

Búsqueda de mutaciones en el gen UL 97 asociadas a resistencia a ganciclovir en citomegalovirus obtenidos desde muestras biológicas de pacientes chilenos

MARÍA ANGÉLICA OYARZÚN¹, PATRICIA BUSTOS^{6a}, MARCELA GONZÁLEZ¹, MARÍA ISABEL DOMÍNGUEZ³, FRANCISCO AGUAYO^{2a}, BRUNO NERVI⁴, MARCELA FERRES^{5,6}

Presence of mutations associated with ganciclovir resistance in cytomegalovirus UL97 gene

Background: Long term use of ganciclovir (GCV) is associated with acquired resistance to it. Ninety percent of the responsible mutations occur in cytomegalovirus (CMV) UL97 gene. **Aim:** To search for these mutations, comparing nucleotide sequences of CMV-positive samples from post transplant and immunocompromised patients receiving GCV, with sequences of CMV isolates obtained from subjects not exposed to the drug. **Patients and Methods:** Codons 440 to 465 of gene UL97, including the most common mutations causing resistance to GCV, were amplified in 33 plasma samples from patients exposed to GCV and in 15 urine samples of newborns. Both populations and their nucleotide sequences were compared with the prototype strain CMV AD169. **Results:** Samples of exposed patients had multiple mutations but only one had a mutation associated with clinical resistance (M460I). Eight subjects had the D605E mutation, whose role in resistance is controversial. The remaining 150 mutations were silent mutations. **Conclusions:** A low frequency of mutations associated with CMV resistance to GCV was found in these exposed and unexposed samples. These mutations may reflect coexistence of multiple genetic variants of CMV. The absence of clinical expression of resistance, even with these mutations, can be explained by the use of GCV for a shorter lapse than that associated with the appearance of resistance.

(Rev Med Chile 2010; 138: 421-427).

Key words: Anti viral drug resistance; Cytomegalovirus; Ganciclovir.

La infección por citomegalovirus (CMV) representa una causa importante de morbimortalidad en pacientes inmunocomprometidos, en particular en receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos, órganos sólidos y en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)¹. En ellos, el espectro clínico varía desde viremias asintomáticas a un síndrome sistémico, con fiebre, leucopenia, trombocitopenia y disfunción hepática, pudiendo localizarse de manera secundaria en otros órganos².

La droga de primera elección para profilaxis y tratamiento es el ganciclovir (GCV), análogo de guanosina, cuya activación requiere de reacciones de fosforilación en su estructura: la primera depende de una proteína codificada por el gen UL97 del virus y las siguientes fosforilaciones son realizadas por proteínas quinasas propias de las células infectadas^{1,3}. El GCV activo es incorporado al genoma viral a través de la ADN polimerasa viral, retrasando la replicación y elongación del ADN viral mediante inhibición competitiva^{1,3}.

¹Departamento de Pediatría.

²Laboratorio de Patología Molecular y Epidemiología. Centro de Investigaciones Médicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

³Departamento de Medicina Interna.

⁴Departamento de Oncología y Hematología.

⁵Departamento de Pediatría.

⁶Laboratorio de Infectología y Virología Molecular. Facultad de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile.

^aBioquímico.

Trabajo parcialmente financiado por la Dirección de Investigación de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Concurso de Proyectos de Becarios Residentes 2008.

Recibido el 25 de marzo de 2009, aceptado el 22 de marzo de 2010.

Correspondencia a:

Dra. Marcela Ferres Garrido
Laboratorio de Infectología y Virología Molecular - Centro de Investigaciones Médicas
Pontificia Universidad Católica de Chile.

Fono: 02-3546823

Fax: 56 02 638-7457

E-mail: mferres@med.puc.cl

En el manejo de pacientes pre y post-trasplante existen distintas estrategias para prevenir la infección y las reactivaciones sintomáticas por CMV^{1,4}. En este centro, los receptores de órganos sólidos reciben de manera profiláctica GCV intravenoso por tres semanas y luego valganciclovir durante los primeros 100 días post trasplante cuando la relación donante-receptor es D(+)/R(-), mientras que en las otras relaciones donante receptor y en los trasplantes de precursores hematopoyéticos (TPH) se aplica la estrategia denominada terapia anticipada, traducción del término inglés “*pre-emptive therapy*”, que consiste en vigilar la aparición de viremia mediante la detección del antígeno pp65 (una fosfoproteína de la matriz) de CMV al interior de los leucocitos^{5,6} y administrar cursos de tratamiento con GCV cuando son positivas.

La terapia y profilaxis antiviral prolongada con GCV se ha asociado a resistencia viral, aumentando de manera proporcional al tiempo de exposición, como lo demostró un estudio que reportó resistencia en 7, 12 y 28% de los pacientes después de 3, 6 y 9 meses de terapia con GCV, respectivamente⁷. Esta resistencia se relaciona con mala respuesta terapéutica, progresión y recurrencia de la enfermedad^{1,4}. Varios estudios han reportado infección por CMV resistente a GCV tanto en receptores de órganos sólidos como en pacientes receptores de TPH^{1,8-12}.

La resistencia de CMV a GCV se ha asociado con la presencia de mutaciones en el gen que codifica para la proteína quinasa UL97 (gen UL97) y en la región que codifica para la ADN polimerasa viral (gen UL54). Más de 90% de estas mutaciones ocurren en el gen UL97 viral, particularmente entre los codones 460 y 520, implicados en la unión de ATP y 590 al 607 relacionado con el reconocimiento del sustrato^{1,13-17}.

El método de referencia dorado para evaluar la resistencia viral es la inhibición en placa de cultivo; método laborioso, requiere de períodos prolongados de trabajo y no permite aplicar oportunamente los resultados a la práctica clínica. Por lo anterior, se ha postulado el uso de métodos moleculares para el diagnóstico de susceptibilidad/resistencia de CMV a GCV, basados en la búsqueda de aquellas mutaciones que con mayor frecuencia se han asociado a resistencia.

En nuestro medio se sospecha la resistencia al antiviral cuando no hay respuesta clínica en

el tratamiento de la enfermedad o respuesta virológica con disminución en la antigenemia o carga viral de CMV, pese al uso de GCV en dosis adecuadas.

La importancia de documentar la presencia de resistencia de CMV a GCV en nuestro medio radica en que el uso cada día más frecuente de este antiviral asociado al aumento de la población de inmunocomprometidos, obliga a establecer un fundamento sólido para el uso de antivirales de segunda línea para CMV, ya que el potencial tóxico y efectos adversos de estos, son claramente superiores al GCV. Dado que desconocemos la situación de susceptibilidad a GCV en Chile y que la mayoría de las mutaciones descritas en CMV asociadas a resistencia a GCV involucran la región 460 a 607 del gen UL97, el objetivo de esta investigación fue buscar la presencia de las mutaciones más frecuentemente descritas asociadas a resistencia a GCV ubicadas en esta región, usando material genético de CMV proveniente de pacientes expuestos a la droga y comparar esta información con la obtenida desde aislados virales provenientes de niños inmunocompetentes que nunca fueron expuestos al antiviral.

Pacientes y Métodos

Se seleccionaron muestras de plasma de pacientes tratados con inmunosupresores posterior a un trasplante y que durante su evolución presentaron antigenemias para CMV (pp65) positivas. Todas estas muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Infectología y Virología Molecular de la Pontificia Universidad Católica de Chile entre enero 2007 y junio 2008. Se consideraron como positivas aquellas muestras con 1 o más núcleos fluorescentes por 200.000 células blancas observadas en al menos dos láminas. El ensayo de antigenemia de CMV pp65 se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Boeckh et al⁵. Se eligieron además, durante el mismo período, los aislados positivos de muestras de orina de recién nacidos o lactantes pequeños y leche materna.

Origen de las muestras clínicas y clasificación de los grupos de pacientes (Figura 1)

Grupo 1: 40 plasmas de 15 pacientes inmunodeprimidos receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH) o trasplante de órgano sólido (TOS). Cuatro eran niños con edad prome-

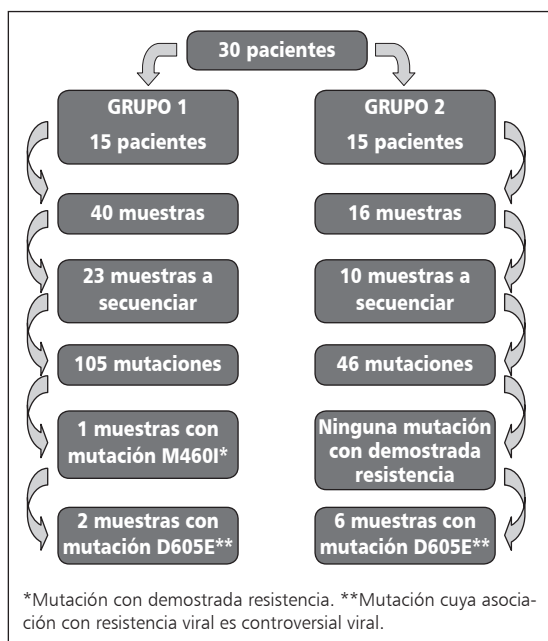


Figura 1. Esquema resumen de ambos grupos de estudio.

dio 8 años (rango 3 a 13 años) y once eran adultos con edad promedio 37 años (rango 22 a 63 años). Todos estos pacientes habían recibido en algún momento de su evolución GCV como profilaxis o terapia en dosis recomendadas, previo a la toma de la/las muestras incluidas en este estudio. En la mayoría de ellos la determinación de antigenemia se efectuó como estrategia de terapia adelantada (*pre-emptive*) y en otros motivado por sospecha

de enfermedad por CMV manifestada por fiebre. Sólo uno presentó síntomas y signos compatibles con enfermedad por CMV intestinal.

Grupo 2: 15 aislados de CMV en orina de recién nacidos y lactantes menores de tres meses y un aislado en leche materna, madre de un recién nacido con hepatitis neonatal y detención de la curva de peso. Ninguno de estos pacientes recibió GCV previo al momento de la toma de muestra.

Todas las muestras estaban conservadas a -70°C y fueron analizadas en una primera etapa mediante reacción en cadena de la polimerasa (RPC) diseñada para amplificar la región del gen UL97 de CMV ubicada entre los codones 440 a 645. Se utilizó una cepa prototipo AD169 CMV, a la que también se hizo análisis de secuencias nucleotídicas en la misma zona.

Extracción del ácido nucleico y detección de CMV

El ácido nucleico fue obtenido usando reactivos de extracción viral de alta pureza (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó la cepa prototipo AD169 de CMV como referencia (ATCC N° VR-538).

La detección del genoma viral se realizó de acuerdo a una adaptación de la metodología descrita previamente¹⁸. Se diseñaron dos set de partidores para amplificar la región del gen UL97 contenida entre los codones 440 y 645. Para cada muestra, los dos fragmentos obtenidos se sobreponeían en 37 nucleótidos (Figura 2).

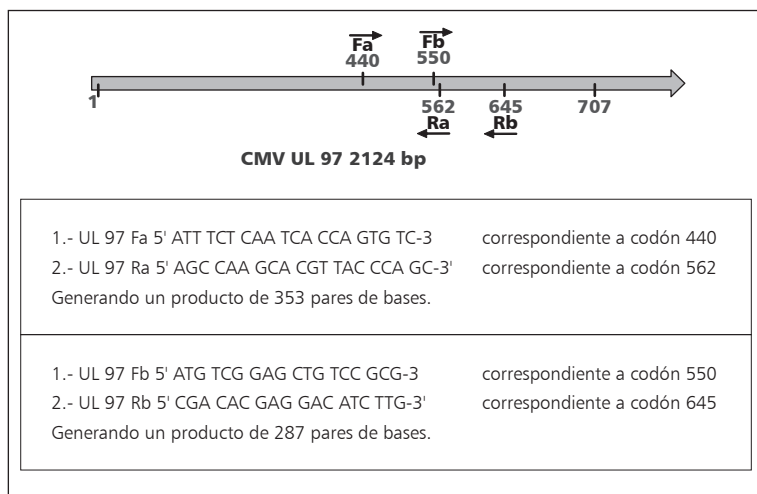


Figura 2. Esquema gen UL97 y alineamiento de los partidores. Esquema del genoma del CMV 2124 pares de bases (flecha), se indica el gen UL97 y el segmento estudiado entre los codones 440 y 645. Primer set de partidores está descrito por Fa y Ra rc (reverso complementario) y el segundo set: Fb y Rb. Además se muestra la secuencia de los 4 partidores utilizados.

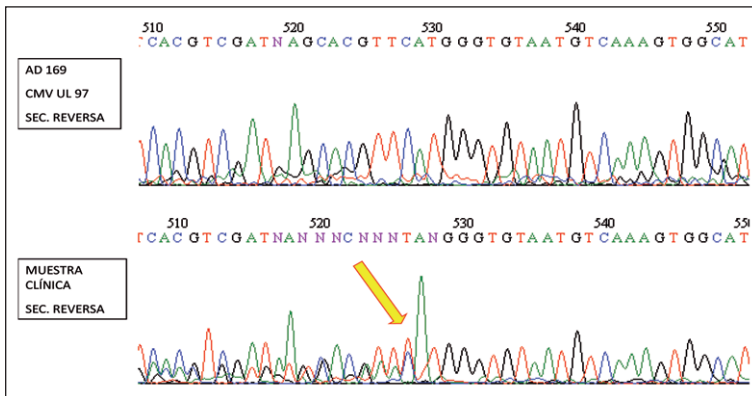


Figura 3. Cromatograma-Detección de mutaciones CMV UL 97. Resultado de un análisis de secuencia y comparación de cepa AD 169 CMV con una de las muestras clínicas. La flecha muestra la señal de las dos probables variantes virales coexistentes en la misma muestra.

El ADN viral fue amplificado utilizando, para el primer set de partidores, el siguiente programa: desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, luego 35 ciclos de 95 °C por 20 segundos; 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y 72 °C por 4 minutos. Para el segundo set de partidores se realizó desnaturalización a 95 °C por 7 minutos y luego 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos; 55 °C por 40 segundos, 72 °C por 40 segundos y 72 °C por 10 minutos. Los productos de RPC obtenidos fueron caracterizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% y tinción con bromuro de etidio. Posteriormente, se realizó purificación y análisis automatizado de secuencias nucleotídicas (Macrogen, Rockville, Indiana, USA). Los cromatogramas obtenidos se analizaron para confirmar las secuencias nucleotídicas reportadas. Las secuencias fueron finalmente alineadas y comparadas con la descrita en Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/59591>) para la cepa AD169 de CMV (access number X17403) a través del programa Vector NTI V8. Las mutaciones encontradas se confirmaron analizando el cromatograma obtenido para cada muestra (Figura 3).

Comité de Ética

Estudio aprobado por el comité de ética de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Resultados

Las 40 muestras de plasma del grupo 1 pertenecían a 15 pacientes trasplantados seguidos en esta

institución: 7 receptores de trasplante hepático, 1 de trasplante renal y 7 de precursores hematopoyéticos. Las muestras del grupo 2 correspondieron a muestras de orina de 15 recién nacidos y lactantes con infección congénita o adquirida en los primeros meses de vida y una muestra de leche materna de una madre cuyo recién nacido desarrolló hepatitis neonatal y detención de su curva de peso. El promedio de tiempo post trasplante en que fueron obtenidas las muestras de los pacientes del grupo 1 fue de 87 días y el tiempo promedio de exposición a GCV fue 48 días al momento de obtención de las muestras.

De la primera amplificación fue posible obtener producto para análisis de secuencias nucleotídicas en 23/40 muestras de plasma (57%) provenientes de 13 pacientes del grupo 1 y en 10/16 muestras (62%) de 10 pacientes del grupo 2, quedando así 33 muestras totales que pudieron ser sometidas a la segunda fase de la investigación.

Las muestras sometidas a análisis de secuencias de nucleótidos fueron comparadas con la cepa AD169 CMV. Esta cepa de referencia no tenía ninguna mutación en el segmento de interés del estudio; sin embargo, las 33 muestras exitosamente amplificadas para estudio presentaron un total de 151 mutaciones en la zona comprendida entre los codones 440 y 645 (Tablas 1 y 2).

Del total de mutaciones encontradas, 105 mutaciones fueron encontradas en el primer grupo y 46 en el segundo; la mayoría de ellas se comportaron como mutaciones sinónimas. Las mutaciones más frecuentes fueron G503G, G579G y G598G.

En nueve muestras, tres del primer grupo y seis del segundo, se encontró más de una señal en el

Tabla 1. Mutaciones observadas en UL97 en grupo expuesto a GCV 13 pacientes

Mutación	n de muestras observadas	Resistencia reportada
G503G	21	No
L564L	4	No
G598G	22	No
C549C	1	No
M5501	1	No
G579G	10	No
L634L	8	No
L463L	1	No
N467N	1	No
I474I	1	No
D605E*	2	Sí
L552E	1	No
G561G	1	No
L560L	1	No
D568V	1	No
D574E	1	No
N510S	4	No
L552L	8	No
D456E	2	No
D456D	5	No
M460I**	1	Sí
S550L	1	No
R494L	2	No
R524Q	1	No
P489P	1	No
A588A	1	No
C603C	1	No
G557G	1	No

*Resistencia asociada no cuenta con marcadores de transferencia; **resistencia reconocida, cuenta con marcadores de referencia.

cromatograma lo que sugiere infección por más de una variedad de CMV, cepa silvestre y cepas mutantes. En una de estas muestras, perteneciente a un paciente trasplantado, se presentó la mutación M460I reconocida como marcador de resistencia. Dos pacientes del primer grupo y seis del segundo

Tabla 2. Mutaciones observadas en UL97 en grupo No expuesto a GCV 10 pacientes

Mutación	n de muestras observadas	Resistencia reportada
G503G	10	No
G598G	10	No
G579G	1	No
L634L	1	No
N467N	1	No
D605E*	6	Sí*
G561G	1	No
N510S	1	No
L552L	2	No
D456D	2	No
P525P	6	No
F562Y	1	No
N470N	1	No
E501E	2	No
L528L	1	No

presentaron la mutación D605E cuyo efecto sobre la resistencia es todavía incierto.

En ninguno de los pacientes estudiados que presentaron las mutaciones M460I o D605E se sospechó resistencia clínica al GCV.

Discusión

La infección por CMV resistente a GCV está bien documentada como complicación de la exposición prolongada al antiviral, observándose con mayor frecuencia en pacientes con SIDA y retinitis por este virus¹. En las últimas décadas este ha sido un problema emergente en la población de receptores de trasplantes tanto de órganos sólidos como de precursores hematopoyéticos dado el amplio uso de GCV, como profilaxis o terapia anticipada (*pre-emptive*) y, a la inmunosupresión intensiva, asociándose con persistencia, progresión de la enfermedad y fracaso terapéutico^{19,20}. Hoy en nuestro país, la decisión de cambiar la terapia anti-CMV desde GCV a una droga de segunda línea como foscarnet, se fundamenta en

la sospecha clínica de resistencia manifestada por progresión de la enfermedad y empeoramiento en los resultados de los ensayos virológicos utilizados en la monitorización de la terapia, tales como, persistencia de antigenemias positivas o cargas virales en ascenso^{19,20}.

Este estudio contribuye con la información molecular que sustenta el uso de GCV en nuestros pacientes como una elección segura de un antiviral efectivo en el tratamiento de la enfermedad por CMV.

La aproximación a la búsqueda de genes de resistencia realizada en este trabajo fue limitada, por la falta de una prueba confirmatoria, inhibición en placa del cultivo de CMV en presencia de GCV, y por la recuperación parcial del genoma viral suficiente para la secuenciación del gen UL97 y sus mutaciones en todas las muestras seleccionadas. Sólo se obtuvo producto de RPC útil para secuenciación en 57% de las muestras de plasma y en 62% de las muestras de orina y leche materna. Esto probablemente porque las cargas virales de una fracción de las muestras del primer grupo de pacientes estaba en el rango de carga viral indetectable, como ha sido descrito previamente¹⁸ y en otras puede tener relación con el mal alineamiento de los partidores, dado la amplia cantidad de mutaciones silentes y polimorfismos encontrados en esta región.

Aunque nuestros pacientes no presentaron resistencia clínica y el promedio de días de exposición fue menor en relación a los estudios previos, es interesante comprobar que la presencia de mutaciones descritas en resistencia está en una frecuencia muy baja concordante con la expresión clínica actual de la infección por CMV. Sin embargo, la alta frecuencia de mutaciones silentes encontradas en el gen UL97, que ha sido descrito como una región bien conservada, podría representar un potencial peligro para que se produzca un cambio drástico y relevante en la secuencia a medida que aumentan los días de exposición a la droga¹⁷. Todas las mutaciones encontradas han sido descritas con anterioridad, y la mayoría de ellas se comporta como mutaciones silentes, no alteran la función de la proteína UL97 ni la susceptibilidad al GCV. En dos pacientes del grupo de inmunodeprimidos expuestos a GCV y en 6 pacientes del segundo grupo se encontró la mutación D605E, cuyo rol en resistencia antiviral aún es controversial. Existen estudios donde se la ha relacionado a resistencia;

sin embargo, no se cuenta con estudios de marcadores de transferencia génica que lo confirmen^{18,19}. En otro estudio se demostró que tendría relación con resistencia viral en presencia de la mutación A594P^{17,20}; sin embargo, esta mutación no fue encontrada en nuestro estudio. Los 6 pacientes del segundo grupo que presentaron esta mutación eran recién nacidos que no habían recibido tratamiento con ganciclovir. El hecho de que pacientes vírgenes a tratamiento presenten esta mutación podría explicarse por adquisición de cepas mutantes desde sus madres. Apoya esta afirmación el hecho que las cepas encontradas en la muestra de leche de una mujer con reactivación durante su embarazo presenta las mismas mutaciones de las cepas aisladas desde la orina de su hijo lactante.

El hallazgo de infección mixta, coexistencia de una cepa silvestre con una o más cepas mutantes, es un fenómeno interesante desde el punto de vista clínico ya que las manifestaciones de resistencia pueden presentarse una vez que la cepa sensible haya sido eficazmente tratada²¹. Esta podría ser la situación del paciente cuya muestra presentó la mutación M460I, conocida como marcador de resistencia, pero que en el tiempo de exposición a GCV no se comportó como tal.

La relevancia de detectar mutaciones asociadas a resistencia a GCV en forma rápida mediante métodos moleculares, radica en la detección oportuna de infecciones o enfermedad por CMV resistentes a GCV que permite adaptar la terapia antiviral en un tiempo apropiado. La incorporación de métodos de estudio molecular en los laboratorios de diagnóstico virológico contribuirá a la detección rápida y sensible de CMV resistentes a GCV. En este sentido, aunque no encontremos alta frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia en nuestros pacientes, sería beneficioso instaurar una búsqueda sistemática en pacientes con largo tiempo de exposición a GCV, como vigilancia de la situación de resistencia en nuestro medio.

Referencias

1. Erice A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drug. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 286-97.
2. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-97.
3. Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med* 1996; 335: 721-9.

4. Avery RK. Management of late, recurrent, and resistant cytomegalovirus in transplant patients. *Transplantation Reviews* 2007; 21: 65-76.
5. Boeckh M, Bowden RA, Goodrich JM, Pettinger M, Meyers JD. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1992; 80: 1358-64.
6. Drew L. **Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients.** *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 408-11.
7. Jabs DA, Enger C, Dunn JP, Forman M. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: ganciclovir resistance. *CMV Retinitis and Viral Resistance Study Group. J Infect Dis* 1998; 177: 770-3.
8. Limaye AP, Corey L, Koelle D, Davis C, Boeckh M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet* 2000; 356: 645-9.
9. Limaye AP. Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus in Organ transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 866-72.
10. Slavin MA, Bindra RR, Gleaves CA, Pettinger MB, Bowden RA. Ganciclovir sensitivity of cytomegalovirus at diagnosis and during treatment of cytomegalovirus pneumonia in marrow transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1360-63.
11. Reusser P, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Link D, Locasciulli A, et al. European survey of herpesvirus resistance to antiviral drugs in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 813-17.
12. Marfori JE, Exner MM, Marousek GI, Chou S, Drew WL. Development of new cytomegalovirus UL 97 and DNA polymerase mutations conferring drug resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients. *J Clin Virol* 2007; 38: 120-25.
13. Lurain NS, Spafford LE, Thompson KD. Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strain resistant to ganciclovir. *J Virol* 1994; 68: 4427-31.
14. Lurain NS, Weinberg A, Crumpacker CS, Chou S. Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2775-80.
15. Yeo A, Peng Chan K, Kumarasinghe G, Kim Yap H. Rapid detection of codon 460 mutations in the UL97 gene of ganciclovir – resistant cytomegalovirus clinical isolates by PCR using molecular beacons. *Molecular and Cellular Probes* 2005; 19: 389-93.
16. Göhring K, Mikeler E, Jahn G, Hamprecht K. Rapid simultaneous detection by real-time PCR of cytomegalovirus UL97 mutations in codons 460 and 520 conferring ganciclovir resistance. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4541-4.
17. Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resistance Updates* 2002; 5: 88-114.
18. Castor J, Cook L, Corey L, Jerome K. Rapid detection directly from patient serum samples of human cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir resistance. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2681-3.
19. Avery RK. Update in management of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection. *Current Opinion in infectious diseases* 2008; 21: 433-37.
20. Chou S. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev Med Virol* 2008; 18: 233-46.
21. Cicin-Sain L, Podlech J, Messerle M, Reddehase M, Koszinowski U. Frequent coinfection of cells explains functional in vivo complementation between cytomegalovirus variants in the multiply infected host. *J Virol* 2005; 9492-502.