

Determinación en plasma del factor transformador del crecimiento β_1 en la fibrosis pulmonar idiopática

María Molina-Molina^a, Sergio Lario^b, Patricio Luburich^c, José Ramírez^d,
 María Teresa Carrión^a y Antoni Xaubet^a

^aServicio de Neumología. Hospital Clínic. IDIBAPS. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

^bUnidad de Trasplante Renal. Hospital Clínic. IDIBAPS. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

^cServicio de Radiodiagnóstico. Hospital Clínic. IDIBAPS. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

^dServicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínic. IDIBAPS. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

OBJETIVO: El factor transformador del crecimiento β_1 (TGF- β_1) es uno de los mediadores fibrogénicos con más relevancia en la patogenia de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). El objetivo del estudio ha sido investigar el valor pronóstico de la determinación en plasma del TGF- β_1 en la FPI.

PACIENTES Y MÉTODOS: Se ha realizado un estudio prospectivo en el que se incluyó a 29 pacientes con FPI y 27 controles sanos. La determinación del TGF- β_1 se realizó mediante enzoinmunoanálisis.

RESULTADOS: La concentración de TGF- β_1 fue significativamente mayor en los pacientes con FPI que en los controles (media \pm desviación estándar: 11,1 \pm 7,5 frente a 4 \pm 2,4 ng/ml; $p < 0,01$). Se observó una débil relación inversa de la concentración del TGF- β_1 con los valores de la capacidad vital forzada y de la capacidad pulmonar total. Se evaluó a 13 pacientes con FPI a los 8 \pm 1,2 meses (rango: 5-9 meses). La concentración de TGF- β_1 fue de 18,2 \pm 15 ng/ml, sin diferencias significativas respecto a la primera determinación (11,1 \pm 7,5 ng/ml). No se observó ninguna relación entre los cambios evolutivos en la exploración funcional respiratoria y los cambios en la concentración de TGF- β_1 .

CONCLUSIONES: Aunque la concentración plasmática de TGF- β_1 está elevada en los pacientes con FPI, este parámetro no parece ser útil como marcador del pronóstico de la enfermedad ni de la respuesta terapéutica.

Palabras clave: Fibrosis pulmonar idiopática. Enfermedades pulmonares intersticiales. Factor transformador del crecimiento β_1 . Marcadores séricos.

Quantifying Plasma Levels of Transforming Growth Factor β_1 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis

OBJECTIVE: Transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) is one of the key profibrotic mediators in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). The purpose of this study was to investigate the prognostic value of quantifying TGF- β_1 levels in patients with IPF.

PATIENTS AND METHODS: We conducted a prospective study of 29 IPF patients and 27 healthy controls. Enzyme-linked immunosorbent assays were used to quantify TGF- β_1 levels.

RESULTS: Mean (SD) TGF- β_1 levels were significantly higher in the IPF patients than in the control subjects (11.1 [7.5] ng/mL vs 4 [2.4] ng/mL; $P < .01$). Weak inverse correlations were observed between TGF- β_1 levels and both forced vital capacity and total lung capacity. Thirteen IPF patients were evaluated at 8 (1.2) months (range, 5-9 months). The mean TGF- β_1 level was 18.2 (15) ng/mL and there were no significant differences with respect to the initial measurement of 11.1 (7.5) ng/mL.

No correlation was observed between changes in respiratory function and changes in TGF- β_1 levels.

CONCLUSIONS: Although plasma levels of TGF- β_1 were high in the patients with IPF, they do not appear to be a useful prognostic marker of disease activity or therapeutic response.

Key words: Idiopathic pulmonary fibrosis. Interstitial pulmonary diseases. Transforming growth factor β_1 . Serum markers.

Introducción

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar intersticial difusa de etiología desconocida y pronóstico infausto, con una supervivencia media de 3 años desde el diagnóstico. El sustrato anatómico patológico es la neumonía intersticial usual¹. Según

la hipótesis fisiopatológica recientemente aceptada, las células epiteliales alveolares se activarían en respuesta a agresiones repetidas, lo cual favorecería la apoptosis epitelial, la proliferación de fibroblastos y la formación de miofibroblastos, lo que finalmente conduciría a un excesivo depósito de colágeno y a la distorsión de la arquitectura pulmonar²⁻⁴. Todo este proceso está mediado por diversos factores de crecimiento tisular y citocinas Th2⁵⁻⁶. Uno de los mediadores profibroticos de mayor relevancia en la patogenia de la FPI es el factor transformador del crecimiento β_1 (TGF- β_1). El TGF- β_1 es una proteína homodimérica de 25 kD secretada por numerosas células, incluidos macrófagos, células epiteliales alveolares y fibroblastos⁷⁻⁹. Se ha demostrado ampliamente

Estudio subvencionado por SEPAR-Fundación Respira 2000, FIS 00/0371 y Red Respira V-2003-REDC 11 D-O.

Correspondencia: Dra. M. Molina-Molina.
 Servicio de Neumología. Hospital Clínic.
 Villarroel, 170. 08036 Barcelona. España.
 Correo electrónico: mariamolinalina@hotmail.com

Recibido: 24-8-2005; aceptado para su publicación: 22-11-2005.

su participación en la fibrosis pulmonar experimental, tanto en la alteración de la diferenciación epitelial como en la proliferación fibroblástica^{7,10,11}. El TGF- β_1 es quimiotáctico para los fibroblastos, induce la síntesis de proteínas de la matriz extracelular e inhibe la degradación del colágeno^{7,8}.

Dado que la expresión proteica del gen del TGF- β_1 se encuentra elevada en el tejido pulmonar de los pacientes con FPI, nuestra hipótesis es que este incremento daría lugar a un aumento de la concentración circulante de TGF- β_1 . El objetivo del estudio ha sido investigar la utilidad pronóstica de la determinación de la concentración plasmática de TGF- β_1 en la FPI.

Pacientes y métodos

Pacientes

En el estudio se ha incluido a 29 pacientes con FPI (10 mujeres y 19 varones), cuya edad media (\pm desviación estándar) era de $67 \pm 7,1$ años. El diagnóstico de FPI se estableció de acuerdo con las recomendaciones del consenso de la American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS)¹² y de la Normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)¹³. En 21 pacientes el diagnóstico se realizó mediante criterios clínicos y en 8 mediante biopsia pulmonar quirúrgica. Ocho pacientes eran fumadores y 9, ex fumadores.

Grupo control

Estaba constituido por 27 voluntarios sanos ($42 \pm 10,6$ años de edad; 14 varones y 13 mujeres) sin antecedentes de enfermedad respiratoria ni de otras enfermedades que pudieran asociarse a fibrosis (enfermedades hepáticas, renales, sistémicas autoinmunitarias, diabetes, mielofibrosis, trombocitopenia esencial). Diez eran fumadores y 17, no fumadores.

Métodos

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del hospital donde se llevó cabo. Para la determinación en plasma del TGF- β_1 se obtuvieron 10 ml de sangre venosa, que se centrifugaron a 500 g durante 30 min. El sobrenadante se congeló en alícuotas a -70 °C hasta su utilización. La determinación de la concentración plasmática de TGF- β_1 se realizó mediante una técnica cuantitativa de inmunoadsorción ligada a enzimas en sándwich (ELISA) utilizando un kit comercial (R&D Systems, Mineápolis, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el programa informático SPSS, versión 10.0 (Chicago, Illinois, EE.UU.). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. La comparación de medias entre los valores de TGF- β_1 del grupo control y del grupo de estudio se realizó mediante la prueba de la t de Student, asumiendo variancias iguales en ambos grupos, contrastada con la prueba Levene. El coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para establecer relaciones entre variables. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados

En la tabla I se recogen los hallazgos de la exploración funcional respiratoria de los pacientes con FPI. Cuando se realizó la determinación de TGF- β_1 , la dura-

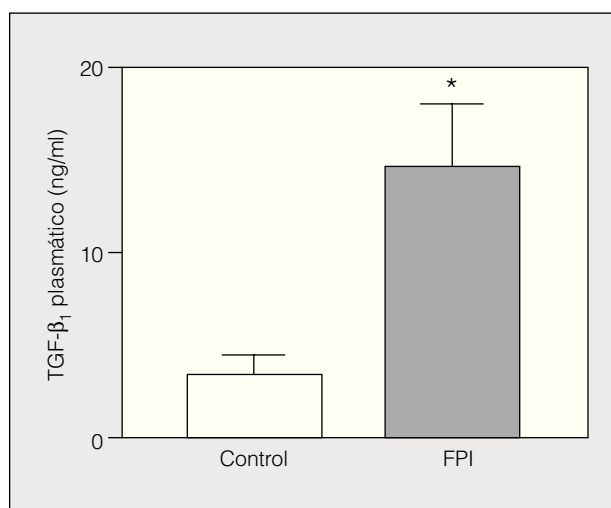


Fig. 1. Concentración plasmática del factor transformador del crecimiento β_1 (TGF- β_1) en el grupo control y en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI). La concentración de TGF- β_1 es significativamente superior en los pacientes con FPI respecto a los controles ($11,1 \pm 7,5$ frente a $4 \pm 2,4$ ng/ml; $p < 0,01$). Para calcular las diferencias entre medias se ha utilizado la prueba de la t de Student para datos emparejados. * $p < 0,01$

ción de los síntomas de la enfermedad era de $11,6 \pm 7,1$ meses (rango: 3-30 meses). Ocho pacientes recibían tratamiento (glucocorticoides asociados o no a azatioprina o sólo azatioprina).

La concentración plasmática de TGF- β_1 fue significativamente superior en los pacientes con FPI respecto a los controles ($11,1 \pm 7,5$ frente a $4 \pm 2,4$ ng/ml; $p < 0,01$) (fig. 1). Se observó una débil relación inversa entre la concentración plasmática de TGF- β_1 y los valores de la capacidad pulmonar total ($r = -0,47$; $p < 0,01$) y de capacidad vital forzada ($r = -0,48$; $p < 0,01$), pero no con el resto de parámetros funcionales respiratorios. No se observó diferencia significativa en la concentración de TGF- β_1 entre los pacientes fumadores y no fumadores, ni entre los tratados y no tratados. Tampoco se encontró ninguna relación entre la edad y la concentración plasmática de TGF- β_1 ni en el grupo control ni entre los pacientes con FPI.

Se evaluó a 13 pacientes $8 \pm 1,2$ meses (rango: 5-9 meses) después de la determinación de la concentración de TGF- β_1 . A todos ellos se les practicaron una exploración funcional respiratoria y una segunda determinación de TGF- β_1 . En conjunto, los pacientes presentaron un deterioro funcional respiratorio. Con el objeto de deter-

TABLA I
Exploración funcional respiratoria de los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática en el momento de la primera determinación del factor transformador del crecimiento β_1

	Valor absoluto	Valores de referencia (%)
FVC (l)	$2,6 \pm 0,8$	$73,2 \pm 18$
TLC (l)	$43,3 \pm 12,5$	$75,3 \pm 16$
DLCO (ml/min/mmHg)	$11,4 \pm 3,1$	$49,3 \pm 13$
D(A-a)O ₂ (mmHg)	$37,2 \pm 12$	

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. D(A-a)O₂: diferencia alveoloarterial de oxígeno; DLCO: capacidad de transferencia para el monóxido de carbono; FVC: capacidad vital forzada; TLC: capacidad pulmonar total.

TABLA II

Cambios en la exploración funcional respiratoria durante el seguimiento de los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática

Variable	Valor
N.º de pacientes	13
Tiempo de seguimiento (meses)	8 \pm 1,2
FVC (%)*	-0,4 \pm 1,1
DLCO (%)*	-1,28 \pm 1,4

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. DLCO: capacidad de transferencia para el monóxido de carbono; FVC: capacidad vital forzada; TLC: capacidad pulmonar total.

*Valores expresados como porcentaje del cambio del valor absoluto respecto al valor inicial, dividido por los meses de seguimiento.

minar con más precisión los cambios de la exploración funcional respiratoria durante el seguimiento, éstos se valoraron con relación al tiempo de seguimiento. Se dividieron los cambios funcionales observados por el tiempo de seguimiento (tabla II). La concentración de TGF- β_1 fue de 18,2 \pm 15 ng/ml en la segunda determinación. En el conjunto de estos 13 pacientes la primera determinación de TGF- β_1 era de 10,9 \pm 7,9 ng/ml, sin diferencias significativas respecto a la segunda determinación. No se observó ninguna relación entre la concentración de TGF- β_1 y la exploración funcional respiratoria, ni entre los cambios en la concentración de TGF- β_1 y los cambios funcionales respiratorios durante el seguimiento.

Discusión

El presente estudio demuestra que la concentración plasmática de TGF- β_1 está elevada en los pacientes con FPI. No obstante, los resultados obtenidos indican que no sería un parámetro útil para valorar la actividad de la enfermedad y su evolución, ya que no se observó ninguna relación entre la variación de la concentración de TGF- β_1 y el cambio evolutivo de los parámetros funcionales respiratorios.

Los parámetros que se utilizan actualmente para valorar la evolución y la respuesta al tratamiento en la FPI son las alteraciones en la tomografía axial computarizada de alta resolución y en la exploración funcional respiratoria^{12,13}. En los últimos años se han realizado diversos estudios con el fin de determinar la utilidad de marcadores séricos para optimizar el diagnóstico y el control de la progresión de la FPI¹⁴⁻²², marcadores que podrían tener también un papel en la valoración de la respuesta terapéutica²³. El objetivo del presente estudio fue investigar si la determinación en plasma del TGF- β_1 es útil para valorar el pronóstico de la FPI. El TGF- β_1 es uno de los mediadores profibróticos que tienen más protagonismo en la patogenia de las enfermedades pulmonares fibrosantes^{7,8,10,11}. Salez et al²⁴ demostraron que su concentración está elevada en el lavado broncoalveolar de los pacientes con FPI. Asimismo, se ha observado que los polimorfismos del gen del TGF- β_1 se asocian con el desarrollo de fibrosis pulmonar en el pulmón trasplantado por enfermedades pulmonares, como la fibrosis quística, la FPI, las bronquiectasias y el enfisema, y con la progresión de la FPI²⁵⁻²⁸. Por otra parte, Anscher et al²⁹ observaron una relación significativa en-

tre la concentración plasmática de TGF- β_1 y el desarrollo de neumonitis intersticial idiopática en pacientes con trasplante autólogo de médula ósea. Sin embargo, sólo se ha realizado un estudio en el que se ha analizado la concentración plasmática de TGF- β_1 como factor pronóstico en la FPI¹⁴. En este estudio se determinaron las concentraciones plasmáticas de TGF- β_1 en 38 pacientes con FPI y 6 controles sanos. Los resultados demostraron, al igual que en el presente estudio, que la concentración plasmática de TGF- β_1 era significativamente superior en los pacientes con FPI. No obstante, disminuyó de forma significativa en 6 pacientes que fueron tratados durante 3 meses con glucocorticoides y colchicina. En cambio, en el presente estudio el tratamiento con glucocorticoides e inmunodepresores no tuvo ningún efecto en la concentración plasmática de TGF- β_1 . En el estudio de Yong et al¹⁴ no se analizó la relación entre la concentración plasmática de TGF- β_1 y las alteraciones en la exploración funcional respiratoria¹⁴. En el presente estudio se observó una relación débil de la capacidad vital forzada y de la capacidad pulmonar total con la determinación inicial de TGF- β_1 en plasma. Sin embargo, cuando se compararon los cambios funcionales respiratorios con la variación en la concentración de TGF- β_1 durante el seguimiento de los pacientes, no se demostró ninguna relación. Las discrepancias entre los resultados de los 2 estudios y la variabilidad en la relación entre los cambios funcionales respiratorios y los valores de TGF- β_1 probablemente responden, en parte, al escaso número de pacientes evaluados después de la primera determinación del TGF- β_1 . Otro factor que podría influir en esta variabilidad es la existencia de otros mediadores implicados en la FPI^{2-5,14} que interactúan con el TGF- β_1 . Este hecho hace poco probable que la concentración sérica de un solo mediador fibrogénico sea útil para valorar el pronóstico y la evolución de la enfermedad.

Otros marcadores séricos que se han analizado en pacientes con FPI son las proteínas A y D del surfactante, el marcador de alteraciones de las células alveolares epiteliales KL-6, la lactatodeshidrogenasa, la interleucina-8, la molécula de adhesión E-selectina, el factor soluble del marcador de apoptosis Fas y la proteína I quimioattractante de los monocitos¹⁵⁻²². Estos estudios han demostrado que las concentraciones de los mencionados marcadores están elevadas en los pacientes con FPI. A pesar de haberse observado que las proteínas A y D del surfactante guardan relación con la supervivencia de los pacientes y que la proteína KL-6 posee un valor discriminativo para distinguir las enfermedades intersticiales difusas de otras enfermedades pulmonares, no hay evidencia de que su determinación seriada sea eficaz para evaluar el pronóstico y la evolución de la FPI^{15-17,20-22}.

Una de las posibles limitaciones del presente estudio es la diferencia de edad entre el grupo control y los pacientes con FPI. Si bien es cierto que no se conoce si la edad influye en la concentración plasmática de TGF- β_1 , no se ha observado ninguna relación entre la edad de los sujetos incluidos en el estudio y los valores de TGF- β_1 .

En conclusión, el presente estudio indica que la determinación de la concentración plasmática de TGF- β_1 podría utilizarse como un dato analítico más en el diagnóstico de la FPI, pero no como un "biomarcador", ya que no es un parámetro útil para valorar el pronóstico de la enfermedad ni la respuesta al tratamiento. No obstante, serían necesarios más estudios, con un mayor número de pacientes y más tiempo de seguimiento, para ratificar los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. King TE, Schwarz M, Brown K, Ose J, Coolí T, Waldron J, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1025-32.
2. Noble PW, Homer RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights into pathogenesis. *Clin Chest Med.* 2004;25:749-58.
3. Fellrath JM, Du Bois RM. Idiopathic pulmonary fibrosis/cryptogenic fibrosing alveolitis. *Clin Exp Med.* 2003;3:65-83.
4. Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:1534-8.
5. White ES, Lazar MH, Thannickal VJ. Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 2003;201:343-54.
6. Ramos C, Montano M, García-Álvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, et al. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:591-8.
7. Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest.* 2004;125:754-65.
8. Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor beta-1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:6642-6.
9. Khalil N, Parek TV, O'Connor R, Antman N, Kepron W, Yehaulaeshet T, et al. Regulation of the effects of TGF- β_1 by activation of latent TGF- β_1 and differential expression of TGF- β receptors (T β R-I and T β R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 2001;56:907-15.
10. Westergren-Thorsson G, Hermnas J, Sarnstrand B, Oldberg A, Heinegard D, Malmstrom A. Altered expression of small proteoglycans, collagen, and transforming growth factor- β in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *J Clin Invest.* 1993;92:632-7.
11. Xu YD, Hua J, Mui A, O'Connor R, Grotendorst G, Khalil N. Release of biologically active TGF-beta1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285:L522-L6.
12. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:646-64.
13. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodríguez E, et al. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas. *Arch Bronconeumol.* 2003;39:580-600.
14. Yong SJ, Adlakha A, Limper AH. Circulating transforming growth factor- β_1 : a potential marker of disease activity during idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2001;120:68S-70S.
15. Greene K, King TE, Kuroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, Newman LS, et al. Serum surfactant proteins-A and D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2002;19:439-46.
16. Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, et al. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:378-81.
17. Takahashi N, Fujishima T, Koba H, Murakami S, Kurokawa K, Shibuya Y, et al. Serum surfactant proteins A and D as prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis and their relationship to disease extent. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1109-14.
18. Matusiewicz SP, Williamson IJ, Sime PJ, Brown PH, Wenham PR, Crompton GK, et al. Plasma lactate dehydrogenase: a marker of disease activity in cryptogenic fibrosing alveolitis and extrinsic allergic alveolitis. *Eur Respir J.* 1993;6:1282-6.
19. Ziegenhagen MW, Zabel P, Zissel G, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Serum level of interleukin 8 is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and indicates disease activity. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:762-8.
20. Yokohama A, Kohno N, Hamada H, Sakatani M, Ueda E, Kondo K, et al. Circulating KL-6 predicts the outcome of rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1680-4.
21. Hayashi S, Abe K, Matsuoka H, Goya S, Morishita H, Mori M, et al. Increased level of soluble E-selectin in the serum from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Inflammation.* 2004;28:1-5.
22. Kuwano K, Maeyama T, Inoshima I, Ninomiya K, Hagimoto N, Yoshimi M, et al. Increased circulating levels of soluble Fas ligand are correlated with disease activity in patients with fibrosing lung diseases. *Respirology.* 2002;7:15-21.
23. Ancochea J, Antón E, Casanova A. Nuevas estrategias terapéuticas en la fibrosis pulmonar idiopática. *Arch Bronconeumol.* 2004;40 Supl 6:16-22.
24. Salez F, Gosset P, Copin MC, Degros CL, Tonnel AB, Wallaert B. Transforming growth factor- β_1 in sarcoidosis. *Eur Respir J.* 1998;12:913-99.
25. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnot PJ, Hutchinson IV. Genotype variation in the transforming growth factor- β gene. *Transplantation.* 1998;66:1014-20.
26. El-Gamel A, Awad M, Sim E, Hasleton P, Yonan N, Egan J, et al. Transforming growth factor- β and lung allograft. *Eur J Cardiothoracic Surg.* 1998;13:424-30.
27. El-Gamel A, Awad M, Hasleton P, Yonan NA, Hutchinson JA, Campbell CS, et al. Transforming growth factor- β genotype and lung allograft fibrosis. *J Heart Lung Transplant.* 1999;18:517-23.
28. Xaubet A, Marín-Arguedas S, Lario S, Ancochea J, Morell F, Ruiz-Manzano J, et al. TGF beta-1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:431-5.
29. Anscher MS, Peters WP, Reisenbichler H, Petros W, Jirtle RL. Transforming growth factor- β as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 1993;328:1592-8.