Presencia del alelo T para el polimorfismo rs2781666 G>T del gen arginasa 1 constituye un factor protector contra enfermedad arterial coronaria

Luis A. Salazar^{1, 2}, Natalia Gallardo¹, Valentina Jara¹, Daniela Torres¹,
Nicolás Saavedra^{1, 2}, Priscilla Jaramillo^{1, 2}, José Caamaño^{1, 2},
Cecilia Lanas³, Fernando Lanas^{1, 2, 3}

- 1 Laboratorio de Biología Molecular y Farmacogenética, Depto. de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.
 - 2 Núcleo de Desarrollo Científico - Tecnológico en Biorecursos (BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.
 - 3 Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco.
- Trabajo financiado por Fundación Araucaria & Proyecto DIUFRO D109-1007, Dirección de Investigación y Desarrollo, Universidad de La Frontera.

Recibido 15 de diciembre 2009 / Aceptado 20 de diciembre 2010

Rev Chil Cardiol 2010; 29: 316 - 321

Resumen:

Introducción: Variaciones moleculares en el gen de la arginasa I, ARG1, podrían provocar un aumento de la expresión de la enzima o de su actividad, lo que puede llevar a una disfunción endotelial al disminuir la producción de óxido nítrico por parte de la eNOS. Así, el objetivo del presente estudio fue investigar la posible asociación del polimorfismo rs2781666 G>T y la presencia de enfermedad coronaria (confirmada con angiografía) en individuos de la región de La Araucanía.

Material y Métodos: En el presente estudio, de tipo casos y controles, fueron evaluados 247 sujetos, con edades entre 30 y 74 años; 124 individuos pacientes con enfermedad arterial coronaria (casos) y 123 controles. La genotipificación del polimorfismo rs2781666 del gen ARG1 fue realizada mediante PCR- RFLP.

Resultados: La frecuencia del genotipo homocigoto TT para el polimorfismo rs2781666 del gen ARG1 fue de 6.5% en el grupo casos y 8% en el grupo control, difiriendo significativamente ($p=0.032$). La frecuencia relativa del alelo T también presentó diferencias significativas entre casos y controles (0.230 vs. 0.325, $p=0.031$). La OR relacionada al alelo mutado T fue de 0.63 (I.C. 95%, 0.43 – 0.94), confirmando la presencia de la asociación observada.

Conclusión: Los resultados obtenidos sugieren que el polimorfismo rs2781666 G>T del gen ARG1 confiere protección contra enfermedad coronaria en la población analizada. Sin embargo, este resultado debe ser replicado en otros grupos poblacionales de nuestro país.

Correspondencia:

Dr. Luis Antonio Salazar
Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina,
Universidad de La Frontera.
Av. Francisco Salazar 01145, Casilla 54-D,
Temuco
Fono: (45) 592 895 - Fax: (45) 592 832.
Correo Electrónico: lsalazar@ufro.cl

The presence of T allele for rs2781666 G>T common variant of arginase 1 gene constitutes a protector factor against coronary artery disease in southern Chilean subjects

Background: Recent data support a role for arginase 1 (ARG1) in the initiation, development, and complications of coronary artery disease. Thus, in the present study we investigated the possible association between the rs2781666 G>T variant of ARG1 and the presence of CAD confirmed by angiography in Chilean subjects.

Methods: A total of 124 unrelated patients with diagnosis of CAD confirmed by angiography (stenosis > 70%) and 123 healthy controls (30 - 74 years old) were included in this study. The rs2781666 G>T variant of the ARG1 gene was evaluated by PCR-RFLP.

Results: The frequency of TT homozygous genotype

in CAD patients was lower when compared to control group (6.5% vs. 8.0%, $p=0.032$). Similarly, the T allele frequency was different between CAD and control groups (0.230 vs. 0.325, $p=0.031$). The OR for CAD related to T allele was 0.64 (95% C.I. = 0.43-0.94), confirming the association founded.

Conclusion: These findings suggest that the T allele for rs2781666 polymorphism of the ARG1 gene constitutes an inherited protective factor against CAD in Southern Chilean subjects.

Keywords: Coronary artery disease; Gene polymorphism; ARG1.

Introducción:

El óxido nítrico (NO), sintetizado por la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) juega un papel fundamental en la protección vascular¹ por lo que una disminución en su producción puede resultar en disfunción endotelial², desencadenando el proceso de formación de la placa de ateroma.

La enzima Arginasa ha emergido como un importante regulador de la síntesis de NO, ya que compete por el sustrato (L-arginina) con la enzima eNOS³ y por ende se le ha relacionado con el desarrollo de enfermedad arterial coronaria (EAC). Esta enzima posee dos isoformas (Arginasa 1 y 2), sin embargo, sólo Arginasa 1 ha sido descrita en músculo liso vascular y endotelio⁴.

Arginasa 1, codificada por el gen ARG1 en el brazo largo del cromosoma³, tiene una afinidad menor que eNOS por L-arginina. Sin embargo, su actividad máxima llega a ser hasta 1.000 veces superior a la de esta enzima⁵.

Diversas variantes genéticas se han estudiado en el gen ARG1, investigando su posible asociación con el desarrollo de enfermedad coronaria. Debido a que una mayor actividad enzimática se ve asociada a una mayor competencia con eNOS y por lo tanto, una mayor disminución de NO, se han estudiado polimorfismos en la región promotora de este gen que pudieran tener efecto sobre su tasa de transcripción. Un ejemplo de ello es el SNP rs2781666 que se ha visto asociado a infarto en diversas poblaciones^{6,7}.

Considerando la relevancia de las informaciones men-

cionadas, en el presente trabajo, se evaluó la posible asociación del polimorfismo rs2781666 del gen ARG1 en individuos chilenos con enfermedad coronaria y controles.

Métodos:

Sujetos

Este estudio, de tipo casos y controles, evaluó un total de 247 individuos adultos, sin parentesco entre ellos. Los casos correspondieron a un total de 124 individuos, de ambos sexos, cuya edad fluctuó entre los 33 y 74 años, seleccionados del Hospital Hernán Henríquez Aravena de la ciudad de Temuco. El criterio de inclusión para el grupo casos fue el diagnóstico de enfermedad coronaria, demostrada por obstrucción mayor al 70% en la angiografía y además, teniendo como antecedente la historia clínica y ECG de infarto al miocardio. El grupo control está constituido por 123 individuos de ambos sexos, cuyo rango de edad oscila entre los 30 y 68 años, sin enfermedad coronaria (ausencia de angina o ECG sin evidencia de isquemia o infarto), sin parentesco y sin historial familiar de enfermedad cardiovascular precoz. Al igual que los casos, los sujetos del grupo control pertenecen a la región de La Araucanía.

El tamaño muestral se calculó, asumiendo una prevalencia del polimorfismo de un 18,5% en los controles y una razón de disparidad (odds ratio, OR) de 3, con un significancia estadística de 0,05, un poder de 80% para un estudio de casos y controles. El tamaño muestral estimado fue de 67 casos y 67 controles como mínimo.

A las personas que participaron del estudio se les apli-

có un cuestionario que indagó sobre la historia familiar de enfermedad cardiovascular, antecedentes mórbidos personales, encuesta alimenticia; realizándose, además, medidas de peso, talla, pulso y presión arterial. Se consideró como hipertensos a los individuos que presentaron una presión arterial sistólica $\geq$ a 140 mm Hg y/o presión arterial diastólica $\geq$ a 90 mm Hg o que se encontraban en uso de tratamiento antihipertensivo. La presencia de hipercolesterolemia se definió por la obtención de valores de colesterol total $\geq$ a 240 mg/dL en ayunas y se clasificó a los individuos como diabéticos al presentar una concentración de glucosa en ayunas $\geq$ a 126 mg/dL.

Todos los individuos que aprobaron participar en este estudio estaban en conocimiento de las bases y procedimientos mediante la firma de un consentimiento informado escrito, el cual fue aprobado por el Comité de Ética Científica del Servicio de Araucanía Sur.

Determinaciones bioquímicas

Para las determinaciones de laboratorio se obtuvieron muestras de sangre venosa sin anticoagulante, previo ayuno de 12 h. Las concentraciones de colesterol total y triglicéridos se determinaron por métodos enzimático-colorimétricos; el colesterol HDL se midió previa precipitación selectiva de las LDL y VLDL con ácido fosfotúngstico e iones magnesio y posterior determinación por el método CHOD-PAP; la concentración de colesterol de las LDL fue calculada mediante la fórmula de Friedewald. Las concentraciones séricas de glucosa y ácido úrico se determinaron mediante métodos enzimático colorimétricos.

Genotipificación de la variante rs2781666 del gen ARG1

El ADN genómico fue extraído a partir de sangre total anticoagulada con EDTA mediante la técnica de precipitación salina descrita por Salazar et al.⁸. Para genotipificar la variante rs2781666 del gen ARG1, se amplificó un fragmento de 296 pares de bases (bp) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador MyCycler (Bio-Rad, California, EE.UU.), usando los siguientes partidores: sentido: 5'-cgg aag gat ctt taa ggt gc-3; antisentido: 5'-tac cat gtg tcc gat gca gt-3'. El protocolo de PCR utilizado fue: MgCl₂ 2 mM, 200 nM de cada partidor, dNTPs 0,2 mM, 1 U de la enzima Taq DNA polimerasa y 200 ng de ADN para un volumen final de 50 μ l. Los ciclos programados en

el termociclador MyCycler (Bio – Rad, EE.UU.) fueron los siguientes: denaturación inicial a 98°C por 3 min, seguido por 30 ciclos repetitivos compuesto por una denaturación de 1 min a 94°C, una hibridación de los partidores a 55 °C por 1 min, una extensión de las hebras a 72 °C por 2 min y finalmente, 10 min a la misma temperatura para la extensión final. Como producto final se obtuvo un fragmento de 296 pares de bases (bp), el cual fue evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con la posterior tinción con bromuro de etidio (0,5 mg/L) y visualizado en un sistema de fotodocumentación digital E- Box 1000 (Vilber Lourmat, Francia).

Finalmente, los productos de PCR se digirieron con la enzima de restricción TaiI (FastDigest® Restriction Enzymes, Fermentas, Lituania). El protocolo de restricción utilizado fue el siguiente: 10 μ L de producto de PCR, se digirieron con 0,25 de enzima TaiI (0,25 FDU), 2 μ L de amortiguador de reacción 10X FastDigest y 17,75 μ L de agua destilada estéril, completando un volumen final de 30 μ L. La mezcla se incubó 30 min a 65°C. Los fragmentos de restricción se visualizaron en gel de agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio. El genotipo GG se identificó por la presencia de un fragmento de 296 bp; el genotipo heterocigoto, por la presencia de fragmentos de 296, 182 y 114 bp, y el genotipo homocigoto mutado TT, por la presencia de fragmentos de 182 y 114 bp.

Control de calidad de las determinaciones bioquímicas y moleculares

La exactitud de las determinaciones bioquímicas fue controlada mediante la utilización de sueros comerciales normales y patológicos (Human, Alemania). La posibilidad de contaminación en los análisis moleculares fue excluida por la utilización de controles de reactivos en cada serie de amplificación. La correcta genotipificación del polimorfismo fue confirmada mediante la repetición al azar del 20% de los análisis previamente realizados.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante la utilización del programa SigmaStat para Windows, versión 3.5. Inicialmente se hizo un análisis descriptivo a todas las variables. Las variables continuas se expresaron como media $\pm$ desviación estándar. Se utilizó el test t de Student para evaluar diferencias entre las

Tabla 1: Características clínicas y demográficas de los sujetos con enfermedad arterial coronaria (casos) y controles.

	Casos (124)	Controles (123)	P*
Edad, años	58 ± 10	42 ± 8	<0.001
Hombres, %	64	58	0.100
Diabetes, %	32	5	<0.001
PAS, mm Hg	139 ± 24	126 ± 22	<0.001
PAD, mm Hg	81 ± 18	76 ± 9	0.020
IMC, kg/m ²	28.2 ± 4.5	25.8 ± 4.5	<0.001
Fumadores, %	60	41	<0.001
Hipercolesterolemia, %	82	20	<0.001
Hipertensión, %	78	25	<0.001
Angina, %	79	0	<0.001
IAM, %	65	0	<0.001
Historia Familiar de EAC, %	31	0	<0.001
Número de vasos obstruidos, %			
1	28	0	---
2	24	0	---
3	48	0	---
Colesterol total, mg/dL	217 ± 50	174 ± 32	<0.001
LDL - C, mg/dL	126 ± 41	94 ± 25	<0.001
HDL - C, mg/dL	32 ± 8	50 ± 11	<0.001
Triglicéridos, mg/dL	184 ± 191	113 ± 85	<0.001
Glucosa, mg/dL	114 ± 42	93 ± 36	<0.001
Ácido úrico, mg/dL	5.6 ± 1.6	4.5 ± 1.5	<0.001

Número de individuos en paréntesis; IAM; infarto agudo al miocardio; IMC, índice de masa corporal; EAC, enfermedad arterial coronaria; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; HDL-C, Colesterol de las HDL; LDL-C, Colesterol de las LDL. *Test t de Student o Chi-cuadrado.

variables analizadas. Además, se utilizó el test de Chi – cuadrado (χ^2) para el análisis de las variables no continuas y para verificar el Equilibrio de Hardy – Weinberg. Se calculó también la OR y su respectivo intervalo de confianza de 95%, asociada al alelo mutado. En este estudio, un valor $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.

Resultados:

Análisis de las características clínicas y de laboratorio

Las características clínicas, antropométricas y de laboratorio de los sujetos en estudio se muestran en la Tabla 1. Los individuos con EAC presentan valores elevados de índice de masa corporal (IMC) y una mayor prevalencia de factores de riesgo tradicionales para EAC, incluyendo consumo de tabaco, diabetes, hipertensión arterial, hipercolesterolemia e historia familiar de EAC

($P < 0,001$). Las concentraciones de colesterol total, colesterol LDL, triglicéridos, glucosa y ácido úrico fueron más altas en los pacientes con EAC que en los controles ($P < 0,001$). Además, los individuos con EAC presentaron niveles más bajos de HDL-C ($P < 0,001$). Similarmente, se advirtió una diferencia significativa en la edad ($P < 0,001$) y en los valores promedio de presión arterial sistólica ($P < 0,001$) y diastólica ($P = 0,020$) entre los grupos EAC y controles.

Análisis del polimorfismo rs2781666 del gen ARG1

La distribución genotípica y la frecuencia relativa de los alelos para el polimorfismo rs2781666 G>T del gen ARG1 se muestran en la tabla 2. Se puede observar, que tanto la distribución de genotipos en casos como controles están de acuerdo con el equilibrio de Hardy Weinberg ($p > 0,05$). Al analizar la distribución genotípica de ambos grupos se observa que hay diferencias

Tabla 2. Distribución de genotipos y frecuencia relativa de alelos para el polimorfismo rs2781666 del gen ARG1 en casos y controles

	Genotipos			Alelos	
	GG	GT	TT	G	T
Casos (124)	59.6%(74)	33.9%(42)	6.5%(8)	0.765	0.235
Controles (123)	43.0%(53)	49.0%(60)	8%(10)	0.675	0.325
	$\chi^2 = 6.87$; 2 gl; p= 0.032			$\chi^2 = 4.67$; 1 gl; p=0.031	

En paréntesis: Número de individuos. gl: Grado de libertad.

Equilibrio de Hardy-Weinberg: casos $\chi^2 = 0.3725$ p=NS; Controles $\chi^2 = 1.5277$ p=NS

significativas ($p=0,032$). De la misma forma, al observar la frecuencia relativa de los alelos, se observan diferencias significativas ($p=0,031$). La OR obtenida fue 0,63 (I.C.95%, 0,43-0,94), demostrando que la presencia del alelo T confiere protección contra enfermedad arterial coronaria.

Discusión:

Datos recientes apoyan un rol importante de la enzima arginasa 1 (ARG1) en la iniciación, desarrollo, y complicaciones de la enfermedad arterial coronaria⁹⁻¹¹. Así, en el presente estudio se analizó, por primera vez en Chile, el polimorfismo rs2781666 del gen ARG1 y su asociación con la aparición de enfermedad coronaria en individuos chilenos.

El análisis de los parámetros de laboratorio en ambos grupos estudiados, muestra que las concentraciones séricas de colesterol total, colesterol LDL, triglicéridos, glucosa y ácido úrico fueron más altas en los sujetos con EAC. Además, las concentraciones de HDL-C fueron inferiores en este grupo; esos resultados confirman las conocidas asociaciones entre esos factores de riesgo tradicionales y enfermedad arterial coronaria^{12, 13}.

El análisis molecular del polimorfismo rs2781666 G>T del gen ARG1, en casos y controles demostró que las frecuencias genotípicas difieren significativamente ($p=0,032$), encontrándose el genotipo GG con una frecuencia de 59,6% y 43%, respectivamente; GT con una frecuencia de 33,9% y 49%, y el genotipo TT 6,5% y 8%, respectivamente, lo que demuestra que el genotipo mutado se presentó con mayor frecuencia en el grupo control.

Similarmente, al analizar las frecuencias alélicas presentadas en ambos grupos, se observaron diferencias significativas en su distribución ($p= 0,031$), teniendo

mayor frecuencia el alelo T en el grupo control, indicando que existe relación inversa entre la variante T y la presencia de enfermedad coronaria. La OR (0,63) obtenida, demuestra que la presencia de la variante T actuaría como factor protector contra el desarrollo de enfermedad coronaria.

Los resultados obtenidos fueron discrepantes con los datos de Dumont y cols.⁷ y con los de Sediri y cols.⁶ encontrados en población de Francia y Tunes, respectivamente. Dumont y cols.⁷ demostraron que el polimorfismo rs2781666 en el gen ARG1, estuvo consistentemente asociado con infarto al miocardio y con un incremento en la capa media íntima de la arteria carótida. De igual manera, Sediri y cols. estudiaron en población africana, la presencia del polimorfismo rs2781666 en el gen ARG 1 y su asociación con la aparición de infarto al miocardio, encontrando resultados significativos, relacionándolo como factor de riesgo. Sin embargo, sugieren que los resultados se deben confirmar con otros estudios⁶. Estas discrepancias pueden ser atribuidas al diseño del estudio, la definición de los criterios de exclusión e inclusión, número y etnia de los sujetos utilizados¹⁴.

En contraposición con los resultados anteriores, Teupser y cols.⁹ identificaron a ARG1 como un nuevo gen candidato de resistencia a la arterosclerosis en macrófagos de conejos genéticamente modificados, para alta respuesta arterosclerótica (HAR) y baja respuesta (LAR). Esto se explicaría por la alta expresión de ARG 1, que podría ser un mecanismo efectivo para reducir la producción de NO en macrófagos, disminuyendo a su vez, la producción de peroxinitros por la iNOS. Además, la actividad incrementada de la arginasa podría tener un efecto antiinflamatorio, específicamente mediante la acción de las poliaminas (resultado de la degradación de L-ornitina), mediado por la disminu-

ción de la expresión de citocinas inflamatorias.

Resultados semejantes, obtuvieron Thomas y cols.¹⁵, quienes encontraron evidencia de una expresión disminuida del gen ARG 1 en células espumosas de conejos, comparadas con las obtenidas de células no espumosas, en donde la alteración de los patrones de la expresión de los genes en células espumosas conlleva a la formación de aterosclerosis y su estabilidad. Así tenemos, por una parte que la sobreexpresión de arginasa I podría ser dañina en las células endoteliales mediante la disminución en la producción de NO por la eNOS y por otra parte, que la sobreexpresión de arginasa I en macrófagos y en células musculares lisas de vasos sanguíneos podría tener un efecto protector en aterosclerosis causando una disminución en la producción de peroxinitritos por la NOS inducible.

La diferencia de nuestros resultados con investigaciones anteriores, abren nuevas opciones de estudio en nuestra población, como por ejemplo estudiar la expresión génica de la enzima Arginasa en los tejidos involucrados en

el proceso de desarrollo de enfermedad cardiovascular (endotelio, células musculares, macrófagos), mediante la técnica de RT-PCR, así como también medir la actividad enzimática de la Arginasa I en estos tejidos.

Asimismo, los datos obtenidos en nuestra investigación manifiestan la necesidad de analizar estos marcadores genéticos en cada población, considerando el grado de mestizaje de cada localidad, debido a que se pueden originar distintos perfiles genéticos en una misma población. Finalmente, nuestros datos indican que la presencia del alelo T para la variante rs2781666 del gen ARG1 confiere protección contra enfermedad coronaria en la población estudiada. Sin embargo, esta observación necesita ser confirmada en forma independiente por otros grupos a nivel nacional. Es importante considerar para la ejecución de futuros estudios, una selección más rigurosa de los individuos controles. Idealmente, deberían incluirse individuos que no presenten lesiones, a los cuales se les realizó coronariografía por otros motivos (por ejemplo, pases operatorios), y con edades similares a los casos.

Referencias:

- Desjardins F, Balligand JL. Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg* 2006; 61: 326-334.
- Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis*. 2001; 154: 521-527.
- Morris SM JR. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 2004; 134: 2743S-2747S.
- Zhang C, Hein TW, Wang W, Chang CI, Kuo L. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. *FASEB J*. 2001; 15: 1264-1266.
- Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34: 906-911.
- Sediri Y, Kallel A, Ali SB, Omar S, Mourali MS, Elasm M, et al. Association of rs2781666 G/T polymorphism of arginase I gene with myocardial infarction in Tunisian male population. *Clin Biochem*. 2010; 43: 106-9.
- Dumont J, Zureik M, Cotel D, Montaye M, Ducimetiere P, Amouyel P, et al. Association of arginase 1 gene polymorphisms with the risk of myocardial infarction and common carotid intima media thickness. *J Med Genet*. 2007; 44: 526-531.
- Salazar La, Melo C, Cavalli S, Hinuy H, Hirata M, Hirata RD. Micrométodo para la extracción de DNA genómico útil no diagnóstico molecular da hipercolesterolemia familiar. *Rev Bras Anal Clin* 2001; 33: 111-116.
- Teupser D, Burkhardt R, Wilfert W, Haffner I, Nebendahl K, Thiery J. Identification of macrophage arginase I as a new candidate gene of atherosclerosis resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 365-371.
- Yang Z, Ming X. Endothelial Arginase: A new target in Atherosclerosis. *Current Hypertension Reports* 2006; 8:54-59.
- Zhang C, Hein T, Wang W, Miller MW, Fossum Tw, McDonald Mm, et al. Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases Nitric Oxide-Mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension* 2004; 44: 935-943.
- EXECUTIVE SUMMARY OF THE THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adults treatment Panel III). *J Am Med Assoc* 2001; 285: 2486-97.
- Lanas F. Factores de riesgo de Infarto en América Latina. *Rev Chilena Cardiol* 2007; 26: 227-230.
- Bach J, Endler G, Mannhalter C, Hellstern P. Coagulation factor XII (FXII) activity, activated factor XII, distribution of factor XII C46T gene polymorphism and coronary risk: reply to a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2008; 6:1055-6.
- Thomas A, Sala-Newby G, Ismail Y, Johnson J, Pasterkamp G, Newby A. Genomics of foam Cells and nonfoamy Macrophages from rabbits Identifies Arginase-I as a differential regulator of nitric oxide production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 571-577.