivel intermedio de proteína, sin mostrar efectos en otras variables (Cuadro 2). Los aditivos no mostraron ningún efecto (Cuadro 3).

A pesar de que se han sugerido diversos mecanismos de acción benéficos de los cultivos de levadura tales como incremento en la tasa de digestión y en la población de bacterias celulolíticas<sup>(19)</sup>, existen varios reportes donde no ha habido respuesta en consumo<sup>(20)</sup>, ganancia y conversión<sup>(21)</sup>, mientras que otros han documentado mayor digestibilidad y consumo<sup>(22)</sup>, o mejor comportamiento con *Saccharomyces*

*cerevisiae*<sup>(23,24,25)</sup>. En un estudio similar a este, se alimentaron vaquillas de reemplazo por seis meses con dos tipos de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>(26)</sup>, y tampoco encontraron efectos positivos en el comportamiento, en variables de la fermentación ruminal, ni en la concentración de progesterona.

Algunos investigadores<sup>(27)</sup> consideraron que la deficiencia de proteína podría afectar la respuesta al cultivo microbiano, sin embargo los resultados no mostraron esa respuesta. En vacas lecheras se trató de probar si la falta de respuesta al cultivo de

**Cuadro 2. Efectos principales del nivel de proteína sobre el comportamiento de vaquillas Holstein**

	Proteína (%)			EE
	12	14	16	
Condición corporal	2.58	2.61	2.66	0.238
Consumo de MS, kg/día	10.51 <sup>a</sup>	9.89 <sup>b</sup>	10.31 <sup>ab</sup>	0.420
GDP, kg/día	0.906	0.958	0.972	0.140
Conversión	11.73	10.44	10.72	1.543

GDP= ganancia diaria promedio

ab Valores con distinta literal son diferentes ( $P < 0.01$ )

**Cuadro 3. Efectos principales del tipo de aditivo en el comportamiento de vaquillas Holstein**

	Tratamientos			EE
	Testigo	Levadura	Ionóforo	
Condición corporal	2.69	2.63	2.52	0.238
Consumo MS kg/día	10.38	10.37	9.97	0.420
GDP kg/día	0.986	0.954	0.941	0.140
Conversión	10.79	11.03	11.07	1.543

GDP= ganancia diaria promedio

ADITIVOS Y NIVELES DE PROTEÍNA PARA VAQUILLAS HOLSTEIN

levadura estaba asociada a la deficiencia de proteína sobrepasante, lo cual tampoco fue comprobado<sup>(28)</sup>. Con relación al efecto benéfico de la levadura sobre el flujo de aminoácidos<sup>(7,8)</sup>, no ha sido posible confirmar este efecto<sup>(29)</sup>.

La falta de resultados consistentes con levaduras puede estar asociada a la interacción de la calidad de fibra<sup>(28)</sup> y el nivel dietario<sup>(30)</sup> y sus efectos en la digestibilidad. Otro aspecto que no ha sido considerado, es que la respuesta al cultivo microbiano puede estar en función de las condiciones de salud de los animales<sup>(31)</sup>. La falta de consistencia de respuesta a *S. cerevisiae* debe considerarse seriamente, ya que su uso puede incrementar los costos de producción sin beneficios a los productores.

Los efectos benéficos de la monensina sódica han sido revisados y generalmente mejoran la eficiencia de utilización del alimento por una reducción en el consumo sin cambios en la ganancia de peso, debido

a los efectos en la reducción de la metanogénesis y por un incremento en la concentración de propionato<sup>(4)</sup>. El efecto ahorrador de proteína podría deberse a la reducción en la población de protozoarios<sup>(32,33,34)</sup>. Se han mencionado estudios donde la monensina reduce el consumo sin afectar la ganancia de peso<sup>(35)</sup>, sin embargo hay reportes donde mejora la ganancia de peso<sup>(36)</sup> o inclusive el consumo<sup>(37)</sup>, o bien donde no hay respuesta<sup>(38,39)</sup>, como en este estudio.

Con relación a estudios donde combinaron niveles de proteína y monensina, se ha indicado que los beneficios en ganancia y en eficiencia de utilización de nitrógeno son más marcados en dietas con 16 a 17 % PC que con 13 %, y la respuesta es mayor con dietas de pasta de soya en relación con urea<sup>(36)</sup>, por lo que el ahorro de aminoácidos puede estar en función de la forma de los compuestos nitrogenados dietarios (por ejemplo: nitrógeno no proteico vs proteína), lo cual podría

**Cuadro 4. Características de la lisina y la metionina en las raciones experimentales**

	Nivel de proteína (% MS)		
	12	14	16
Relación de lisina:metionina	3.4	3.6	3.6
Proteína absorbible, %			
Metionina	2.21	2.12	2.16
Lisina	7.54	7.77	7.84
Aminoácidos esenciales, %			
Metionina	4.00	3.88	3.99
Lisina	13.74	14.15	14.30
Proteína metabolizable			
Microbiana, g/día	292	265	274
Dietaria, g/día	881	1023	1193

explicar la falta de respuesta en el presente experimento.

Se ha demostrado que los cambios en el flujo de aminoácidos por el ionóforo se dan sólo en períodos cortos de administración, pero la adaptación a largo plazo no muestra efectos<sup>(37)</sup>, lo cual podría explicar la falta de respuesta en el trabajo, que duró 190 días. Estas consideraciones son importantes al decidir el uso de un ionóforo en dietas para vaquillas.

La evaluación de las raciones por medio de los modelos de estimación de proteína digestible en intestino o metabolizable, es una de las herramientas actuales con que cuenta el nutriólogo<sup>(40)</sup>. Los requerimientos estimados de aminoácidos metabolizables para las vaquillas del estudio están entre 3.9 a 7.5 g/día de lisina y de 9.8 a 18 g/día de metionina<sup>(12,15)</sup>. El aporte estimado de lisina metabolizable fue de 48, 62 y 68 g/día para las dietas de 12, 14 y 16 % PC, mientras que el aporte de metionina fue de 14, 17 y 19 g/día respectivamente, lo cual explica la falta de respuesta entre las raciones experimentales. Las tres raciones estaban dentro de la relación recomendada de lisina:metionina (3.1-3.4:1), aún cuando la lisina (15 a 16 %) y la metionina (5.0 a 5.5 %) expresada como porcentaje de los aminoácidos esenciales, estaban debajo de los niveles recomendados (Cuadro 4).

Los resultados de este estudio son similares a otros<sup>(41)</sup>, y coinciden en que se pueden usar distintos niveles de proteína cubriendo los requerimientos de lisina y metionina. Se ha demostrado que cuando el consumo de proteína es mayor a 0.589 kg PC/día<sup>(41)</sup> no se observan diferencias para niveles de proteína dietaria.

## CONCLUSIONES

No existe beneficio al usar aditivos como *Saccharomyces cerevisiae* y monensina sódica en raciones para vaquillas de reemplazo y no hubo efectos benéficos en el aprovechamiento de la proteína. Se pueden usar niveles de 12 a 16 % de proteína cruda en raciones para vaquillas, si los aminoácidos metabolizables cubren los requerimientos estimados de lisina y metionina.

## USE OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE AND MONENSIN IN RATIONS WITH DIFFERENT PROTEIN LEVELS FOR HOLSTEIN HEIFERS

### ABSTRACT

Zaragoza HC, Ayala OJ, Mendoza MGD. Tec Pec Mex 2001;39(3):207-214. It has been reported that ionophores and yeast culture can modify duodenal amino acid flow, therefore those additives were included in heifers rations with three levels of protein. Twenty seven Holstein heifers were individually fed (189 kg body weight), 10 months of age according to a completely randomized design with a 3 x 3 factorial arrangement, protein levels (12, 14 and 16 % CP), and additives (none, 10 g/d of *Saccharomyces cerevisiae*, and 30 ppm monensin). There was no interaction among protein level and feed additive. Feed additives did not affect dry matter intake, daily gain, feed conversion or body condition. Dry matter intake was reduced with the medium protein level, however, no differences were observed in the rest of the variables. Estimation of metabolizable lysine and methionine indicated that requirements were met. Lack of interaction between feed additives and protein level indicates that amino acid flow was not altered. Heifers can be fed with rations with 12 % CP if requirements of metabolizable amino acids are met.

**KEY WORDS:** Heifers, Protein, Yeast culture, Monensin.

## ADITIVOS Y NIVELES DE PROTEÍNA PARA VAQUILLAS HOLSTEIN

### LITERATURA CITADA

1. Herrera HJG, Mendoza MGD, Hernández GA. La ganadería familiar en México. Aguascalientes, México: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática; 1998.
2. Villareal GJR. El impacto social y económico de la ganadería lechera en la región lagunera. México: Grupo Industrial Lala; 1998.
3. Ramos JA, Mendoza MGD, Aranda IE, García BC, Bárcena GR, Alanís RJ. Escape protein supplementation of growing steers grazing stargrass. *Anim Feed Sci Technol* 1998;(70):257-264.
4. Chalupa W. Degradation of amino acids by mixed rumen microbial population. *J Anim Sci* 1976;(43):828-835.
5. Klopfenstein T, Stock R, Britton R. Relevance of bypass protein to cattle feeding. *Prof Anim Sci* 1985;(1):27-32.
6. Schelling GT. Monensin mode of action in the rumen. *J Anim Sci* 1984;(58):1518-1527.
7. Erasmus LJ. Effect of Yea-Sacc, yeast culture on microbial protein in the rumen nitrogen flow to the duodenum of dairy cattle. Proceeding Alltech's seventh annual symposium. Biotechnology in the feed industry, Nicholasville, Kentucky, USA. 1991:30-42.
8. Erasmus LJ, Botha PM, Kister A. Effect of yeast culture supplement on production rumen fermentation and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J Dairy Sci* 1992;(75):3056-3065.
9. Merchen NR, Titemeyer EC. Manipulation of amino acid supply to the growing ruminant. *J Anim Sci* 1992;(70):3238-3246.
10. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen para adaptarlo a las mediciones de la República Mexicana. México D.F.: Instituto de Geografía UNAM; 1981.
11. INRA. Ruminant nutrition. Recommended allowances and feed tables. London, England: John Libbey Eurotext; 1989.
12. NRC. National Research Council. Nutrient requirements for dairy cattle. 6th ed. Washington DC, USA: National Academy Press; 1989.
13. AOAC. Official methods of analysis. 15<sup>th</sup> ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists. 1990.
14. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1991;(74):3583-3597.
15. Degussa. Mepro M85 Dairy Ration Evaluator. USA: Degussa corporation; 1997.
16. NRC. National Research Council. The nutrient requirements of beef cattle. 7th ed. Washington DC, USA: National Academy Press; 1989.
17. Kertz AF, Reutzel F, Barton BA, Ely RL. 1997. Body weight, body condition score, and wither height of prepartum Holstein cows and birth weight and sex of calves by parity: A database summary. *J Dairy Sci* 1997;(80):525-529.
18. SAS. SAS User's Guide: Statistics (version 5 ed.). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 1985.
19. Wallace RJ. Ruminant biotechnology and ruminant nutrition: progress and problems. *J Anim Sci* 1994;(72):2999-3003.
20. Williams PEV, Tait CAG, Innes GM, Newbold CJ. Effects of inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J Anim Sci* 1994;(69):3016-3022.
21. Mir Z, Mir PS. Effect of addition of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on growth and carcass quality of steers fed high-forage or high-grain diets on feed digestibility and *in situ* degradability. *J Anim Sci* 1994;(72):537-545.
22. Adams DC, Gaylean ML, Kiesling HE, Wallace JD, Finker MD. Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. *J Anim Sci* 1981;(53):780-789.
23. Phillips WA, Von Tungeln DC. The effect of yeast culture on the post stress. *Nutr Rep Int* 1985;(32):287-294.
24. Drennan MJ, Moloney A. Effect of yeast culture on growth of beef cattle fed on grass silage plus barley based concentrates. *Int J Agric Food Res* 1993;(32):125-132.
25. Coronel RU. Influencia de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en las variables productivas de vaquillas de reemplazo [tesis maestría]. Montecillo, Texcoco, México. Colegio de Postgraduados. 1999.
26. Carera EJ, Mendoza MGD, Aranda IME, García BCM, Bárcena GJR, Ramos JJA. *Saccharomyces cerevisiae* and nitrogenous supplementation in growing steers grazing tropical pastures. *Anim Feed Sci Technol* 2000;(83):49-55.
27. Cordova CSP, García-Bojalil CM, Sánchez-Torres MT, Mendoza MGD, Suárez OME, Cordero MJL, Martínez-García JA. Efecto del nivel de proteína degradable y adición de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el comportamiento de vacas Holstein [resumen]. XXXIV Reunión nacional de investigación pecuaria. Querétaro Qro. 1998:11.

28. Roa ML, Bárcena GR, González MS, Mendoza MGD, Ortega CME, García BCM. Effect of fiber source and a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*<sup>1026</sup>) on digestion and the environment in the rumen of cattle. *Anim Feed Sci Technol* 1997;(64):327-336.
29. Arcos-García JL, Castrejón PF, Mendoza MGD, Pérez GEP. Effect of two commercial yeast cultures with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. *Livest Prod Sci* 2000;(63):153-157.
30. Plata PF, Mendoza MGD, Bárcena GR, González MS. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw diets. *Anim Feed Sci Technol* 1994;(49):203-210.
31. Cole NA, Purdy CW, Hutchenson DP. Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. *J Anim Sci* 1992;(70):1682-1690.
32. Mendoza MGD, Britton RA, Stock RA. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J Anim Sci* 1993;(71):1572-1578.
33. Arakaki LC, Stahringer RC, Garret JE, Dehority BA. The effects of feeding monensin and yeast culture, alone or in combination, on the concentration and generic composition of rumen protozoa in steers fed on low-quality pasture supplemented with increasing levels of concentrate. *Anim Feed Sci Technol* 2000;(84):121-127.
34. Lana R, Russell JB. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intake. *J Anim Sci* 1997;(74):224-229.
35. Mendoza PS, Plata PF, Ricalde VR, Mendoza MG. Efecto del *Saccharomyces cerevisiae*<sup>1026</sup> y monensina sódica en el consumo de alimento y ganancia de peso en ovinos en crecimiento [resumen]. XX Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco Gro. 1996:509.
36. Zinn RA, Bórquez JL. Influence of sodium bicarbonate and monensin utilization of a fat-supplemented high energy growing-finishing diet by feedlot steers. *J Anim Sci* 1993;(71):18-25.
37. Stock RA, Sindt MH, Parrot JC, Goedeken FG. Effects of grain type, roughage level and monensin level on finishing cattle performance. *J Anim Sci* 1990;(68):3382-3391.
38. Tuori M, Kausteñ KV, Huhhtanen. Comparison of the protein evaluation systems of feeds for dairy cows. *Livest Prod Sci* 1998;(55):33-46.
39. Hussein HS, Berger LL. Feedlot performance and carcass characteristics of Holstein steers as affected by source of dietary protein level and ruminally protected lysine and methionine. *J Anim Sci* 1995;(73):3503-3509.
40. Huntington G, Poore M, Hopkins B, Spears J. Effect of ruminal protein degradability on growth and N metabolism in growing steers. *J Anim Sci* 2000;(75):533-541.