

EFFECTO DEL ESTRADIOL EN EL PERIODO DE RECONOCIMIENTO MATERNAL DE LA PREÑEZ SOBRE LA SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA EN ALPACAS

Ysaac Chipayo G.¹, Víctor Leyva V.² y Wilber García V.³

ABSTRACT

The effect of oestradiol (E_2) during the maternal recognition of pregnancy (9-11 days after ovulation) was studied in 44 alpacas that were >20 days after delivery. The alpacas were mated with an intact male (>15 minutes) and received 500 IU of hCG to induce ovulation. The females were divided in 3 groups: Group G_1 (n=14) received 0.2 ml i.m. of an A, D and E vitaminic complex on days 8 and 9 post-ovulation. Group G_2 (n=15) received 200 mg of E_2 and 0.2 ml i.m. of the vitamin complex (similar to G_1) on days 8 and 9 post-ovulation. Group G_3 (n=15) received 20 mg of progesterone and 0.2 ml i.m. of the same vitamin complex on day 9 post-ovulation. The females were confronted with a male to evaluate their sexual behavior (accept or denial) and then, transrectal ecography of the ovaries and uterus was conducted on days 2, 8, 13, 19, 27, 30 and 60 post-ovulation. Embryonic survival was higher in G_2 (86.7%) at day 19 in comparison to G_1 (57.1%, $p<0.08$), but without differences with G_3 (73.3%). Follicular dynamics in alpacas with embryonic survival was different at day 2 ($p<0.1$) but not on day 8 relating to those animals with embryonic mortality. The size of the corpus luteum did not have statistical differences between the three groups but was smaller in those with embryonic mortality at day 13 (10.7 ± 1.6 vs. 13.3 ± 1.5 , $p<0.05$) which would show that the luteolysis process began at day 13 in that group. These results suggest that failure in maternal recognition of pregnancy and subsequent embryo mortality were reduced by the oestradiol, and therefore, indicating that oestradiol plays an important role in the process of maternal recognition of pregnancy in alpacas.

Key words: oestradiol, alpaca, maternal recognition, corpus luteum

RESUMEN

El efecto del estradiol (E_2) durante el periodo de reconocimiento maternal de la preñez (días 9-11 post-ovulación) fue estudiado en 44 alpacas con descanso postparto > 20 días. Los animales fueron sometidos a una monta controlada con macho entero (>15 minutos) y se les aplicó 500 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) vía i.m. Los animales fueron divididos en 3 grupos: El grupo G_1 (n=14) recibió 0.2 ml de una solución de vitaminas A, D y E vía i.m. los días 8 y 9 post-ovulación. El grupo G_2 (n=15) recibió 200 mg de E_2 vía i.m. + 0.2 ml de la solución de vitaminas aplicada en G_1 los días 8 y 9 post-ovulación. El grupo G_3 (n=15) recibió 20 mg de progesterona + 0.2 ml de la solución vitamínica el día 9 post-ovulación. Las hembras fueron enfrentadas al macho para evaluar

¹Práctica privada

²Laboratorio de Reproducción y Obstetricia Veterinaria, FMV-UNMSM. E-mail: vleyvav@vet.unmsm.edu.pe

³Estación Experimental del Centro de Investigación IVITA-Maranganí, FMV-UNMSM

el comportamiento sexual de las hembras y paralelamente, se les realizó una ecografía transrectal los días 2, 8, 13, 19, 27, 30 y 60 post-ovulación. La ecografía se realizó para determinar el tamaño del folículo dominante y del cuerpo lúteo, y cambios en los cuernos uterinos compatibles con gestación. La tasa de supervivencia embrionaria a partir del día 19 fue mayor en G₂ (86.7%) con relación a G₁ (57.1%, p<0.08), pero no hubo diferencias con G₃ (73.3%). Este mismo comportamiento se observó en el día 30 y 60. El tamaño de folículo dominante fue menor en el grupo G₁ (6.0 ± 2.4) que en los grupos G₂ (7.5 ± 1.5) y G₃ (8.1 ± 3.2) (p<0.1) en el día 8 post-ovulación. La dinámica folicular fue diferente entre alpacas con supervivencia embrionaria de aquellas con mortalidad embrionaria en el día 2 (p<0.1) pero similar en el día 8. No se encontraron diferencias entre grupos con relación al tamaño del cuerpo lúteo, pero el tamaño fue menor en aquellos con mortalidad embrionaria en el día 13 (10.7 ± 1.6 vs 13.3 ± 1.5, p<0.05), lo que mostraría el inicio de la luteólisis a partir del día 13 en las hembras con mortalidad embrionaria. Estos resultados indican que las fallas en el reconocimiento maternal de la preñez y subsecuentemente la tasa de mortalidad embrionaria fueron reducidas por el efecto del estradiol, sugiriendo que el estradiol juega un papel importante en el proceso del reconocimiento maternal de la preñez en alpacas.

Palabras clave: estradiol, alpaca, reconocimiento maternal, cuerpo lúteo

INTRODUCCIÓN

Las alpacas muestran una alta tasa de mortalidad embrionaria, que puede llegar al 50% dentro de los primeros 35 días de gestación (Fernández-Baca *et al.*, 1970b). Estudios realizados por Leyva y García (1999b) reportan un 12% de mortalidad embrionaria en los primeros 5 días post-ovulación, que estaría causado por un efecto negativo del estradiol sobre el desarrollo del cuerpo lúteo en este periodo (Leyva y García, 2000).

Entre los días 9-11 post-ovulación se suceden cambios hormonales en las hembras preñadas (Aba *et al.*, 1995), mientras que en las hembras vacías se produce la luteólisis (Fernández-Baca *et al.*, 1970a), por lo que se considera que en este periodo se produce el reconocimiento maternal de la preñez en alpacas (Adams *et al.*, 1991; Aba *et al.*, 1995; Novoa y Leyva, 1996).

Se acepta que la prostaglandina es el agente luteolítico en camélidos sudamericanos; sin embargo, los mecanismos que intervienen en el reconocimiento maternal de la

preñez en alpacas son aún desconocidos. En otros rumiantes, como la oveja y la vaca, el aumento de la secreción de estradiol tiene un efecto luteolítico al estimular de manera indirecta la secreción de prostaglandina F_{2α} (Mc Craken, 1984, citado por Hafez, 1996). Por otro lado, los resultados de Leyva y García (2000) sugieren el efecto negativo de los folículos estrogénicos alrededor del periodo de formación del cuerpo lúteo sobre la supervivencia embrionaria de alpacas. Sin embargo, Arainga (2002) reporta haber encontrado folículos grandes (>7 mm) alrededor del día 12 post-ovulación en alpacas con supervivencia embrionaria, mientras que Skidmore *et al.* (1994) sugieren que el estradiol cumple un rol importante en el reconocimiento maternal de la preñez en el *Camelus dromedaris*, otra especie de la familia de las alpacas.

En base a los resultados antes mencionados, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del estradiol sobre la mortalidad embrionaria de alpacas en el periodo del reconocimiento maternal de la preñez (días 9-11 post-ovulación).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio y animales

El trabajo se realizó en el fundo San Luis durante los meses de febrero-marzo del 2001. El fundo pertenece a la Estación Experimental del Centro de Investigación IVITA-Maranganí, Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y se encuentra ubicado en el distrito de Ñuñoa, provincia de Melgar, departamento de Puno, a una altitud aproximada de 4,200 msnm.

Se seleccionaron 44 alpacas adultas hembras (>2 años) con historia de partos anteriores y con un descanso sexual ≥ 20 días post-parto. Los animales tenían conducta manifiesta de celo ante la presencia del macho y un folículo pre-ovulatorio >6 mm detectado por ecografía transrectal ovárica. Todas las hembras seleccionadas recibieron las mismas condiciones de manejo en praderas naturales.

Diseño experimental

Los animales recibieron un servicio (≥ 15 minutos) con macho fértil y se les aplicó 500 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) i.m. para asegurar la ovulación. Las hembras fueron asignadas al azar en los siguientes grupos experimentales:

- G_1 (n=14): Grupo testigo. 0.2 ml de un complejo vitamínico (Vitaminas A, D, E) en vehículo oleoso vía i.m. los días 8 y 9 post-ovulación.
- G_2 (n=15): 200 μ g de estradiol/día, vía i.m. los días 8 y 9 post-ovulación, además del complejo vitamínico del G_1 .
- G_3 (n=15): 20 mg de progesterona (P_4), vía i.m. el día 9 post-ovulación, además del complejo vitamínico del G_1 .

El propósito del complejo vitamínico en el G_1 fue para reproducir el trauma de la inyección. En el G_2 y G_3 para aumentar el volumen de la solución inyectable.

Procedimiento metodológico

El momento de la ovulación se consideró el día 0. Los tres grupos fueron evaluados los días 2, 8, 13, 19, 27, 30 y 60 post-ovulación a través de la observación de la conducta sexual; considerándose como receptivas (adoptan posición de cópula) o no receptivas (rechazo al macho). Inmediatamente después de evaluar el comportamiento sexual, se realizaron ecografías transrectales de ovario y útero, usando un ecógrafo B-mode Aloka 210 equipado con un transductor lineal tipo array de 5 MHz de frecuencia.

Se obtuvieron datos sobre tamaño del folículo dominante y del cuerpo lúteo hasta el día 19 post-ovulación. A partir del día 13 se evaluó la forma de los cuernos uterinos como un indicador de preñez (engrosamiento de las paredes, presencia de vesícula embrionaria y estructuras fetales).

Análisis estadístico

El análisis se realizó con el programa estadístico del SAS (Statistic Analysis System; SAS Institute Inc., 1990). La prueba de análisis de varianza (ANOVA) fue utilizada para analizar la diferencia por efecto de: (a) tamaño de folículo dominante en el día de empadre y en el día 2, 8, 13 y 19 post-ovulación, (b) tamaño de cuerpo lúteo el día 8, 13 y 19 post-ovulación.

La receptividad sexual y la mortalidad embrionaria fueron evaluadas con la prueba Fisher Exacto en los días: -1 (empadre), 2, 8, 13, 19, 27, 30 y 60 post-ovulación.

RESULTADOS

Tasa de supervivencia embrionaria

Todos los animales experimentales (n=44) presentaron cuerpo lúteo con una posible fertilización viable en el día 8 post-ovulación (Cuadro 1). La tasa de supervivencia

Cuadro 1. Tasa de supervivencia embrionaria en alpacas no tratadas (G_1), y tratadas con estradiol (G_2) en el día 8 y 9 post-ovulación y con progesterona (G_3) en el día 9 post-ovulación

Días post-ovulación	G_1 (n=14)	G_2 (n=15)	G_3 (n=15)	Total (n=44)
8	100.0	100.0	100.0	100.0
13	92.9	93.3	73.3	86.3
19	57.1 ^a	86.7 ^b	73.3 ^{a,b}	72.7
27	57.1 ^a	80.0 ^b	73.3 ^{a,b}	70.5
30	50.0 ^a	80.0 ^b	73.3 ^{a,b}	68.2
60	50.0 ^a	80.0 ^b	73.3 ^{a,b}	68.2

a,b Letras distintas en una misma fila muestran diferencias estadísticas significativas (día 19 = $p < 0.08$; día 27, 30 y 60 = $p < 0.1$)

Cuadro 2. Tamaño de folículo dominante (mm \pm d.e.) en alpacas no tratadas (G_1), y tratadas con estradiol en el día 8 y 9 post-ovulación (G_2) y con progesterona en el día 9 postovulación (G_3)

Día de evaluación	G_1 (n=14)	G_2 (n=15)	G_3 (n=15)
Empadre	8.1 \pm 1.6	7.8 \pm 2.0	7.8 \pm 0.8
2 días post-ovulación	6.7 \pm 3.3	5.6 \pm 1.6	6.0 \pm 1.8
8 días post-ovulación	6.0 \pm 2.4 ^a	7.5 \pm 1.5 ^b	8.1 \pm 3.2 ^b
13 días post-ovulación	6.7 \pm 2.0	6.4 \pm 1.8	6.3 \pm 2.4

a,b Letras distintas en una misma fila indican diferencias estadísticas ($p < 0.08$)

embrionaria para el día 19 fue menor en el grupo G_1 (57.1%) mostrando una tendencia significativa ($p < 0.08$) en comparación con el grupo G_2 (86.7%). Esta diferencia se mantuvo similar los días 30 y 60 post-ovulación ($G_1=50\%$, $G_2=80\%$, $G_3=73.3\%$, $p < 0.1$).

Desarrollo folicular

El tamaño del folículo dominante en el momento del servicio fue similar para los tres grupos tratados teniendo en todos los casos un tamaño superior a 6 mm (tamaño pre-ovulatorio).

El tamaño folicular en el día 8 post-ovulación fue menor en el G_1 (6.0 \pm 2.4) que

en el G_2 (7.5 \pm 1.5) y G_3 (8.1 \pm 3.2) ($p < 0.08$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en los días 2 y 13 post-ovulación (Cuadro 2).

Tamaño folicular de acuerdo a la supervivencia embrionaria

Independientemente de los tratamientos, el Cuadro 3 muestra los resultados en relación a la supervivencia y mortalidad embrionaria. El tamaño del folículo dominante en el día de empadre fue similar entre los animales que presentaron mortalidad embrionaria y aquellos con supervivencia embrionaria; sin embargo, fue ligeramente menor en el día 2 en hembras con supervi-

Cuadro 3. Tamaño del folículo dominante (mm \pm d.e.) en diferentes periodos post-ovulatorios en alpacas con supervivencia o mortalidad embrionaria

Día de evaluación	Supervivencia embrionaria (n = 30)	Mortalidad embrionaria (n = 14)
Empadre	7.9 \pm 1.5	7.7 \pm 1.7
2 días post-ovulación	5.7 \pm 2.0 ^a	6.9 \pm 3.0 ^b
8 días post-ovulación	7.2 \pm 2.5	7.1 \pm 3.0
13 días post-ovulación	6.3 \pm 1.6	6.8 \pm 2.7

a,b Diferentes letras en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.1$)

Cuadro 4. Tamaño de cuerpo lúteo (mm \pm d.e) en alpacas no tratadas (G_1), y tratadas con estradiol en el día 8 y 9 post-ovulación (G_2) y con progesterona en el día 9 post-ovulación (G_3)

Día post-ovulación	G_1 (n = 14)	G_2 (n = 15)	G_3 (n = 15)
8	13.5 \pm 2.1	13.1 \pm 1.5	13.7 \pm 1.3
13	12.9 \pm 2.2	12.6 \pm 2.2	12.9 \pm 1.1
19	12.6 \pm 2.2	12.8 \pm 2.6	12.8 \pm 1.6

vencia embrionaria ($p < 0.1$), aunque estas diferencias se perdieron en el día 8.

Desarrollo del cuerpo lúteo

El tamaño del cuerpo lúteo fue similar en los tres grupos, tanto en el día 8 como en el 13 post-ovulación, siendo estos compatibles con el mantenimiento de la preñez (Cuadro 4).

Tamaño del cuerpo lúteo de acuerdo a la supervivencia embrionaria

El tamaño de cuerpo lúteo en diferentes periodos post-ovulatorios en hembras que tuvieron supervivencia o mortalidad embrionaria al final del experimento se muestra en el Cuadro 5. Se observa que el tamaño de cuerpo lúteo fue similar en el día 8 post-

ovulación en ambos grupos; sin embargo, los animales con mortalidad embrionaria mostraron un descenso significativo en el día 13 post-ovulación, en comparación con los que presentaron supervivencia embrionaria ($p < 0.05$).

Receptividad sexual

El comportamiento de receptividad sexual (aceptación) o rechazo en relación a la supervivencia o mortalidad embrionaria en diferentes periodos posteriores a la ovulación se observa en el Cuadro 6. Todas las hembras con supervivencia embrionaria rechazaron al macho a partir del día 8 post-ovulación, en tanto que el 50% de las hembras que llegó a tener mortalidad embrionaria rechazó al macho en el día 8 y el 14.3% en el día 13 post-ovulación.

Cuadro 5. Tamaño del cuerpo lúteo (mm \pm d.e.) en diferentes periodos post-ovulatorios en alpacas con supervivencia y mortalidad embrionaria

Día post-ovulación	Supervivencia embrionaria (n = 30)	Mortalidad embrionaria (n = 14)
8	13.8 \pm 1.6	12.5 \pm 1.3
13	13.3 \pm 1.5 ^a	10.7 \pm 1.6 ^b

a,b Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Cuadro 6. Porcentajes de aceptación y rechazo de machos por hembras en diferentes periodos post-ovulatorios que tuvieron supervivencia o mortalidad embrionaria

Día post-ovulación	Hembras gestantes		Hembras no gestantes	
	Acepta (%)	Rechaza (%)	Acepta (%)	Rechaza (%)
2	56.7	42.3	71.4	28.6
8	0	100.0	50.0	50.0
13	0	100.0	85.7	14.3
19	0	100.0	100.0	0
30	0	100.0	100.0	0

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte, en base a los resultados obtenidos, que sugiere que la administración de estradiol en los días 8 y 9 de la gestación temprana ocasiona un incremento en la tasa de supervivencia embrionaria. La administración del estradiol se hizo alrededor del periodo en que ocurre la disminución de los niveles séricos de P_4 (Aba *et al.*, 1995), y que se presume es el periodo en que se realiza el reconocimiento maternal de la preñez en las alpacas. Estos resultados sugieren que el estradiol puede jugar un rol importante en el proceso del reconocimiento maternal de la preñez, lo cual podría, además, apoyarse en los resultados obtenidos por Arainga (2002) y Skidmore *et al.* (1994) indicados previamente. Estos resultados indicarían un mecanismo similar al que se produce en el caso del cerdo para el reconocimiento maternal de la preñez, donde el estradiol blo-

quea el efecto luteolítico de la prostaglandina F_{2a} (Geiser *et al.*, 1994; Bazer *et al.*, 1986) para asegurar el mantenimiento del cuerpo lúteo y la preñez.

En el presente trabajo se observó que la administración de P_4 en el día 9 post-ovulación produjo una tasa de supervivencia embrionaria (77.3%) mayor que en el grupo control (50.0%). Esto podría ser explicado por el hecho de que la aplicación de P_4 no afecta la vida del cuerpo lúteo maduro, mientras que el efecto contrario se conoce que ocurre en el cuerpo lúteo de reciente formación (antes del día 4 post-ovulación) en ovinos (Thawaites, 1971; Woody *et al.*, 1967), vacunos (Woody *et al.*, 1967) y alpacas (Leyva y García, 1999a). También podría aducirse al efecto positivo de la progesterona exógena cuando se administra entre los días 4 y 5 post-ovulación en alpacas, cuando el cuerpo lúteo se encuentra en la fase de crecimiento sig-

nificativo (Leyva y García, 1999a) y en el día 10-17 en vacas gestantes (Robinson *et al.*, 1989, citado por Hansen, 1997). Estos resultados podrían deberse al efecto de la progesterona sobre el endometrio, estimulando el desarrollo de glándulas secretorias y bloqueando la motilidad endometrial (Hafez, 1996), favoreciendo un mejor desarrollo del embrión y un mejor estímulo en el proceso del reconocimiento maternal de la preñez (Garret *et al.*, 1988, citado por Hansen, 1997).

El grupo G₁ tuvo la mayor tasa de mortalidad embrionaria y el menor promedio de tamaño folicular en el día 8 post-ovulación. Esto concuerda con los resultados de Araínga, (2002) quien sugiere el efecto positivo de la presencia de folículos estrogénicos sobre la supervivencia embrionaria en esta etapa. Por otro lado, al analizar la dinámica del desarrollo folicular en los animales que mantuvieron o perdieron el embrión, se observó que el tamaño del folículo dominante en el día 2 post-ovulación, fue menor en el grupo con supervivencia embrionaria, lo que confirma los resultados de Leyva y García (2000) y Araínga (2002) sobre el efecto negativo de los folículos estrogénicos durante la etapa de formación del cuerpo lúteo (entre los días 0 y 4 post-ovulación). Sin embargo, en el día 13 se produjo un incremento del tamaño del folículo dominante en los animales con supervivencia embrionaria, sugiriendo que estos animales necesitan niveles bajos de estradiol en las etapas de formación del cuerpo lúteo, pero requieren de niveles altos en la etapa del reconocimiento maternal de la preñez.

El 14.3% de las hembras que perdieron el embrión siguieron mostrando rechazo al macho el día 13 post-ovulación, lo que podría deberse a la presencia de un cuerpo lúteo que en la fase de regresión estuvo secretando niveles bajos de progesterona, aunque suficientes para inhibir el retorno al celo en esta etapa.

Se concluye que la administración de estradiol en los días 9-11 post-ovulación redujo la tasa de mortalidad embrionaria en alpacas.

LITERATURA CITADA

1. **Aba, M.; M. Forsberg; H. Kindahl; J. Sumar; L. Edqvist. 1995.** Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Act. Vet. Scand.* 36: 489-498.
2. **Adams, G.P.; J. Sumar; O.J. Ginter. 1991.** Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 24: 127-138.
3. **Araínga, M. 2002.** Estudio del efecto de la GnRH en el proceso del reconocimiento maternal de la preñez (RMP) sobre la supervivencia embrionaria en alpacas (*Lama pacos*). Tesis de Bachillerato. Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 64 p.
4. **Bazer, R.; J. Vallet; R. Roberts; D. Sharp; W. Thatcher. 1986.** Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 76: 841-850.
5. **Fernández-Baca, S.; W. Hansel; C. Novoa. 1970a.** Corpus luteum function in the alpaca. *Biol. Reprod.* 3: 252-261.
6. **Fernández-Baca, S.; W. Hansel; C. Novoa. 1970b.** Embryonic mortality in the alpaca. *Biol. Reprod. Fertil.* 3: 243-251.
7. **Geiser, R.D.; E.C. Short; G.L. Morgan. 1994.** Establishment of pregnancy in domestic farm species. En: *Embryonic mortality in domestic species*. M. Zavy & R. Greisert (eds). CRC Press. England. p 23-49.
8. **Hafez, E. 1996.** Reproducción e inseminación artificial en animales. 6^a ed. p 200-237. Interamericana McGraw-Hill. México D.F.
9. **Hansen, P.J. 1997.** Basic and applied concepts relative to the role of interferon-t in rescue of the bovine corpus luteum from luteolysis. En: *Libro de Resúmenes del I Simposium Internacional en Avances en Reproducción de Rumiantes de la Asociación Peruana de Producción Animal*. Lima.

- 10. Leyva, V; W. García. 1999a.** Efecto de la progesterona exógena sobre la función del cuerpo lúteo en alpacas. En: Res. II Cong. Mund. Camélidos. Cusco. p 87.
- 11. Leyva, V.; W. García. 1999b.** Efecto de la prostaglandina sobre la vida del cuerpo lúteo en alpacas. En: Res. II Cong. Mund. Camélidos. Cusco. p 88.
- 12. Leyva, V.; W. García. 2000.** Efecto del estradiol (E₂) sobre la fertilización y sobrevivencia embrionaria en alpacas. XVII Cong. Nac. Medicina Veterinaria, Cusco Perú. Abst.: 65.
- 13. Novoa, C.; V. Leyva. 1996.** Reproducción en Alpacas y Llamas. Fondo Colaborador Perú-Suiza, CISA/IVITA, Fac. Med. Vet., Univ. San Marcos. Serie Pub. IVITA N° 26: 30 p.
- 14. Skidmore, J.; W. Allen; R. Heap. 1994.** Oestrogen sintesis by the periimplantation conceptus of the one-humped camel (*Camelus dromedaris*). J. Reprod. Fert. 101: 362-367.
- 15. SAS. 1990.** SAS/STAT User's Guide. Version 6. 4th ed. Vol. 1 y 2. SAS Institute Inc. NC. USA.
- 16. Thawaites, C.J. 1971.** Exogenous progesterone and estrous cycle in the ewe. J. Agric. Sci. 77: 147-148.
- 17. Woody, C.O.; N.L. First; A.L. Pope. 1967.** Effect of exogenous progesterone on estrous cycle length. J. Anim. Sci. 26: 139-141.