

## COMPARACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE TSH Y T4 LIBRE EN BOVINOS

*J. H. Osorio<sup>1,2\*</sup>, J. Vinasco<sup>1</sup>*

*Artículo recibido: 27 de noviembre de 2013 • Aprobado: 10 de octubre de 2015*

### RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los niveles de TSH y T4 libre (T4L) en bovinos, diferenciados por género y edad, y conocer su comportamiento frente a dichas variables. Se obtuvieron 133 muestras de sangre de bovinos F1 en estado de ayuno y con ellas se establecieron cuatro grupos (36 machos y 20 hembras menores de 18 meses y 47 machos y 30 hembras mayores de 24 meses). Se determinaron los niveles de TSH y T4L mediante inmunoensayo enzimático. Los valores promedio de TSH ( $\mu\text{UI/ml}$ ) fueron de 1,86 para las hembras jóvenes y adultas, 1,88 para los machos jóvenes y 1,99 para los machos adultos. El valor P del test F fue mayor a 0,05 en todos los grupos y, por lo tanto, no hay diferencia estadísticamente significativa, con una confiabilidad del 95%. Los valores promedio de T4L (ng/dl) para hembras jóvenes, hembras adultas, machos jóvenes y machos adultos fueron de 0,84; 0,62; 0,67 y 0,85, respectivamente. El valor P del test F fue menor a 0,05 en todos los grupos, indicando diferencia estadísticamente significativa, con 95% de confiabilidad. En conclusión, no se encontraron efectos de sexo y edad sobre las concentraciones de TSH, mientras que los niveles de T4L exhiben diferencia significativa entre estas variables; en efecto, entre los bovinos jóvenes, las hembras tienen niveles más elevados; por su parte, en los adultos, son los machos los que presentan valores superiores.

**Palabras clave:** tiroides, TSH, T4L, bovinos.

**Abreviaturas usadas:** TSH: hormona estimulante de la tiroides; T3: triyodotironina; T4: tiroxina.

### TSH AND FREE T4 SERUM LEVELS COMPARISON IN CATTLE

#### ABSTRACT

The present study was aimed to determine the levels of TSH and free T4 (T4L) in cattle differentiated by gender and age, and know their correlation with these variables. Blood samples of 133 bovines F1 were obtained in fasting state, establishing four groups (36 males and 20 females under 18 months and 47 males and 30 females over 24 months). Levels of TSH and free T4 were measured using enzymatic immunoassay. The average of TSH values ( $\mu\text{UI/ml}$ ) were 1.86 for young and adult females, 1.88 for young males, and 1.99 for adult males. The P-value of test F was greater to 0.05 in all groups; therefore,

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigación en Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas. Calle 65 nro. 26-10, Manizales (Colombia).

<sup>2</sup> Laboratorio de Investigación en Metabolismo, Universidad de Manizales. Cr. 9a nro. 19-03, Manizales (Colombia).

\* Autor para correspondencia: jose.osorio\_o@ucaldas.edu.co

there is not statistically significant difference, with a 95% confidence. The average of free T4 values (ng/dl) for young females, adult females, young males and adult males were 0.84; 0.62; 0.67 and 0.85 respectively. The P-value was less than 0.05 in all groups, indicating a statistically significant difference, with a confidence of 95%. In conclusion, we found no effect of sex and age on concentrations of TSH; instead, free T4 levels show statistically significant difference between these variables, finding in the young animals, that females have higher T4 levels, and in adults, males present higher values of T4.

**Key words:** Thyroid, TSH, FT4, cattle.

**Abbreviations used:** TSH: thyroid stimulating hormone; T3: triiodothyronin; T4: thyroxine.

## INTRODUCCIÓN

La glándula tiroides consta de unidades estructurales y funcionales llamadas folículos. En ellos se producen y sintetizan las hormonas tiroideas mediante yodación de residuos de tirosina en la molécula de tiroglobulina (glicoproteína yodada); su mecanismo de acción ha sido informado por varias observaciones clínicas, así como en modelos animales (Brent 2012). Dicha hormona es esencial para el desarrollo normal, el crecimiento, la diferenciación neuronal, la maduración y la regulación metabólica en los mamíferos (Brent 2012; Díez-Monforte *et al.* 1993). Su papel fundamental en la regulación de la termogénesis y el metabolismo basal, es dado por su acción sobre los genes de proteínas involucradas en los procesos de óxido-reducción mitocondrial y de disipación de calor (Cunningham y Klein 2009; Venditti 1997; Zaninovich 2001), ya que juega un rol importante, tanto en la termogénesis obligatoria (estimula varios procesos biológicos implicados en la transducción de energía dentro de los tejidos), como en la termogénesis facultativa (se altera la producción de calor del cuerpo por la existencia de ciertas manifestaciones clínicas asociadas tales como hipotiroidismo, hipertiroidismo y tirotoxicosis) (Silvestri *et al.* 2005); ade-

más, regula la acción de la calcitonina que, junto con la paratohormona, mantienen la homeostasis del calcio y controlan su depósito y absorción a nivel del hueso, así como su excreción a nivel renal y su absorción en el tracto digestivo (Schenck 2007). Igualmente, se requiere para la metamorfosis de los anfibios (Furlow y Neff 2006; Tata 2011). Las secreciones de la glándula tiroides también estimulan el consumo de oxígeno y la síntesis de proteínas por la glándula mamaria, concomitantemente con el aumento de la producción de leche (Cabell y Esbenshade 1990).

En el ganado lechero las hormonas tiroideas resultan de particular importancia en la fisiología de la reproducción y la lactancia (Morales y Rodríguez 2005), existiendo correlaciones significativas entre los niveles de hormonas tiroideas y algunos parámetros reproductivos como el índice de fecundidad, el intervalo parto-concepción y el intervalo interpartos; así, se constatan niveles de triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) inferiores en vacas con baja eficiencia reproductiva, siendo T4 la hormona que presenta una correlación negativa y significativa (Díez-Monforte *et al.* 1993). Por otro lado, la actividad tiroidea también puede afectar la ganancia de peso corporal a través de la alteración

de la tasa metabólica basal en los bovinos (Thrift *et al.* 1999).

El principal estímulo de la función tiroidea es la hormona tirotrópica (TSH), la cual es sintetizada y segregada por la hipófisis anterior, regulando las concentraciones séricas de las hormonas tiroideas mediante un sistema clásico de retroalimentación negativa (Chiamolera y Wondisford 2009; Gonzáles-Vicente 2000; Ramos-Rivero 1999), ya que un aumento en los niveles de dichas hormonas disminuye la secreción de TSH y el déficit de las mismas aumenta su secreción (Gonzáles-Vicente 2000; Ramos-Rivero 1999); también regula la captación de yoduro mediada por el cotransportador de sodio/yoduro (Brent 2012).

La secreción insuficiente de T4 y T3 puede provocar un estado de hipotiroidismo, el cual es el trastorno tiroideo más común encontrado en los rumiantes (Gupta *et al.* 2010), siendo el pastoreo de forrajes con bajas concentraciones de yodo, la deficiencia de selenio y la ingestión de plantas bociogénicas, las tres causas más comunes de hipotiroidismo clínico en esta especie (Osorio y Correa 2013). Los signos clínicos varían de acuerdo con los diversos efectos de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo celular, haciendo que los rumiantes sean menos resistentes a las infecciones (Gupta *et al.* 2010). Por lo general, y como se mencionó anteriormente, se presentan trastornos reproductivos como: partos con crías muertas, crías débiles, abortos, mortalidad neonatal aumentada, gestación prolongada, alteración de los ciclos estrales e infertilidad. También ocasiona crecimiento deficiente y alteraciones en el desarrollo neurológico de los animales jóvenes (Matamoros *et al.* 2003; Osorio y Correa 2013), con consecuencias negativas para la salud, la producción y la reproducción animal.

Finalmente, las concentraciones sanguíneas de las hormonas tiroideas se ven influenciadas por diversos factores como el sexo, la edad, algunas enfermedades, balance energético, yodo, selenio, estado fisiológico (gestación, lactancia), estrés y fármacos (Matamoros *et al.* 2003). Así mismo, se ha señalado que existe un efecto racial para las concentraciones de las hormonas tiroideas en bovinos (Campos *et al.* 2004; Campos-Gaona y Giraldo 2008). Aunque se ha reportado que dichas concentraciones se ven influenciadas por la ingesta de energía (Kühne *et al.* 2000), Martínez *et al.* (2001) indican que la dieta no altera los niveles séricos de T3 y T4.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles de TSH y T4L en bovinos diferenciados por género y edad, y conocer su comportamiento frente a dichas variables, teniendo en cuenta que las hormonas tiroideas son el principal mecanismo de regulación del consumo de oxígeno y modulador del crecimiento en bovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron 133 muestras de sangre de bovinos mestizos F1 (*Bos indicus* por *Bos taurus*) en algunos predios de las localidades de Santagueda y Supía (Caldas, Colombia), Quinchía (Risaralda, Colombia) y Cartago (Valle del Cauca, Colombia). Los animales seleccionados en el estudio presentaban un adecuado plan sanitario (desparasitados y con vacunas al día) y una condición corporal entre 3 y 4 (escala de 1 a 5); no se incluyeron hembras preñadas. Fueron conformados cuatro grupos, discriminados según género y edad (36 machos y 20 hembras menores de 18 meses, y 47 machos y 30 hembras mayores de 24 meses).

La toma de las muestras se realizó en horas de la mañana mediante venopunción en la yugular, fueron recolectadas en tubos

Vacutainer® sin anticoagulante. Se centrifugaron a 3.500 rpm en una centrífuga Thermo Multispeed® durante 15 minutos y, posteriormente, fue extraído el suero. Para cada muestra se determinaron las concentraciones circulantes de TSH y T4 libre.

En la determinación de T4L se utilizó la prueba de inmunoensayo enzimático competitivo (Free T4 AccuBind ELISA Kits: Monobind Accubind ELISA Microwells Free Thyroxine (FT4) Test System Product Code: 1225-300). Siguiendo las indicaciones del fabricante, el rango de los analitos empleados en las curvas estándares fue de 0; 0,45; 1,10; 2,00; 5,00 y 7,40 ng/dL (Monobind Inc., 2015); los sueros fueron colocados en contacto con una fase sólida que contenía anticuerpos contra la T4 a la cual se le agregó el conjugado compuesto por T4L unido a peroxidasa de rábano (HRP) para formar una reacción de competición por los sitios de unión. La lectura se hizo en un equipo lector de micro ELISA (Titertek Multiscan™) a una absorbancia de 450 nm. Las absorbancias de los estándares se usaron para obtener la curva de calibración y determinar las concentraciones de T4L de las muestras.

Para la determinación de los niveles de TSH se utilizó una prueba de inmunoensayo enzimático colorimétrico tipo sándwich, utilizada para la cuantificación del TSH de origen humano (TSH AccuBind ELISA Kits: Monobind Accubind ELISA Microwells Thyrotropin (TSH) Test System Product Code: 325-300); siguiendo las indicaciones del fabricante el rango de los analitos empleados en las curvas estándares fue 0, 0,5, 2,5, 5, 10, 20, 40  $\mu$ UI/ml (Monobind Inc, 2015). Así, a una placa de 96 pozos que tenía unidos anticuerpos monoclonales contra la TSH, en una interacción estreptavidina-biotina, se le agregó una alícuota de suero obteni-

do de caninos adultos y una alícuota de conjugado compuesta de un anticuerpo policlonal contra la TSH unido a la peroxidasa de rábano; con ello se indujo una reacción entre antígeno y anticuerpo en forma de un complejo tipo sándwich. La lectura se hizo en un fotómetro lector de micro ELISA (Titertek Multiscan™) a una longitud de onda de 450 nm.

Los kit para T4L y TSH fueron validados para su uso en muestras de bovinos en nuestro laboratorio, utilizando sueros y plasma sanguíneo, y obteniendo curvas de paralelismo apropiadas. En la validación se trabajó con 50 muestras por triplicado en mediciones intradía e interdía, obteniéndose un coeficiente de variación de 8% y 9%, respectivamente.

Las comparaciones se realizaron estableciendo cuatro grupos de acuerdo con el género y la edad, de la siguiente manera: 1) hembras jóvenes vs. hembras adultas; 2) machos jóvenes vs. machos adultos; 3) hembras jóvenes vs. machos jóvenes y, 4) hembras adultas vs. machos adultos.

Los resultados fueron analizados a través del programa Stat Graphics® Plus 5.1.; mediante el módulo Stat Advisor, se realizó un análisis de varianza ANOVA simple, obteniendo el promedio, la varianza, la desviación estándar y el rango mínimo y máximo para cada variable (TSH y T4L) en cada uno de los cuatro grupos citados, en los cuales se aceptó diferencia estadísticamente significativa cuando P valor es <0,05. La probabilidad fiducial, se evaluó por intervalos de confianza (IC  $\pm$  95%).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico muestra que los niveles de TSH no difieren entre los cuatro grupos analizados. Se hallaron valores (en  $\mu$ UI/ml) para las hembras jóvenes de 1,86; 1,13; 2,77 y 0,48 para promedio,

mínimo, máximo y desviación estándar, respectivamente. En el mismo orden, los valores de TSH para las hembras adultas fueron de 1,86; 0,25; 3,92 y 0,75. En los machos jóvenes fueron de 1,88; 1,18; 3,5 y 0,60, y para machos adultos 1,99; 1,24; 3,97 y 0,56 (Tabla 1). El valor P del test F fue mayor o igual a 0,05 en todos los grupos (Tabla 2); por lo tanto, no hay

diferencia estadísticamente significativa según género y edad, analizado con un nivel de confiabilidad del 95% y confirmando lo reportado por Paulíková-Iveta *et al.* (2011) quienes desarrollaron estudios dependientes de la edad que indican que las concentraciones medias de TSH no presentan cambios significativos.

**TABLA 1.** Valores de TSH en bovinos ( $\mu\text{UI/ml}$ ).

	Hembras $\leq 18$ meses	Hembras $\geq 18$ meses	Machos $\leq 18$ meses	Machos $\geq 18$ meses
Promedio	1,86	1,86	1,88	1,99
Mínimo	1,13	0,25	1,18	1,24
Máximo	2,77	3,92	3,5	3,97
De	0,48	0,75	0,60	0,56
Varianza	0,23	0,56	0,36	0,31

De: Desviación estándar.

**TABLA 2.** Valores de P (significancia estadística) para TSH ( $\mu\text{UI/ml}$ ) y T4L (ng/dl) en bovinos según género y edad.

	TSH	T4L
HA vs. HJ	0,9722	0,0020*
MA vs. MJ	0,3640	0,0238*
HJ vs. MJ	0,9063	0,0111*
HA vs. MA	0,3481	0,0097*

HA: hembras adultas. HJ: hembras jóvenes. MA: machos adultos. MJ: machos jóvenes.

\*Indica diferencia estadísticamente significativa.

**TABLA 3.** Valores de T4L en bovinos (ng/dl).

	Hembras $\leq 18$ meses	Hembras $\geq 18$ meses	Machos $\leq 18$ meses	Machos $\geq 18$ meses
Promedio	0,84	0,62	0,67	0,85
Mínimo	0,53	0,17	0,19	0,23
Máximo	1,53	0,97	1,1	1,82
De	0,25	0,19	0,23	0,44
Varianza	0,06	0,04	0,05	0,19

De: Desviación estándar.

Los valores de T4L (ng/dl) en las hembras jóvenes fueron de 0,84; 0,53; 1,53 y 0,25, respectivamente para promedio, mínimo, máximo y desviación estándar; en el mismo orden, los valores de T4L para las hembras adultas fueron de 0,62; 0,17; 0,97 y 0,19. Para los machos jóvenes de 0,67 0,19; 1,1 y 0,23 y para machos adultos 0,85; 0,23; 1,82 y 0,44 (Tabla 3). El valor P del test F fue menor a 0,05 en todos los grupos (Tabla 2), lo que indica diferencia estadísticamente significativa, con una confiabilidad del 95%.

Se han evidenciado efectos de la edad sobre los valores de T3 y T4 en bovinos influidas por la ingesta de energía en el ganado vacuno adulto y en terneros de al menos 1 semana de edad (Kühne *et al.* 2000). Igualmente, se ha reportado que las concentraciones de las hormonas tiroideas aumentan con la edad gestacional (Cassar-Malek *et al.* 2007). Sin embargo, Campos *et al.* (1993) indican que dichas concentraciones no presentan diferencias durante los tres períodos de gestación en las madres, y contrario a ello, en los fetos, estas aumentan a medida que avanza la gestación, siendo significativamente mayores en el último trimestre, lo que podría confirmar su participación en el crecimiento y desarrollo animal.

Por su parte, varios estudios han demostrado que los valores de las hormonas tiroideas descienden gradualmente y se estabilizan a medida que la edad aumenta (Colmenarez *et al.* 2001; Campos-Gaona y Giraldo 2008; Rowntree *et al.* 2004), siendo las concentraciones mayores en el día 0 después del parto (Rowntree *et al.* 2004; Rijnberk y Kooistra 2010) y mostrando concentraciones más altas en novillas que en vacas (Campos *et al.* 2004), lo cual concuerda con los resultados encontrados en el presente trabajo,

ya que los valores de T4L fueron mayores en las hembras jóvenes comparadas con las hembras adultas. Contrario a ello, los machos adultos presentaron concentraciones más altas al compararlos con los machos jóvenes. Según Rijnberk y Kooistra (2010), las hembras presentan mayores concentraciones de T4 frente a los machos, en el presente estudio dicho reporte coincide solo con en el grupo de los jóvenes, ya que entre los adultos, las concentraciones de esta hormona es superior en los machos.

## CONCLUSIÓN

Respecto de las concentraciones de TSH no se encontraron efectos de sexo y edad. Contrario a ello, los niveles de T4L muestran una diferencia estadísticamente significativa, pues en los bovinos jóvenes las hembras tienen niveles más elevados, mientras que en los adultos son los machos quienes presentan valores superiores.

Dado que en bovinos es escasa la literatura que reporte los niveles séricos de TSH, se deben realizar investigaciones adicionales que incluyan este parámetro con el fin de referenciar y establecer dichas concentraciones en esta especie.

## REFERENCIAS

- Brent GA. 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 122(9): 3035-3043.
- Cabell SB, Esbenshade KL. 1990. Effect of feeding thyrotropin-releasing hormone to lactating sows. *J Anim Sci.* 68: 4292-4302.
- Campos R, Díaz F, Wilches M. 1993. Hormonas tiroideas durante la gestación: niveles séricos en la madre y en el feto. *Acta Agron.* 43(1/4): 156-159.
- Campos R, Díaz-González FH, Rodas A, Cruz C. 2004. Thyroid hormones in native Colombian bovine breeds. *Rev Bras Ci Vet.* 11(3): 174-177.

- Campos-Gaona R, Giraldo L. 2008. Efecto de la raza y la edad sobre las concentraciones de hormonas tiroideas T3 y T4 de bovinos en condiciones tropicales. *Acta Agron.* 57(2): 137-141.
- Cassar-Malek I, Picard S, Kahl B, Hocquette JF. 2007. Relationships between thyroid status, tissue oxidative metabolism, and muscle differentiation in bovine fetuses. *Domest Anim Endocrinol.* 33(1): 91-106.
- Chiamolera MI, Wondisford FE. 2009. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology.* 150(3): 1091-1096.
- Colmenarez D, Leonardi F, Bravo M. 2001. Niveles de T3 y T4 en bovinos Holstein de 2 hasta 24 semanas de edad. *Gaceta de Ciencias Veterinarias.* 7(1): 24-29.
- Cunningham JG, Klein BG. 2009. *Fisiología Veterinaria.* 4a. ed. Barcelona (España): Elsevier Saunders. p. 430-436.
- Díez-Monforte C, Fernandez-Celadilla L, Abad-Gavin. 1993. Hormonas tiroideas en ganado vacuno de aptitud lechera: Relación con la actividad reproductiva. *Arch Zootec.* 42(160): 435-440.
- Furlow JD, Neff ES. 2006. A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis. *Trends Endocrinol Metab.* 17(2): 38-45.
- González-Vicente G. 2000. Terapia de suplementación tiroidea y de suspensión de TSH. *Boletín de la escuela de medicina.* 29(3). [Internet]. Universidad Católica de Chile: Chile. [Citado en 2013 noviembre 15]. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/tiroidea/TerapiaSuplementacion.html>
- Gupta B, Moolchandani A, Sareen M. 2010. Effect of induced Hypothyroidism on plasma cholesterol and bilirubin in Marwari Sheep. *Veterinary World.* 3(7): 323-325.
- Kühne S, Hammon HM, Bruckmaier RM, Morel C, Zbinden Y, Blum JW. 2000. Growth performance, metabolic and endocrinotraits, and absorptive capacity in neonatal calves fed either colostrum or milk replacer at two levels. *J Anim Sci.* 78: 609-620.
- Martínez Y, Chongo B, Pizarro L, Castillo E. 2001. Una nota acerca de las concentraciones de hormonas tiroideas de toros de ceiba que consumieron *Leucaena leucocephala*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 35(4): 379-381.
- Matamoros R, Contreras PA, Wittwer F, Mayorga MI. 2003. Hipotiroidismo en rumiantes. *Arch med vet.* 35(1): 1-11.
- Morales CA, Rodríguez N. 2005. Hormonas tiroideas en la reproducción y en la producción láctea del ganado lechero: revisión de literatura. *Rev Col Cienc Pec.* 18(2): 136-148.
- Osorio JH, Correa D. 2013. Alteraciones de los niveles de hormonas tiroideas y su influencia en la salud y producción de pequeños rumiantes. *Biosalud.* 12(1): 39-48.
- Paulíková-Iveta, Seidel H, Nagy O, Tóthová-Csilla And Kováč G. 2011. Concentrations of thyroid hormones in various age categories of ruminants and swine. *Acta Veterinaria (Beograd).* 61(5-6): 489-503.
- Ramos-Rivero S. 1999. Interacción entre hormonas tiroideas y el sistema igfs/igfbps: mecanismos moleculares. [Tesis doctoral] Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. p. 254.
- Rijnberk A, Kooistra. 2010. *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats.* 2ª edición. Alemania. p. 55-79.
- Rowntree JE, Hill GM, Hawkins DR, Link JE, Rincker MJ, Bednar GW, Kreft Jr RA. 2004. Effect of Se on selenoprotein activity and thyroid hormone metabolism in beef and dairy cows and calves. *J Anim Sci.* 82: 2995-3005.
- Schenck PA. 2007. Calcium Homeostasis in Thyroid Disease in Dogs and Cats. *Vet Clin Small Anim.* 37(4): 693-708.
- Silvestri E, Schiavo L, Lombardi A, Goglia F. 2005. Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiol Scand.* 184: 265-283.
- Tata JR. 2011. Looking for the Mechanism of Action of Thyroid Hormone. *J Thyroid Res.* 2011: 1-12.
- Thrift TA, Bernal A, Lewis AW, Neuendorff DA, Willard CC, Randel RD. 1999. Effects of Induced Hypothyroidism or Hyperthyroidism on Growth and Reproductive Performance of Brahman Heifers. *J Anim Sci.* 77: 1833-1843.

- Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T. 1997. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol.* 155: 151-157.
- Zaninovich AA. 2001. Hormonas tiroideas, obesidad y termogénesis en grasa parda. *Medicina.* 61: 597-602.

**Article citation:**

Osorio JH, Vinasco J. 2016. Comparación de los niveles séricos de TSH y T4 libre en bovinos. [TSH and free T4 serum levels comparison in cattle]. *Rev Med Vet Zoot.* 63(2): 87-94. Doi: 10.15446/rfmvz.v63n2.59356.