

29. Ciencia, Tecnología e Innovación.

Sincronización de llamas donantes de embriones con un análogo sintético de la GnRH.

Resultados preliminares.

¹Zampini, Enzo; ^{1,2}Gallelli, Florencia; ¹Miragaya, Marcelo; ^{1,2}Trasorras, Virginia;
enzo.z_93@hotmail.com; gallelliflorencia@gmail.com; marcelo.miragaya@gmail.com;
vickytrasorras@gmail.com.

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Teriogenología, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Buenos Aires, Argentina. ²CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Resumen:

El objetivo del trabajo es desarrollar un protocolo simple y económico para la sincronización de la onda folicular en llamas donantes de embriones, mediante la aplicación de dos dosis de buserelina. Las hembras fueron divididas en cuatro grupos según la fase de la onda folicular determinada por ultrasonografía transrectal en dos mediciones diarias sucesivas: Grupo I (fase de crecimiento): folículos en crecimiento < 7 mm; grupo II (fase de dominancia): folículo dominante en crecimiento ≥ 7 mm; grupo III (fase de estática): folículos con variaciones menores a 0,5 mm y grupo IV (fase de regresión): folículos que disminuyen su diámetro. El día 0 se aplicó una dosis de 8 μ g de buserelina (análogo sintético de GnRH) para la inducción de la ovulación. Ocho días posteriores, se administró una nueva dosis de buserelina seguida de una dosis de 250 μ g de cloprostenol (prostaglandina sintética). El día 15 cada grupo recibió una dosis de cloprostenol y aquellas hembras que presentaron un folículo ≥ 6 mm, se les indicó servicio natural con un macho de fertilidad probada junto con una dosis de buserelina. Ocho días luego del servicio natural, se realizó el lavaje uterino transcervical a fin de recuperar el embrión. Hasta el momento, se utilizaron 10 hembras donantes de embriones (Grupo I: n=1; Grupo II: n=4; Grupo III: n=2; Grupo IV: n=3), de las cuales 7 (70%) respondieron en forma positiva al tratamiento de sincronización folicular y recibieron servicio natural (Grupo I: n=0/1 (0%); Grupo II: n=3/4 (75%); Grupo III: n=1/2 (50%); Grupo IV: n=3/3 (100%)). Se obtuvieron cuatro embriones. Como conclusión, sería posible sincronizar llamas donantes de embriones utilizando dos dosis de buserelina separadas por 8 días junto con una dosis de prostaglandina.

Palabras clave: llamas, sincronización, embrión.

Introducción:

Cuatro son las especies que representan a los Camélidos Sudamericanos (CSA), dos de las cuales, la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*) son domésticas, mientras que el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) son silvestres. La crianza de camélidos constituye una actividad económica de gran importancia para un amplio sector de la población altoandina. El ambiente de la Puna, caracterizado por presentar suelos pedregosos, escasez de agua y forrajes de pobre valor nutritivo, ocupa un gran territorio de las provincias del noroeste de nuestro país. Es en estos terrenos donde los CSA logran vivir y producir, mientras que otras especies de abasto difícilmente pueden sobrevivir. Además, una renovada expansión e interés creciente por estos animales hicieron que nuevos productores ubicados en llanuras pampeanas, mesetas patagónicas y serranías centrales comiencen a dedicarse a la cría de llamas. Sin embargo, aún existe una falta de eficiencia en los protocolos utilizados para el manejo reproductivo de los rodeos, resultando en una asignatura pendiente para los investigadores que nos dedicamos a la evaluación de técnicas de reproducción asistida.

En la mayoría de los mamíferos, durante un típico ciclo ovárico, la fase folicular es seguida inmediatamente de la fase luteal. En los CSA no se habla de un ciclo estral regular; la fase folicular es continua (Bravo, 2002). La cópula es un acontecimiento previo necesario para la ovulación en las llamas, por lo que han sido clasificadas como *ovuladoras inducidas* (England *et al.*, 1969), ocurriendo la ovulación dos días luego del servicio natural (Bravo *et al.*, 1990a) o a las $28,6 \pm 0,36$ horas pos-inyección de buserelina (análogo sintético de la GnRH) (Bourke *et al.*, 1992).

La dinámica ovárica en los CSA se caracteriza por presentar ondas foliculares sucesivas con tres fases: crecimiento (incluido el período de dominancia), estática y regresión (llama: Adams *et al.*, 1989, 1990, Chaves *et al.*, 2002; alpaca: Bravo y Sumar, 1989, Vaughan *et al.*, 2004; vicuña: Agüero *et al.*, 2001, Miragaya *et al.*, 2004; guanaco: Riveros *et al.*, 2008). En cada onda folicular, varios folículos son reclutados para su desarrollo durante la fase inicial de crecimiento pero sólo uno, denominado folículo dominante, alcanza el diámetro ovulatorio de 7 mm (Adams *et al.*, 1989; Bravo *et al.*, 1990b). La duración promedio de la onda folicular en la llama es de $22,6 \pm 2,5$ días: la fase de crecimiento es de $9,2 \pm 2,8$ días, la estática $5,2 \pm 1,4$ días y

la fase de regresión $8,2 \pm 2,2$ días (Chaves *et al.*, 2002).

Entre los objetivos para realizar la sincronización de las hembras se encuentran:

- realizar programas de inseminación artificial o servicio natural programado en un lote de hembras;
- sincronizar a las hembras donantes y receptoras para programas de transferencia embrionaria;
- iniciar tratamientos de superestimulación ovárica en ausencia de un folículo dominante.

Para inhibir la dinámica ovárica, se han desarrollado varios protocolos basados en el efecto negativo de la progesterona producida por el cuerpo lúteo (CL) sobre la actividad folicular (Aba *et al.*, 1995). Se puede utilizar una fase luteal natural (induciendo la ovulación) o creando una fase luteal artificial por medio de progesterona o progestágenos exógenos (Alberio y Aller, 1996; Aba *et al.*, 1999; Chaves *et al.*, 2002; Cavilla *et al.*, 2006). Los mismos se pueden combinar con estrógenos inyectables como 17β -estradiol, benzoato de estradiol y valerato de estradiol (Ratto *et al.*, 2003; Trasorras *et al.*, 2005; Aller *et al.*, 2010; Carretero *et al.*, 2010). Desarrollar un método simple, accesible y económico de inhibición folicular y sincronización, sin la necesidad de

depender del uso de la ultrasonografía, resulta de gran importancia en la producción de camélidos. Según Ferrer *et al.* (2002), la aplicación de buserelina en distintos momentos de la dinámica folicular en la llama, sincroniza la emergencia de la onda folicular y sería posible comenzar con un tratamiento superestimulador entre los días 3 y 6 post-buserelina. Sin embargo, el CL de la llama es refractario a la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$; PG) durante los primeros 4 días luego de la inducción de la ovulación, es parcialmente sensible al día 5 y responde totalmente al día 6 pos-inducción de la ovulación (Bianchi *et al.*, 2012). Es por esto que, la aplicación de dos dosis de buserelina separadas por 8 días, sincronizaría la emergencia de una nueva onda folicular luego de la última administración, pudiendo realizar posteriormente el servicio natural con machos fértiles en varias hembras a la vez.

Objetivo:

El objetivo del presente trabajo es lograr la sincronización de la emergencia de la onda folicular en un grupo de llamas donantes de embriones, a partir de la aplicación de dos dosis de buserelina.

Materiales y métodos:

Se utilizaron llamas hembras adultas no gestantes y no en lactancia (n=10), de edad

comprendida entre los 4 y 15 años, con un peso corporal promedio de 120 ± 22 kg. Fueron separadas del grupo de machos y alimentadas con fardos de pastura y alimento balanceado con acceso libre al agua.

Se realizó diariamente el monitoreo de la dinámica ovárica por palpación rectal y ultrasonografía transrectal (equipo marca Berger[®] LC 2010 con transductor lineal de 5 MHz) desde un día previo al inicio del ensayo, para determinar la fase de la onda folicular en que se encontraba cada animal y así dividir las en cuatro grupos:

- Grupo I (fase de crecimiento): hembras con folículos en crecimiento menores a 7 mm de diámetro.
- Grupo II (fase de dominancia): folículos en crecimiento mayores o iguales a 7 mm (folículo dominante).
- Grupo III (fase de estática): folículos que presentan variaciones en el diámetro de menos de 0,5 mm.
- Grupo IV (fase de regresión): hembras con folículos disminuyendo su diámetro.

El día 0 (cero) todas las hembras recibieron una dosis de 8 µg de buserelina (Receptal[®], Intervet, Buenos Aires, Argentina) vía endovenosa para la inducción de la

liberación de LH endógena. Ocho días posteriores, se administró una nueva dosis de buserelina seguida de una dosis de 250 µg de cloprostenol (PG; Ciclase[®], Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina) vía intramuscular. El día 15, todos los grupos recibieron una dosis de cloprostenol, y en aquellas hembras que al control ultrasonográfico presentaron un folículo ≥ 6 mm, se indicó servicio natural con un macho llama de fertilidad probada junto con una dosis de buserelina. Ocho días posteriores al servicio natural, se realizó el control de la presencia del CL por ultrasonografía y se procedió a realizar el lavaje uterino transcervical a fin de recuperar el embrión (**Figura 1**), según Trasorras *et al.* (2010). Una vez finalizado el lavaje, el líquido recuperado en filtro EmCon[®] fue llevado al laboratorio y volcado en placas Petri reticuladas y atemperadas para la búsqueda de los embriones, los cuales se observaron en una lupa estereoscópica (40x) bajo flujo laminar.

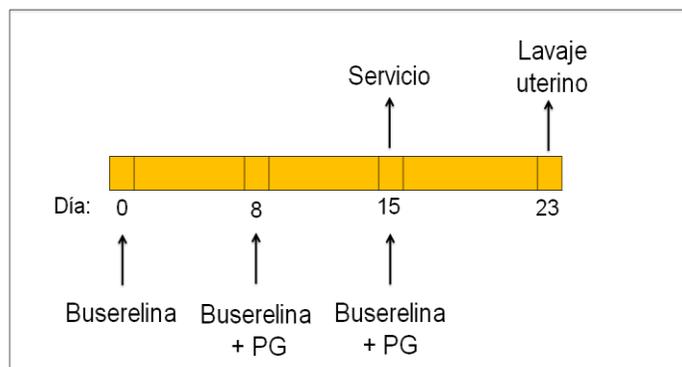


Figura 1. Diseño experimental. Manejo de las hembras donantes de embriones. PG=Prostaglandina.

Resultados y discusión:

Dos hembras, una del grupo II y una del grupo IV, presentaron un quiste folicular además del folículo ≥ 6 mm el día del servicio y hasta el día del lavaje uterino, el cual pudo haber interferido hormonalmente en su normal desempeño reproductivo. Sin embargo se les asignó el servicio natural y se logró recuperar un embrión de la perteneciente al grupo IV.

En la tabla 1 se describe el diámetro folicular promedio obtenido en cada grupo de hembras al día 15 de iniciado el ensayo, el número de hembras que recibieron servicio natural, el porcentaje de hembras con CL el día del lavaje uterino (ocho días posteriores al servicio natural) y el número de hembras con recuperación embrionaria.

Tabla 1. Resultados obtenidos hasta el momento con el tratamiento de sincronización ovárica en la llama utilizando dos dosis de buserelina separadas por 8 días.

Grupo	Diámetro folicular promedio (mm \pm DE) el día 15	Nº de hembras que recibieron servicio natural (%)	Porcentaje de hembras con CL el día del lavaje uterino (Nºhembras con CL/Nºhembras servidas)	Nº de hembras con recuperación embrionaria
Grupo I (n=1)	5,7	0 (0%)	-----	-----

Grupo II (n=4)	6,32 ± 0,61	3 (75%)	100% (3/3)	2
Grupo III (n=2)	5,15 ± 0,85	1 (50%)	100% (1/1)	1
Grupo IV (n=3)	6,53 ± 0,11	3 (100%)	100% (3/3)	1
Total (n=10)	5,92 ± 0,54	7 (70%)	100% (7/7)	4

Como se puede observar en la **Tabla 1**, de las 10 hembras que recibieron el tratamiento, el 70% respondió en forma positiva, es decir, recibieron servicio natural el día 15 del ensayo, siendo el diámetro

folicular promedio de 5,92 mm. Todas las hembras presentaron un CL en sus ovarios el día del lavaje uterino. En total se lograron recuperar 4 embriones (2 embriones del Grupo II, 1 embrión del Grupo III y 1 embrión del Grupo IV) (**Figura 2**).

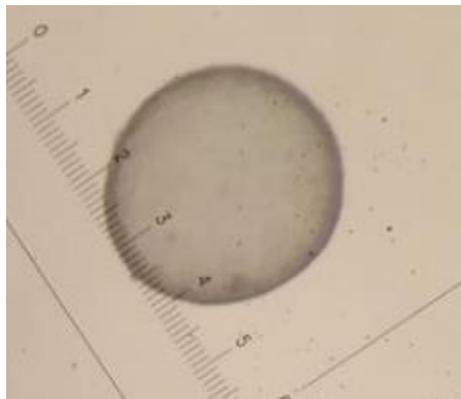


Figura 2. Blastocisto eclosionado de llama recuperado por medio de lavaje uterino transcervical 8 días posteriores al servicio natural.

El empleo de protocolos de sincronización de la emergencia de una nueva onda folicular, posibilita la aplicación de apareamientos, inseminaciones a tiempo fijo y programas de transferencia embrionaria

en grandes rodeos de hembras, reduciendo las prácticas de manejo y optimizando la eficiencia reproductiva. Pese a que son numerosos los protocolos desarrollados en la llama para inhibir la dinámica ovárica y

lograr la sincronización de la onda folicular, muchos de ellos presentan ciertos inconvenientes. Uno de los métodos utilizados es la ablación del folículo dominante guiada por ecografía transrectal (AF), el cual logra intervalos cortos y poco variables de la emergencia de una nueva onda folicular ($2,3 \pm 0,3$ días) y la aparición de un nuevo folículo dominante ($5 \pm 0,5$ días) (Ratto *et al.*, 2003). Como desventaja de esta técnica es que requiere de la disponibilidad de un ecógrafo y personal capacitado. En el mismo estudio, demostraron que la administración de una dosis de 1 mg de 17β -estradiol junto con 25 mg de progesterona (EP) en un volumen total de 2 ml de aceite de cártamo vía intramuscular, presenta una eficacia menor que AF, dando lugar a la emergencia de una nueva onda folicular y a la aparición de un folículo dominante en lapsos de tiempo más largos y variables ($4,5 \pm 0,8$ días y $7,7 \pm 0,5$ días, respectivamente). Por otro lado, Alberio y Aller (1996) utilizaron 50 mg de progesterona inyectable durante un período de 12 días resultando en la inhibición del diámetro folicular por debajo de 5 mm el día 7. Carretero *et al.* (2010) evaluaron la efectividad de 100 y 150 mg de progesterona durante 5 días junto a una única dosis de 1 mg de benzoato de estradiol y tan pronto como el día 3 los folículos disminuyeron su tamaño a 5 mm. A

pesar de ser altamente efectivos, estos protocolos presentan como desventaja que las inyecciones diarias son poco prácticas y generan mucho dolor en el punto de aplicación. Con la utilización del CIDR[®] (dispositivo intravaginal impregnado con 0,33 g de progesterona) se logró inhibir la actividad ovárica desde el quinto y octavo día luego de su colocación, independientemente del estado de desarrollo folicular al inicio del ensayo (Chaves *et al.*, 2002). Sin embargo, este dispositivo ya no se encuentra disponible en el mercado nacional. También fueron desarrollados protocolos basados en la administración de dos dosis de buserelina separadas por 14 días (dromedario; Skidmore *et al.*, 2009) ó 10 días (llamas; Bianchi *et al.* 2018), junto con una dosis de PGF_{2a} al día 7, logrando de esta manera un 73% y 66% de sincronización, respectivamente. Los resultados obtenidos hasta el momento, demuestran que el tratamiento de sincronización ovárica evaluado en el presente estudio, logró la sincronización de la emergencia de una nueva onda folicular en un 70% de las llamas y la aparición de un folículo en fase de crecimiento al día 15 de su aplicación.

Según Bravo *et al.* (1991), la ovulación inducida por el servicio natural ocurriría sólo en hembras con folículos de 7 a 12 mm de

diámetro, mientras que aquellas con folículos más pequeños en crecimiento experimentan incrementos de LH sin alterar el desarrollo folicular normal. Asimismo, Vaughan *et al.* (2003) determinaron que la tasa de preñez en la alpaca es mayor si el servicio natural o la inseminación artificial se llevan a cabo ante la presencia de un folículo dominante en fase de crecimiento o estática temprana, dado que los folículos presentan ovocitos con mayor capacidad de fertilización. En nuestro trabajo pudo observarse que hembras con un diámetro folicular promedio de 5,92 mm respondieron al servicio natural junto a la aplicación de buserelina, ocurriendo la consiguiente ovulación y desarrollo de un CL. Estos resultados coinciden con lo informado por Bianchi *et al.* (2018), quienes expresaron que folículos de 5,5 mm de diámetro respondieron a la GnRH aumentando su tamaño hasta los 6,5 mm a las 24 horas y

ovulando 48 horas posteriores. Además del desarrollo de un CL a partir de la ovulación de folículos en fase de crecimiento, en nuestro trabajo se lograron recuperar embriones, lo cual concuerda con lo informado por Ratto *et al.* (2011), quienes demostraron en alpacas que la etapa de desarrollo del folículo no incide en la tasa de ovulación ni en la viabilidad embrionaria luego del servicio natural.

Conclusión:

Según los resultados obtenidos hasta el momento, la aplicación de dos dosis de buserelina separadas por ocho días, lograría sincronizar la emergencia de la onda folicular en la llama, pudiendo ser utilizado en programas de transferencia embrionaria y constituyendo un protocolo de simple aplicación, que permitiría prescindir del uso de la ultrasonografía a campo.

Bibliografía:

Aba, M.A.; Forsberg, M.; Kindhal, H.; Sumar, J.; Edqvist, L.E., 1995. Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet. Scand.*, 36: 489-498.

Aba, M.A.; Quiroga, M.A.; Auza, N.; Forsberg, M.; Kindahl, H., 1999. Control of Ovarian Activity in Llamas

"*Lama glama*" with Medroxyprogesterone Acetate. *Reprod. Dom. Anim.*, 34: 471-476.

Adams, G.P.; Griffin, P.G.; Ginther, O.J., 1989. *In situ* morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. *Biol. Reprod.*, 41: 551-558.

Adams, G.P.; Sumar, J.; Ginther, O.J., 1990. Effects of lactational and

- reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). J. Reprod. Fert., 90: 535-545.
- Agüero, A.; Miragaya, M.H.; Ferrer, M.S.; Capdevielle, E.F.; Chaves, M.G.; Rutter, B., 2001. Follicular dynamics in *Vicugna vicugna*. Theriogenology, 55: 379.
- Alberio, R.H.; Aller, J.F.; 1996. Control y sincronización de la onda folicular mediante la aplicación de progesterona exógena en llamas (Control and synchronization of the follicular wave using progesterone in llamas). Rev. Arg. Prod. Anim., 16: 325–329.
- Aller, J.F.; Cancino, A.K.; Rebuffi, G.E.; Alberio, R.H., 2010. Effect of estradiol benzoate used at the start of a progestagen treatment on superovulatory response and embryo yield in lactating and non-lactating llamas. Anim. Reprod. Sci., 119 (3-4): 322-328.
- Bianchi, C.; Cavilla, M.V.; Jorgensen, E.; Benavente, M.A.; Aba, M.A., 2012. Development of corpus luteum susceptibility to an analog of prostaglandin $F_{2\alpha}$, throughout the luteal phase in llamas (*Lama glama*). Anim. Reprod. Sci., 131 (3-4): 199-203.
- Bianchi, C.; Benavente, M.A.; Simonetti, M.; Aba, M.A., 2018. Synchronization of time of ovarian follicular development in llamas (*Lama glama*) using a protocol based on GnRH and PGF $_{2\alpha}$. Anim. Reprod. Sci., 192: 200-205.
- Bourke D.A.; Adam C.L.; Kyle C.E; McEvoy T.G.; Young P., 1992. Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. Proc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod., 1: 193-195.
- Bravo, P.W.; Sumar, J., 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. Anim. Reprod. Sci., 21: 271.
- Bravo, P.W.; Fowler, M.E.; Stabenfeldt, G.H.; Lasley, B.L., 1990a. Endocrine responses in the llama to copulation. Theriogenology, 33: 891-899.
- Bravo, P.W.; Fowler, M.E.; Stabenfeldt, G.H.; Lasley, B.L., 1990b. Ovarian follicular dynamics in the llama. Biol. Reprod., 43: 579-585.
- Bravo, P.W.; Stabenfeldt, G.H.; Lasley, B.; Fowler, M.E.. 1991. The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. Biol. Reprod., 45: 553-559
- Bravo, P.W., 2002. Female reproduction. In: The Reproductive Process of South American Camelids. Publicación de Bravo: 1-31.

- Carretero, M.I.; Miragaya, M.H.; Chaves, M.G.; Gambarotta, M.C.; Agüero, A., 2010. Embryo production in superstimulated llamas pre-treated to inhibit follicular growth. *Small Ruminant Research*, 88: 32-37.
- Cavilla, M.V.; Bianchi, C.P.; Waimann, E.; Aguilera, M.F.; Aba, M.A., 2006. Perfil de progesterona plasmática y actividad folicular en llamas tratadas con un dispositivo intravaginal comercial conteniendo 0.78gramos de progesterona. In: IV Congreso Mundial Sobre Camélidos, Catamarca, Argentina, Octubre 11–15.
- Cavilla, M.V.; Bianchi, C.P.; Aguilera, F.; Hermida, M.; Aba, M.A., 2016. Hormonal changes and follicular activity after treatment with intravaginal progesterone-releasing devices in llamas. *Reprod. Dom. Anim.*, 51 (6): 930-939.
- Chaves, M.G.; Aba, M.; Agüero, A.; Egey, J.; Berestin, V.; Rutter, B., 2002. Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Animal Reproduction Science*, 69: 37-46.
- England, B.G.; Foote, W.C.; Matthews, D.H.; Cardozo, A.G.; Riera, S., 1969. Ovulation and corpus luteum function in the llama (*Lama glama*). *J. Endocrinol.*, 45: 505-513.
- Ferrer, M.S., Agüero, A., Chaves, M.G., Russo, A.F., Rutter, B., 2002. Sincronización de la onda folicular mediante el uso de buserelina en la llama (*Lama glama*). *InVet*, 4 (1): 7-11.
- Miragaya, M.H.; Aba, M.A.; Capdevielle, E.F.; Ferrer, M.S.; Chaves, M.G.; Rutter, B.; Agüero, A., 2004. Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuna (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology*, 61: 663-671.
- Ratto, M.H.; Singh, J.; Huanca, W.; Adams, G.P., 2003. Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology*, 60: 1645–1656.
- Ratto, M.H.; Cervantes, M.; Norambuena, C.; Silva, M.; Miragaya, M.; Huanca, W., 2011. Effect of location and stage of development of dominant follicle on ovulation and embryo survival rate in alpacas. *Anim Reprod Sci.*, 127(1-2): 100-105.
- Riveros, J.L.; Schuler, G.; Chaves, M.; Hoffmann, B.; Bonacic, C.; Bas, F.; Urquieta, B., 2008. Ovarian follicular dynamics in non gestating guanacos

- (*Lama guanicoe*) in captivity. *Reproduction in Domestic Animals*, 43: 27.
- Skidmore, J.A.; Adams, G.P.; Billah, M.; 2009. Synchronization of ovarian follicular waves in the dromedary camel (*camelus dromedarius*). *Anim. Reprod. Sci.*, 114: 249-255.
- Trasorras, V.L.; Chaves, M.G., Agüero, A., 2005. Comparación de tres tratamientos para sincronizar la dinámica ovárica en la llama (*Lama glama*) con estrógeno y progesterona. In: IV Congreso Latinoamericano de especialistas en pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos, Curitiba, Paraná, Brasil, Mayo 18–20.
- Trasorras, V. L.; Chaves, M.G.; Neild, D.; Gambarotta, M.; Aba, M.; Agüero, A., 2010. Embryo transfer technique: factors affecting the viability of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.*, 121: 279–285.
- Vaughan, J.L., Macmillan, K.L., Anderson, G.A., D`Occhio, M.J., 2003. Effects of mating behavior and the ovarian follicular state of female alpacas on conception. *Aust. Vet. J.*, 81: 86–90.
- Vaughan, J.L.; Macmillan, K.L.; D`Occhio, M.J., 2004. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.*, 80: 353-361.

Financiamiento:

El trabajo de investigación es financiado a través del proyecto subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2015-2220) y la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT 2014-2017).