

**RIPRODUZIONE BOVINA**

# Inseminazione a tempo fisso: ultime novità in tema di sincronizzazione dell'ovulazione

Giovanni Gnemmi, Cristina Maraboli  
Bovinevet, Premosello Chiovenda (VB)

**RIASSUNTO**

La sincronizzazione dell'ovulazione e l'inseminazione a tempo fisso sono uno strumento molto importante per contrastare il calo del tasso di concepimento osservato negli ultimi 50 anni, ma non sono la soluzione del problema che, per la sua multi-fattorialità, richiede un cambio di mentalità e non solamente l'introduzione di piani ormonali più o meno sofisticati. I programmi di sincronizzazione, probabilmente, sono stati parzialmente mal interpretati in questi ultimi 10 anni. Il professionista che vuole utilizzare questi sistemi deve quindi conoscere perfettamente la dinamica follicolare e soprattutto deve sapere cosa sta facendo e perché.

**Parole chiave:** riproduzione, sincronizzazione, bovina da latte.

**SUMMARY****Fixed-time insemination: last news on synchronisation of ovulation**

*Synchronisation of ovulation and fixed-time insemination are important tools to fight the decrease of conception rate in the last 50 years, but they do not represent the solution of the problem which, for its multifactoriality, needs a change of mind and not only the introduction of hormonal plans more or less sophisticated. Synchronisation programmes have been partially misinterpreted in the last 10 years. Should veterinarians want to use these systems, they need to know very well follicular dynamics and, first of all, should know what they are doing and why.*

**Keywords:** reproduction, synchronisation, dairy cow.

**L**a sincronizzazione dell'estro con la prostaglandina per molti anni ha rappresentato l'unica forma di sincronizzazione applicabile in campo. Si può dire che questa sia stata una vera rivoluzione nella gestione riproduttiva moderna: prima dell'avvento della prostaglandina, la luteolisi veniva praticata meccanicamente, attraverso l'enucleazione manuale del corpo luteo. Ovviamente questo processo non poteva applicarsi su vasta scala e, soprattutto, non era scevro da inconvenienti, che talvolta potevano compromettere la stessa efficienza riproduttiva della bovina. A metà degli anni '90, R. Pursley e Milo Wiltbank brevettarono l'OvSynch®, che si può ritenere senza dubbio il padre di tutte le forme di sincronizzazione dell'ovulazione.

Ciò che risalta maggiormente è l'attualità di questo sistema: nonostante siano passati oltre 15 anni dalle prime applicazioni, si conferma come il vero protagonista della scena. Negli anni sono state proposte e applicate diverse varianti, alcune delle quali, come il PreSynch® o il P4/GPG hanno permesso di ottenere ottimi risultati, superando alcuni limiti del sistema.

Oggi la maggior parte degli allevamenti, in ogni parte del mondo, utilizzano questi sistemi; ovviamente vi sono state delle varianti, alcune delle quali hanno permesso di adattare il sistema di sincronizzazione con le necessità dell'allevamento (CoSynch® 48-72), mentre altre hanno invece permesso di ottimizzare i risultati (Doppio OvSynch® lungo e corto, G6G, PreSynch® corto, OvSynch 5 per le manze). Scopo di questo articolo è quello di descrivere lo stato dell'arte in tema di programmi di sincronizzazione, ana-

lizzando le principali modifiche ai piani di sincronizzazione originali.

## Il ciclo ovarico

### 1. Storia

Nel V secolo a. C. Ippocrate non considerava l'ovaio parte integrante della genesi della vita, pensando che la vita generasse dall'incontro tra due tipologie di seme, uno di derivazione maschile (il seme) e uno di derivazione femminile (il sangue mestruale) [1]. Circa un secolo più tardi, Aristotele definisce l'ovaio una "vestigia imperfetta" del testicolo, che però non avrebbe nessuna funzione apparente nella generazione della vita, ma il ruolo dell'apparato riproduttore femminile, sarebbe solamente quello di un contenitore [1]. Nella seconda metà del 1600, De Graaf per la prima volta svela il ruolo dell'ovaio, come organo cardine della riproduzione femminile, ma bisognerà attendere fino al 1827, perché von Baer descriva la cellula uovo presente all'interno di follicoli ovarici di cane [1].

Negli anni '20 del secolo scorso vengono descritti per la prima volta il ciclo ovarico del bovino e le sue correlazioni con l'assetto ormonale (Hammond e McNutt, citati da [1]) ma, per molti anni, la comunità scientifica internazionale credette che il follicolo in ovulazione, alla fine del ciclo ovarico, fosse lo stesso che iniziava la sua maturazione, subito dopo l'ovulazione del follicolo di Graaf de ciclo precedente. Solo negli anni '60 Rajakowski propose un contestatissimo modello di ciclo ovarico a due onde di crescita follicolare, per spiegare il ciclo ovarico del bovino [2]. Questa teoria venne definitivamente confermata solamente con l'avvento dell'ultrasonografia, agli inizi de- ▶▶

gli anni 80; da allora in poi, lo studio della dinamica follicolare ha permesso di arrivare a controllare-modificare la stessa grazie alle terapie ormonali, permettendo, da un lato, importanti risultati sul piano terapeutico (vedere terapia dell'anaestro vero) e, dall'altro, una ottimizzazione dei tassi di concepimento (OvSynch®), in un'epoca in cui la bassa rilevazione dei calori, rappresentata il vero grande problema da risolvere.

## 2. La dinamica follicolare

Subito dopo l'ovulazione del follicolo di Graaf, si ha un picco di FSH, che permette il reclutamento di un numero variabile di follicoli coortali (8-41) [1] che, nelle prime 48 ore, hanno lo stesso ritmo di crescita. I follicoli reclutati alla partenza di ogni nuova onda follicolare hanno un diametro di circa 3 mm (si può de-

finire questa come la misura minima visibile ultrasonograficamente, con una sonda da 7,5 MHz). Dopo le prime 48 ore, un follicolo, o più di uno in caso di co-dominanza, cresce con un ritmo maggiore degli altri e in quarta giornata, devierà decisamente rispetto agli altri follicoli (subordinati), diventando il Follicolo Dominante (FD). La deviazione del FD, si ha al 4° giorno dopo l'ovulazione e questo follicolo ha un diametro di circa 8 mm; questo diametro, con giusta ragione, deve essere ritenuto il diametro minimo che il FD deve avere, per poter interagire con la prostaglandina; in pratica questo diametro del FD, garantisce un sufficiente numero di recettori per LH a livello delle cellule della granulosa. Il FD, inibisce la crescita degli altri follicoli, che hanno partecipato alla prima onda, attraverso la produzione di un ormone glico-pro-

### FINESTRA 1. Ruolo delle attivine e della follistatina [3]

**Attivine.** Ormoni glico-proteici prodotti dalle cellule della granulosa, implicata nella differenziazione delle cellule della granulosa stessa, in funzione dello stato di maturità follicolare. Le attivine controllano anche l'acquisizione dei recettori per l'FSH, da parte delle cellule della granulosa (da ricordare che i re-

cettori per l'FSH, sono presenti solo a livello delle cellule della granulosa, mentre quelli per l'LH, sono presenti anche sulle cellule della teca) [1]. In presenza di FSH, le attivine stimolano l'aromatasi, quindi la conversione di androgeni in estrogeni, impedendo, *de facto*, la luteinizzazione precoce del FD.

**Follistatina.** Ormone glico-proteico prodotto dalle cellule della granulosa, di cui contribuisce a modulare il funzionamento. In presenza di FSH, inibisce l'Aromatasi e la produzione di Inibina, favorendo o la luteinizzazione, o la regressione del FD, attraverso il blocco degli effetti delle Attivine.

### FINESTRA 2. Follicologenesi [3]

Durante il 45°-150° giorno di vita fetale, nell'ovaio si sviluppa una intensa attività mitotica, che porterà alla formazione di circa 2.000.000 di ovogoni nelle ovaie. Terminata la mitosi, parte la meiosi (la sua attivazione sembra dipendere da un fattore prodotto dalle cellule del bordo interno dell'ovaio, mentre il suo arresto, dipenderebbe da un altro fattore prodotto dalle cellule della granulosa, attraverso un aumento dell'AMPC), che si ferma allo stadio di profase I, ovvero a ovocita I, solo però gli ovociti I che si circondaeranno di una lamina basale e di qualche cellula follicolare, formeranno i Follicoli Primordiali (FP), circa 235.000 alla nascita. La maggior parte dei FP, andrà incontro a regressione. Il FP ha un diametro di 30-40  $\mu$ m, con un ovocita al suo interno di 20-25  $\mu$ m, circondandosi di un numero minimo di cellule follicolari (30) di forma piatta, si trasforma in Follicolo Primario, con un diametro di 60-80  $\mu$ m. Successivamente le cellule follicolari aumentano (diversi strati) e cambiano anche la loro forma (diventano cuboidali), mentre l'ovocita assu-

me una posizione centrale: Follicolo Secondario, con un diametro di 200-400  $\mu$ m. In una fase ancora successiva si viene formando l'antra, che consente la segregazione delle cellule della granulosa in cellule del cumulo: si forma la corona radiata intorno all'ovocita, una sorta di membrana permeabile, che permette un interscambio tra la cellula uovo e le cellule follicolari. Contemporaneamente intorno all'ovocita, si forma la zona pellucida (8-12  $\mu$ m di spessore), costituita da tre differenti proteine: ZP1, ZP2, ZP3, queste ultime fondamentali nel riconoscimento dello spermatozoo. Si è formato il Follicolo Terziario o Antrale, che avrà un diametro di circa 1 mm e nel quale l'ovocita, ha un diametro di 100-130  $\mu$ m. La crescita follicolare, da Follicolo Primario a Follicolo di Graaf, richiede circa 70 giorni.

La deviazione del FD, corrisponde al livello più basso di FSH. Il livello di FSH, rimane basso nei due giorni successivi alla deviazione del FD, poi gradualmente la concentrazione di FSH ricomincia a crescere, per arrivare a un nuovo pic-

co, al termine della dominanza, cui seguirà, 12-24 ore dopo, la partenza di una nuova onda di crescita follicolare [1]. Nel caso di bovine a due onde di crescita follicolare, la nuova onda parte tra il 9°-10° giorno ed il FD che devierà circa 4-5 giorni dopo, diverrà il follicolo di Graaf. Nel caso di bovine a tre onde di crescita follicolare invece, la seconda onda partirà con leggero anticipo, intorno all'8°-9° giorno, mentre la terza onda prenderà l'avvio al 15°-16° giorno ed il terzo FD diventerà il follicolo di Graaf.

Le bovine a due onde di crescita hanno un ciclo più corto, ma una fase di dominanza più lunga di 3 giorni, rispetto alle bovine a tre onde di crescita, che invece hanno un ciclo più lungo, ma una fase di dominanza più corta. Questa differenza nella lunghezza della fase di dominanza ha portato alcuni ricercatori e veterinari di campo, a pensare che le bovine a tre onde di crescita siano caratterizzate da maggiore fertilità, rispetto alle bovine a due onde di crescita, ma questa ipotesi non è mai stata confermata scientificamente.

teico, l'inibina, prodotto dalle cellule della granulosa. La produzione di inibina è stimolata dall'FSH, da basse dosi di LH, dall'IGF-1 e dall'attivina, mentre è bloccata dall'interferon  $\beta$ , dalla follistatina, da alte dosi di LH e dall'EGF (*Epidermal Grow Factor*). Il ruolo dell'inibina è doppio: a livello locale limita la trasformazione degli androgeni in estrogeni, bloccando l'aromatasi e promuovendo quindi l'apporto di androgeni (precursori degli estrogeni), all'interno del FD; a livello periferico blocca invece la secrezione dell'FSH, inducendo quindi la regressione dei follicoli subordinati (finestra 1 e 2).

### 3. Numero di onde follicolari

Circa l'80% delle vacche ha un ciclo a due onde di crescita, mentre l'80% delle manze sarebbe invece a tre onde di crescita follicolare. Il fatto che le bovine a 2 onde di crescita follicolare siano o non siano meno fertili di quelle a 3 onde di crescita è oggetto di continua discussione; di fatto la bibliografia, anche recente, è molto divisa su questo punto [1]. È stato dimostrato nel *Bos indicus* (Nelore, Brahma, e relativi incroci con Angus, Hereford, Holstein) che, in condizioni di bilancio energetico fortemente negativo e in condizioni di stress da caldo, le bovine a 2 onde di crescita possono diventare a 3 onde di crescita follicolare. Sempre nel *Bos indicus*, sono stati descritti fino a un 27% 4 onde di crescita (ciclo di 24-25 giorni) nelle vacche, contro un 7% nelle manze.

### 4. Lunghezza del ciclo ovarico

Il ciclo a due onde di crescita è un ciclo di 19-20 giorni, quello a tre onde di crescita lungo 22-23 giorni, pertanto si è ritenuto di considerare in 21 giorni, la lunghezza del ciclo delle bovine *Bos taurus*, ovvero come una media tra cicli corti e lunghi.

## Novità in tema di Sincronizzazione

Partendo dallo schema originale proposto da Pursley e Wiltbank nel 1996 (figura 1) [4] sono possibili diverse considerazioni pratiche. L'intervallo tra la prostaglandina e il secondo GnRH, è stato dilatato a 54-56 ore, mentre l'intervallo tra il secondo GnRH e l'inseminazione è di 16 ore. Queste variazioni, hanno permesso di ottimizzare i risultati in termini di tasso di concepimento. La condi-

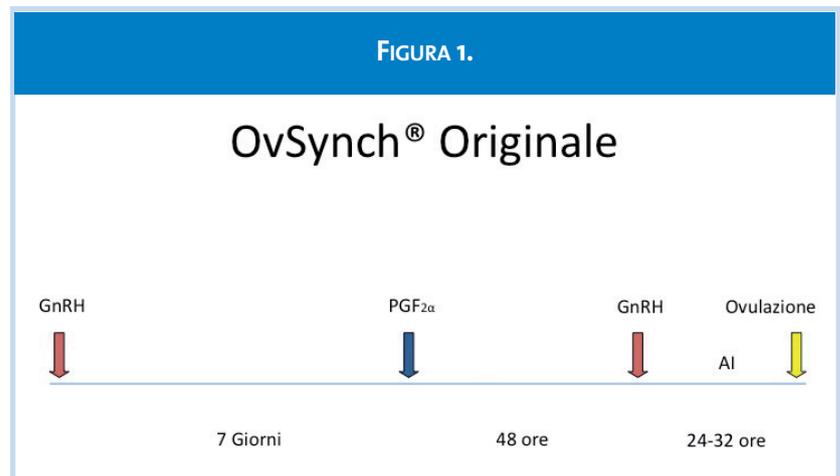


Foto 1. L'esame ultrasonografico dell'ovaio, permette non solo di evidenziare la presenza del CL, ma di stabilirne anche approssimativamente l'età attraverso la valutazione della mappa follicolare.

zione di partenza per poter applicare con buone aspettative l'OvSynch®, è che la bovina sia a due onde di crescita follicolare e che sia presente un corpo luteo. Recentemente è stato sperimentato un OvSynch modificato per le manze, ovvero per le bovine a tre onde di crescita follicolare. Questo modello, accorciato a cinque giorni (Thatcher comunicazione personale), sembrerebbe garantire dei buoni risultati, ma gli autori ritengono sia necessaria una maggiore mole di dati per poterlo impiegare sistematicamente in azienda.

Pur lavorando con bovine cicliche, i risultati dell'OvSynch®, sono molto diversi, in ragione della finestra estrale, nella quale si decide di far partire il programma. I migliori risultati si ottengono nella finestra estrale 5°-10° giorno post ovulazione, mentre tra il 1°-4° giorno, i risul-

**TABELLA 1. Tassi di concepimento in ragione di un differente intervallo tra la seconda prostaglandina e la partenza dell'OvSynch®**

	Intervallo 14 Giorni	Intervallo 11 Giorni
Tasso Concepimento		
38 Giorni (%)	33,5 (138/412)	40,5 (166/410)
66 Giorni (%)	30,2 (124/410)	36,4 (149/409)

Galvao et al. In press.



**Foto 2.** L'applicazione di sistemi di sincronizzazione, non deve essere "l'alibi" per ridurre l'osservazione dei calori.

**TABELLA 2. Performance dell'OvSynch lungo rispetto al corto**

	Corto	Lungo	P
P4 al 1° GnRH (ng/ml)	0,28	1,84	-
P4 alla PGF2	2,23	4,40	-
Ovulazione al 2° GnRH (%)	94,5	95,1	NS
Doppie Ovulazioni	21	7,1	< 0,05
P/Al a 29 giorni (%)	33,2	48,2	< 0,01
Morte embrionale 29-57 gg (%)	15,6	4,3	< 0,05

(Cunha et al., 2008 JDS Abst. mod).

tati sono estremamente scadenti, non tanto per la mancanza di un CL, identificabile anche in condizioni di campo come corpo emorragico, già 6 ore dopo l'ovulazione, ma per l'assenza di un follicolo dominante deviato. La risposta ovulatoria al primo GnRH, è bifasica nella finestra 10°-15° giorno del ciclo: tra il 10°-11° giorno, può essere che il follicolo dominante della prima onda di crescita follicolare sia ancora attivo, ma il FD della

prima onda dopo il 12° giorno, sarà re-gredito funzionalmente e ancora non si ha la deviazione del FD della seconda onda. Nell'ultima finestra estrale, al 16°-20° giorno del ciclo, si ha una buona risposta ovulatoria al primo GnRH, ma inferiore alle aspettative, formulate solamente in ragione del diametro del FD: probabilmente il ruolo del progesterone che cala (luteolisi) ha un notevole effetto.

È pertanto necessario essere in grado di selezionare le bovine per l'OvSynch®: questa selezione è possibile solamente conoscendo molto bene la dinamica follicolare e soprattutto lavorando con l'ultrasonografia. Ovviamente esiste un margine di errore, legato anche al pregiudizio che la bovina sia a due onde di crescita, ma soprattutto legato al fatto che si cerca di stabilire l'esatto momento del ciclo estrale, sulla base della presenza di un CL, della presenza di uno o più FD (codominanza) e sulla base delle caratteristiche ultrasonografiche dell'utero. L'origine del PreSynch® è stata segnata dalla necessità di semplificare le procedure, fissando attraverso la somministrazione di due prostaglandine precedenti all'OvSynch®, la partenza del medesimo programma esattamente nella finestra 5-10!

Praticamente solamente, 3-4 giorni dell'intero ciclo estrale, non garantiscono una risposta ovulatoria al primo GnRH (4), questo spiega perché sia possibile una semplificazione del programma in campo, attraverso la selezione degli animali sulla base della presenza di un CL (K.N. Galvao 2008, comunicazione personale); nel caso di gruppi molto numerosi, l'effetto diluizione del campione, comporterebbe un minimo effetto negativo.

Recentemente è stata proposta una modifica all'OvSynch classico, realizzando uno *splitting* della dose di prostaglandina in due volte (7°-8° giorno) [5, 6]. Circa il 77% delle bovine con un CL il giorno della prostaglandina (il 7° della sincronizzazione) presenta una diminuzione del P4 a < 0,5 ng/ml, quando 56 ore dopo viene somministrato il 2° GnRH [4]. Praticamente, si ha un'insufficiente luteolisi, responsabile di un minor tasso di concepimento e che limita, *de facto*, il potenziale di fertilità dell'OvSynch, in particolare in presenza di un Cl accessorio, troppo giovane per subire una luteolisi completa al momento della prostaglandina. Ciò ha portato alcuni ricercatori a splittare la prostaglandina: il 50% al giorno 7 e il rimanente 50% il giorno

8 (Bisinotto 2010, R. Pursley 2011). In pratica questo farebbe sì che una maggiore percentuale di bovine arrivi alla seconda somministrazione di GnRH, con un livello di progesterone < 0,5 ng/ml. In campo si sta anche provando l'aumento della dose di prostaglandina (50% in più della dose normalmente utilizzata per indurre la luteosisi): lo scopo è quello di determinare una rapida caduta del progesterone, incrementando così la frequenza delle *pulse* dell'LH, per arrivare con un FD più grande al momento dell'ovulazione, ovvero creare le condizioni per la formazione di un CL più grande e quindi con livelli di P4 maggiori (Gnemmi *et al.* In press).

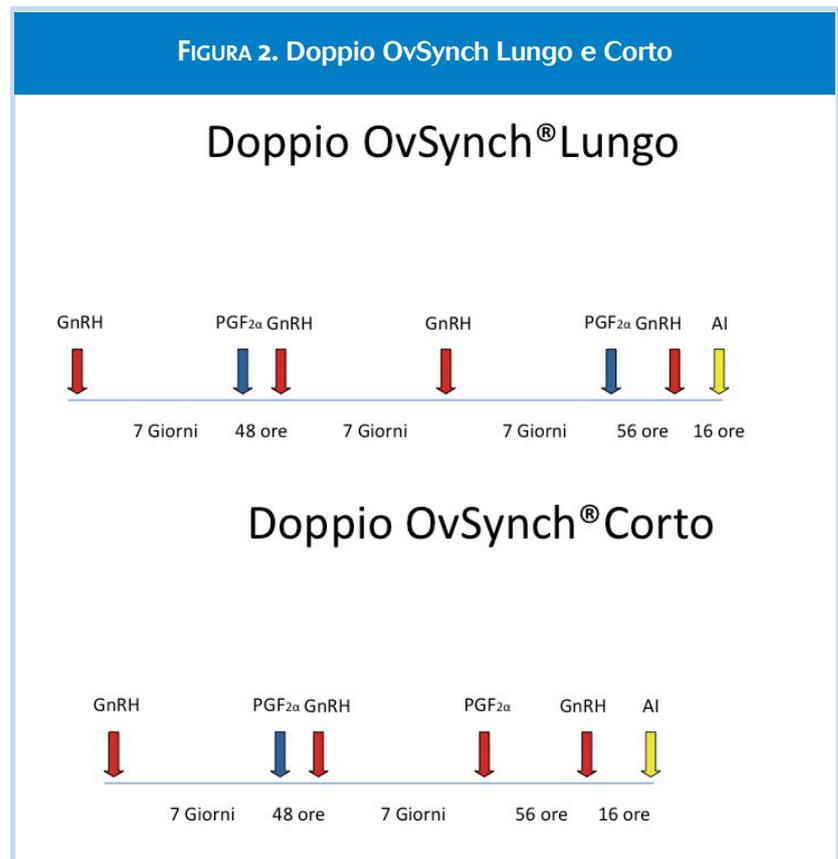
Il PreSynch® originale, prevedeva le due prostaglandine precedenti l'OvSynch, con un intervallo reciproco di 14 giorni, così come di 14 giorni era l'intervallo tra la seconda prostaglandina e la partenza dell'OvSynch. Oggi questo secondo intervallo è stato modificato e si preferisce ridurlo a 10-11 giorni, garantendo così un tasso di concepimento più alto (R. Purley, comunicazione personale 2011) (tabella 1).

Recentemente è stata proposta un'ulteriore variante dell'OvSynch®, il doppio OvSynch [7]; ne esistono due versioni: il Doppio OvSynch lungo e il Doppio OvSynch corto. Il primo dei due sistemi è in pratica costituito da due OvSynch, distanziati da un intervallo di 7 giorni. Il secondo sistema è più corto di 7 giorni e prevede una dose in meno di GnRH, perché la seconda dose di GnRH del primo OvSynch è anche la prima dose del secondo OvSynch.

Il Doppio OvSynch permette di ottenere eccellenti performance, soprattutto nella versione lunga, nelle bovine di primo parto, ma necessita di una organizzazione aziendale che non tutte le aziende possono garantire. Alla luce di questo aspetto, si consiglia la sua applicazione solamente in quelle realtà dove sono garantite efficienza e precisione e dove soprattutto i sistemi di sincronizzazione, sono una pratica ampiamente collaudata.

In tema di bovine con una condizione corporale molto bassa, ovvero con un BCS pari a 2-2,5, la possibilità di ottenere delle buone performance con l'uso dell'OvSynch è fortemente vincolata alla sostituzione del secondo GnRH. Dall'ottobre 2006 nella Comunità Europea è tassativamente vietato l'utilizzo degli estrogeni a fini terapeutici e/o zootecnici. Que-

FIGURA 2. Doppio OvSynch Lungo e Corto



sto impedisce la sostituzione del 2° GnRH con 1 mg di estradiolo benzoato, che Pursley aveva dimostrato essere in grado di aumentare i tassi di concepimento in bovine con un BCS tra 2 e 2.5. Si può sostituire l'effetto dell'estrogeno con la eCG (Gonadotropina Corionica Equina), in ragione di 250-400 UI, somministrate al 7° giorno della sincronizzazione, al momento della iniezione della prostaglandina e quindi inseminando a tempo fisso dopo 48 ore. Il tasso di ovulazioni multiple aumenta (significatività statistica): aumento del numero di gravidanze gemellari (P.P. Baruselli, comunicazione personale 2008).

## Conclusioni

Negli ultimi 50 anni, il tasso di concepimento è sceso drammaticamente, praticamente dimezzandosi (62% vs 30%). Pensare che la selezione genetica, che ha permesso di ottenere le attuali straordinarie produzioni, abbia anche selezionato un calo della fertilità, è sicuramente un gravissimo errore, ma soprattutto non è mai stato dimostrato. Per quanto ci si sforzi di trovare altre spiegazioni, la vera causa di questa disfatta, risiede principalmente in un bassissimo livello di

identificazione dei calori: le cause sono molte (ambiente ecologico, ambiente zootecnico), ma sicuramente la componente umana, direttamente e/o indirettamente, è la principale protagonista di questo buco nero.

La sincronizzazione dell'ovulazione e l'inseminazione a tempo fisso sono uno strumento molto importante per contrastare il problema summenzionato, ma sicuramente non sono la soluzione del problema che, per la sua multi-fattorialità, richiede un cambio di mentalità e non solamente l'introduzione di piani ormonali più o meno sofisticati.

I programmi di sincronizzazione, probabilmente, sono stati parzialmente mal interpretati in questi ultimi 10 anni: in

molti ancora li applicano alla cieca, senza nessuna preventiva visita delle bovine, giustificando per altro i sempre crescenti tassi di rimonta. Il professionista che vuole utilizzare questi sistemi deve conoscere perfettamente la dinamica follicolare e soprattutto deve sapere cosa sta facendo e perché. Solo così si potranno garantire i risultati attesi e, in taluni casi, sarà anche possibile spiegarsi gli immane successi.

Ogni giorno vengono proposte nuove varianti, alcune delle quali molto complicate: il professionista deve utilizzare questi sistemi con razionalità, più che con emotività. Le mode passano, ma i risultati, buoni e soprattutto cattivi, rimangono fissati nella memoria degli allevatori. ■

### Bibliografia

1-Adams G.P., Jaiswal R., Singh J., Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 2008; vol. 69: pp. 72-89.

2-Rajakoski E.. The ovaian system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. *Acta Endocrinol.* 1960; vol. 34: pp. 7-68.

3-Drion P.V., Beckers J.F., Ectors F.J., Hanzen C., Houtain J.Y., Lonergan P. Regolazione della crescita follicolare e luteinica. *Summa*. 1997; n. 9 (supplemento): pp. 5-16.

4-Pursley J.R., Martin J.N. Factores hormonales que influyen en la fertilidad de la vaca lechera en producción. XVI Congreso Internacional Anembe de medici-

na bovina. Avila 11-13 de Mayo 2011. pp.: 174-179.

5-Pursley J.R., Martin J.N. Control farmacológico de la función del folículo y del cuerpo lúteo para mejorar la fertilidad en las vacas lecheras en lactación. XVI Congreso Internacional Anembe de medicina bovina. Avila 11-13 de Mayo 2011: pp. 180-185

6-Monge Veterinarios S.L.P. Eficiencia Reproductiva en Ganado Vacuno Lechero. Curso Teórico Práctico, 30 Sep-01 Oct 2010.

7-Souza A.H., Ayres H., Ferreira R.M., Wiltbank M.C. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 2008; vol. 70: pp. 208-215.