

# Microalbuminuria y proteína C reactiva ultrasensible como potenciales biomarcadores de inflamación sistémica en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

**Autores:** Fernández Jesica Noelia, Kevorkof Gregorio Varujan, Acosta María Alejandra, Castro Mara Soledad, Oviedo Eduardo Enrique, Najo Martin Augusto, Ubal Leonardo Germán, Yapur Bassani Natalia, Lerda Marcelo, Camporro Fernando

Hospital Tránsito Cáceres de Allende, Córdoba, Argentina

## Resumen

Si bien aún no hay una definición precisa de inflamación sistémica en EPOC, su reconocimiento se ha basado en estudios que han demostrado un aumento de concentración plasmática de diversos marcadores inflamatorios entre ellos proteína C reactiva (PCR) y, en los últimos años se ha postulado también la microalbuminuria. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la microalbuminuria y la PCR como potenciales biomarcadores de inflamación sistémica. Para ello se reclutaron pacientes EPOC estable y tabaquistas no EPOC diagnosticados mediante espirometría, mayores a 40 años sin HTA ni diabetes tipo I ó II, en el periodo comprendido entre octubre de 2017 a marzo de 2019. A ambos grupos se le extrajo una muestra de sangre venosa para determinar PCR ultrasensible y 3 muestras de orina para determinar microalbuminuria, tomando una media de las mismas. Se consideró albuminuria significativa cuando en al menos dos de tres determinaciones hubiese valores entre 30 y 300 mg/g de creatinina urinaria. La PCR ultrasensible se consideró positiva con un valor igual o superior a 5 mg/L. De los 47 pacientes analizados se obtuvo una albuminuria media de  $13.91 \pm 5.04$  en el grupo EPOC en comparación con  $2.50 \pm 0.36$  del grupo control. De la misma forma se compararon las medias de PCR ultrasensible, arrojando un valor de  $5.06 \pm 2.24$  en los pacientes EPOC en relación a  $2.46 \pm 0.51$  de los controles. Ambas variables mostraron diferencias estadísticamente no significativas entre los grupos de estudio ( $p = 0,058$  para albuminuria media y  $p = 0.330$  para PCR ultrasensible).

**Palabras clave:** Microalbuminuria; PCR; Inflamación sistémica; Biomarcadores; EPOC

## Introducción

El patrón inflamatorio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) incluye a neutrófilos, macrófagos y linfocitos (fundamentalmente CD8). Estas células liberan mediadores inflamatorios que atraen células desde la circulación que amplifican el proceso inflamatorio e inducen cambios estructurales. Dicho proceso es amplificado aún más por el estrés oxidativo asociado y excesos de proteasas en el pulmón<sup>1</sup>.

La mayoría de los pacientes con EPOC tienen enfermedades crónicas concomitantes vinculadas a los mismos factores de riesgo: tabaco, envejecimiento e inactividad, lo que lleva a un mayor impacto en el pronóstico y calidad de vida. Los mediadores inflamatorios en la circulación pueden iniciar o empeorar otras patologías presentes en estos pacientes tales como: insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca isquémica, hipertensión arterial (HTA), osteoporosis, anemia normocítica, diabetes y síndrome metabólico<sup>2</sup>.

Sin embargo, aún no hay una definición precisa de inflamación sistémica en EPOC. Su reconocimiento se ha basado en estudios que han demostrado un aumento de concentración plasmática de diversos marcadores inflamatorios: TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, proteína C reactiva (PCR), fibrinógeno y leucocitos en pacientes con EPOC estable comparados con los mismos parámetros en una población normal<sup>3</sup>.

La liberación de estas proteínas inflamatorias lesiona el endotelio, lo que induce grave disfunción de la microcirculación<sup>4</sup>. El endotelio vascular, al actuar como membrana semipermeable, ante cualquier desequilibrio, incrementa su permeabilidad con la consiguiente disfunción endotelial facilitando una filtración anormal de proteínas<sup>5, 6</sup>.

En los últimos años se ha postulado también que la microalbuminuria sería predictor de dicha disfunción endotelial. El glomérulo, como extensión del endotelio vascular, también se lesiona durante la respuesta inflamatoria sistémica, produciendo consecuencias graves en factores hemodinámicos locales y el diámetro de los poros, lo cual resulta en filtración de proteínas<sup>7</sup>.

Basado en los anteriores antecedentes, la microalbuminuria y la PCR ultrasensible podrían ser importantes indicadores para predecir el daño sistémico asociado a EPOC<sup>8</sup>.

### Objetivo principal

Determinar la microalbuminuria como potencial biomarcador de inflamación sistémica en pacientes con EPOC estable en comparación con tabaquistas no EPOC.

### Objetivo secundario

Valorar la Proteína C Reactiva (PCR) ultrasensible como otro probable indicador asociado a dicha patología.

## Materiales y Métodos

Estudio analítico, observacional y transversal. Se utilizó como muestra a pacientes que concurren espontáneamente a consultorios externos de Neumonología en Hospital Tránsito Cáceres de Allende quienes firmaron el consentimiento informado (versión 1.3 - 2017 aprobado por Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del adulto - Ministerio de Salud Provincia de Córdoba; se adjunta en anexo), en el período comprendido entre octubre de 2017 a marzo de 2019.

### Criterios de inclusión

1. Pacientes con diagnóstico de EPOC (Definida según GOLD por un cociente FEV1/FVC postbroncodilatador < a 0.70, lo que confirma la presencia de una limitación persistente al flujo aéreo, en pacientes con síntomas apropiados y exposiciones a estímulos nocivos, principalmente el humo del tabaco)<sup>9</sup> estable: estadios 1 [leve], 2 [moderado], 3 [grave] y 4 [muy grave] según la clasificación GOLD de la gravedad de EPOC<sup>10</sup>, diagnosticados previamente con espirometría.
2. Edad superior a 40 años.
3. Sexo femenino y masculino

### Criterios de exclusión

1. Hipertensión arterial (HTA).
2. Diabetes mellitus 1 y 2 (DM).
3. EPOC exacerbada, definida como empeoramiento agudo de los síntomas respiratorios que lleva al empleo de un tratamiento adicional; aumento de la disnea, tos y purulencia y volumen del esputo, en el último año<sup>11</sup>.
4. Enfermedad renal aguda y crónica.
5. Infección del tracto urinario (ITU).
6. Hematuria macroscópica.
7. Embarazadas.
8. Pacientes que hayan realizado actividad física y hayan tenido fiebre al momento de la consulta.
9. Sedimento urinario patológico.

Además se conformó un grupo control integrado por fumadores de ambos sexos mayores de 40 años no EPOC (descartando obstrucción al flujo aéreo por espirometría), sin HTA ni DM tipo 1 ó 2 o infección respiratoria aguda, manteniendo los restantes criterios de exclusión establecidos anteriormente.

A cada paciente se le constataron los siguientes datos: edad, carga tabáquica (paquetes/año), antecedentes personales patológicos (según registro de los mismos por historia clínica), realizándose un examen físico neumonológico completo con toma de presión arterial, saturación arterial de oxígeno e índice de masa corporal (IMC). Se solicitó un análisis sanguíneo (ver variables de laboratorio) y muestras de orina, considerando la primera orina de la mañana de tres determinaciones con un intervalo máximo entre cada muestra de una semana. Los pacientes concurren en 3 oportunidades al hospital, una primera vez donde fueron reclutados y se les realizó el examen físico, la extracción de sangre y entrega de 1° muestra de orina, y luego a la entrega de la 2° y 3° muestra de orina respectivamente. Los datos obtenidos de cada paciente se registraron en una planilla.

Las variables analizadas fueron las siguientes:

- o Variables demográficas: edad (años), sexo, talla (metros), peso (kg).
- o Variables clínicas: presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD) expresadas en mmHg, tomadas de acuerdo a la técnica con esfigmomanómetro recomendada por el VIII Joint Commit for HTA<sup>12</sup>, IMC expresado en kg/m<sup>2</sup>, saturación de oxígeno mediante oxímetro de pulso portátil Choicemmed MD300C, espirometría pre/post broncodilatadora, realizada con espirómetro Medgraphic según recomendaciones de la ATS<sup>13</sup>, utilizando principalmente como variable espirométrica el FEV1 (% del predicho).
- o Variables de laboratorio: citológico completo, PCR ultrasensible, glucemia, urea, creatinina, mdrd (filtrado glomerular), orina completa y MAO.

Para la determinación de las variables bioquímicas se extrajeron 10 ml de sangre venosa cubital o radial.

Las muestras de suero se centrifugaron a 2000 r.p.m durante 10 minutos en centrífuga Giumelli y se procesaron en el autoanализador COBA C 311 para la determinación de PCR (mg/L), prueba inmunoturbidimétrica potenciada con partículas.

En el análisis de las orinas completas se emplearon tiras reactivas Multistix de SIEMENS, centrífuga Roleo 2080 (1500 r.p.m, 5 minutos) y microscopio óptico Labomet (objetivo 40x y 10x). Las mismas se centrifugaron a 2000 r.p.m durante 3 minutos para luego ser procesadas en COBA C 311 para el dosaje de creatininuria y albuminuria, esta última por ensayo inmunoturbidimétrico.

Se consideró que un paciente tiene albuminuria significativa cuando en al menos dos de tres determinaciones tuviera valores entre 30 y 300 mg/g de creatinina urinaria (< a 30 mg/g se consideró normal). En cuanto a la PCR ultrasensible se consideró positiva con un valor igual o superior a 5 mg/L<sup>14-17</sup>.

### **Análisis estadístico**

Los resultados cuantitativos se expresaron como media  $\pm$  error estándar realizando comparaciones de todas las combinaciones posibles de pares de medias por ANAVA multivariado.

Los resultados cualitativos se expresaron en número (porcentaje) y se analizaron con el test de Chi cuadrado.

Se estableció un nivel de significación de  $p < 0.05$  para todos los casos. Todos los análisis fueron realizados con el programa InfoStat versión 2018e.

## **Resultados**

Los resultados se obtuvieron de la muestra constituida por 47 personas, estando conformada por pacientes EPOC estables ( $n = 27$ ) y tabaquistas no EPOC pertenecientes al grupo control ( $n = 20$ ).

Se tuvieron en cuenta variables no determinantes y determinantes asociadas a EPOC las cuales se sometieron a análisis comparativo con el grupo control correspondiente. Dentro de las variables no determinantes, tal como lo muestra la tabla 1, ambos grupos resultaron homogéneos en cuanto a sexo, características antropométricas, recuento de glóbulos blancos (incluyendo valores absolutos y relativos

de eosinófilos y neutrófilos), glucemia y saturación de oxígeno (%). Este último dato mostró particular interés: al analizar el grupo de pacientes EPOC se demostró una media  $97.07 \pm 0.18$  en comparación con grupo control que arrojó un valor de  $97.45 \pm 0.15$ , no mostrándose diferencias significativas entre ambos grupos.

En cuanto a la presión arterial sistólica y diastólica, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 1**).

**TABLA 1.** Comportamiento de variables asociadas a EPOC no determinantes en relación con grupo control

Variable	EPOC	Tabaquista no EPOC	<i>p</i>
Sexo (%)	51.8% Hombres	35% Hombres	P = 0.2
	48.1% Mujeres	65% Mujeres	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26.44 ± 1.58	26.65 ± 1.32	P = 0.92
PAS (mmHg)	119.44 ± 2.30	110 ± 2.71	P = 0.01
PAD (mmHg)	77.78 ± 1.95	71.00 ± 2.04	P = 0.02
GB (10e3/uL)	8646.67 ± 416.07	9073.50 ± 807.19	P = 0.61
Eosinófilos Absolutos (‰)	0.21 ± 0.03	0.17 ± 0.02	P = 0.34
Eosinófilos Relativos (%)	2.02 ± 0.18	1.69 ± 0.19	P = 0.22
Neutrófilos Absolutos (‰)	6.89 ± 0.56	6.80 ± 0.80	P = 0.92
Neutrófilos Relativos (%)	59.30 ± 1.26	62.48 ± 2.22	P = 0.19
Glucemia (mg/dl)	94.07 ± 2.66	94.80 ± 2.74	P = 0.85
Saturación (%)	97.07 ± 0.18	97.45 ± 0.15	P = 0.13

Sexo y saturación de oxígeno en porcentajes (%); variables cuantitativas expresadas como media ± error estándar (X ± EE). P (Fisher) Anava.

Por otra parte, teniendo en cuenta las variables determinantes relacionadas a EPOC, la **Tabla 2** muestra la distribución etaria, la carga tabáquica (expresada en paquetes/año) y VEF1 mostrando heterogeneidad entre los grupos.

El grado de obstrucción al flujo aéreo de los pacientes EPOC queda expresada en la **Figura 1**. La mayoría de los pacientes presento obstrucción leve y moderada, en comparación con un bajo porcentaje correspondiente a la forma severa y muy severa.

**TABLA 2.** Comportamiento de variables determinadas asociadas a EPOC en relación con grupo control

Variable	EPOC	Tabaquista no EPOC	<i>p</i>
Edad (años)	57.52 ± 0.97	48.00 ± 1.86	P ≤ 0.0001
Paquetes/Año (N° cig × años/20)	47.06 ± 5.36	16.36 ± 2.73	P ≤ 0.0001
VEF1 (%)	68.44 ± 2.69	100.85 ± 1.67	P ≤ 0.0001
PCR Ultrasensible (mg/l)	5.06 ± 2.24	2.46 ± 0.51	P = 0.330
Albuminuria Media (mg/g)	13.91 ± 5.04	2.50 ± 0.36	P = 0.058

VEF<sub>1</sub> en porcentaje. Variables cuantitativas expresadas como media ± error estándar (X ± EE). P (Fisher) Anava.

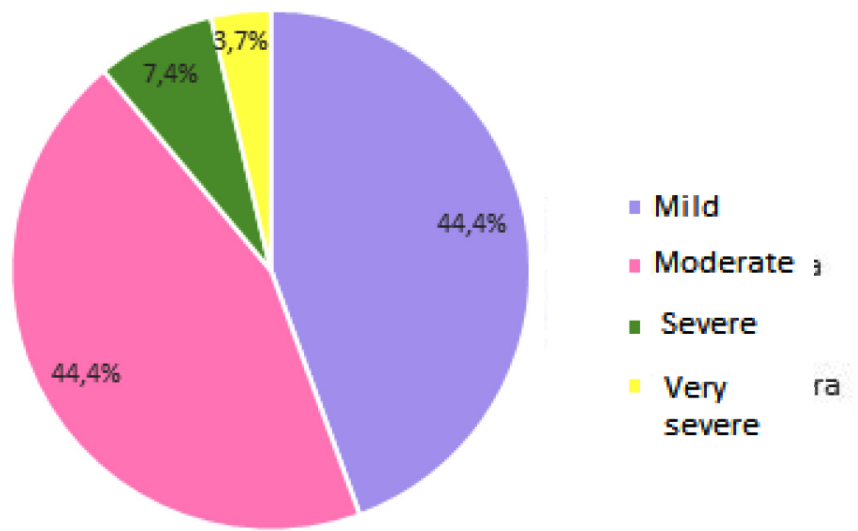


Figura 1. Patrones espirométricos en pacientes EPOC

En cuanto a las variables objetivo del presente estudio, se tuvieron en cuenta las medias de albuminuria y PCR ultrasensible del grupo EPOC (n= 27) comparadas con el grupo control (n= 20) (Tabla 2). En cuanto a la albuminuria, al encontrarnos con 3 determinaciones correspondientes a 3 muestras distintas de orina, se tomó una media de las mismas, la cual fue objeto de análisis conjuntamente con la PCR ultrasensible.

De esta forma, se obtuvo una albuminuria media de  $13.91 \pm 5.04$  en el grupo EPOC en comparación con  $2,50 \pm 0,36$  del grupo control (Figura 2). De la misma forma se compararon las medias de PCR ultrasensible, arrojando un valor de  $5.06 \pm 2.24$  en los pacientes EPOC en relación a  $2.46 \pm 0.51$  de los controles (Figura 3). Ambas variables mostraron diferencias estadísticamente no significativas entre los grupos de estudio ( $p= 0,058$  para albuminuria media y  $p= 0,330$  para PCR ultrasensible).

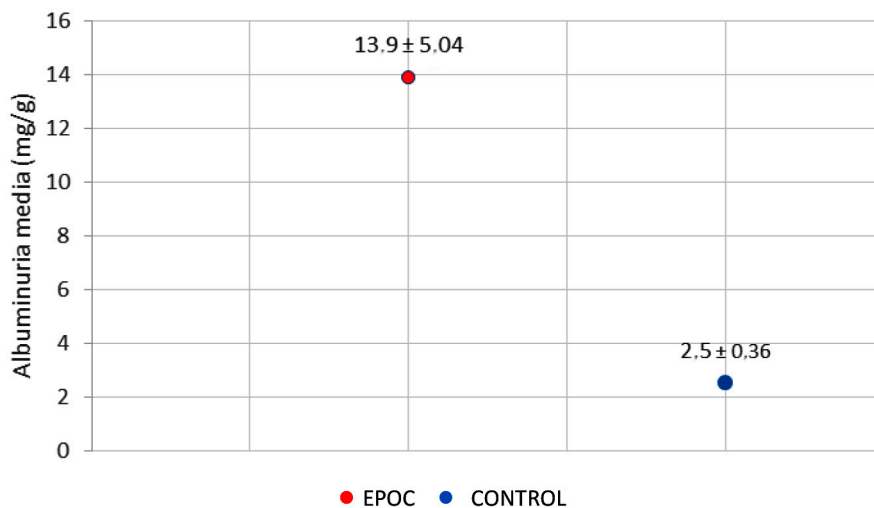


Figura 2. Relación de albuminuria media entre EPOC y Grupo control

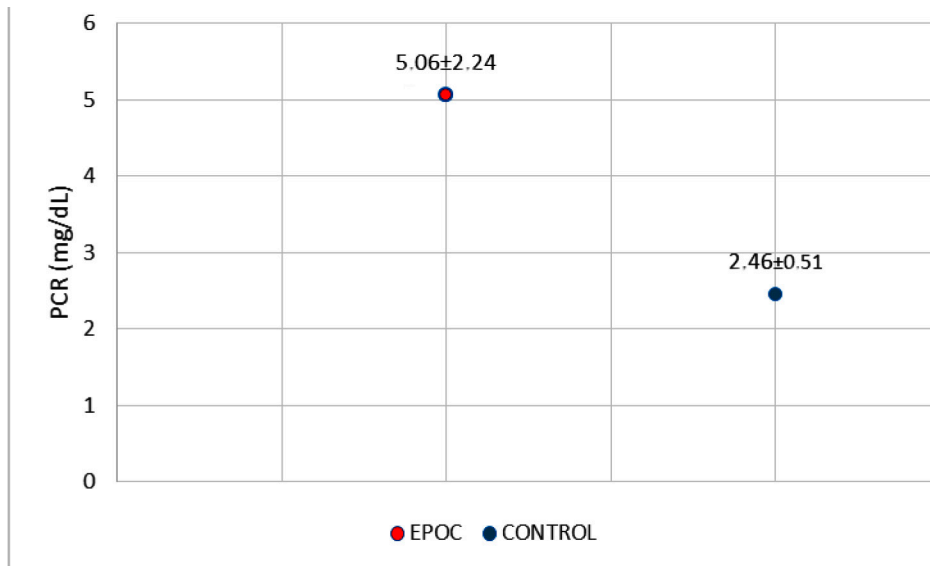


Figura 3. Relación de PCR ultrasensible entre EPOC y Grupo control

## DISCUSIÓN

Es un fenómeno emergente que la EPOC tiene sus efectos sistémicos en forma de alteraciones estructurales y bioquímicas en otros órganos además de los pulmones. Se ha citado que el endotelio vascular es un sitio importante en el que se producen los efectos sistémicos de la inflamación y, por lo tanto, la microalbuminuria es una manifestación indirecta del efecto de la inflamación sistémica sobre la permeabilidad endotelial renal<sup>18</sup>.

Diversos estudios han postulado a la microalbuminuria como un biomarcador de inflamación sistémica asociada a EPOC, muchos de los cuales no tuvieron solo en cuenta pacientes con enfermedad obstructiva estable y tampoco descartaron otras patologías que son causa de microalbuminuria como HTA y diabetes mellitus<sup>19-21</sup>.

Se ha reconocido que la EPOC se asocia con frecuencia a algún grado de inflamación sistémica. Es así como en pacientes en etapas estables de la enfermedad se ha descrito aumento de varios marcadores de inflamación sistémica en sangre periférica, tales como:  $TNF\alpha$ , IL-6, IL-8, proteína C reactiva (PCR), fibrinógeno, leucocitos y en los últimos años la microalbuminuria<sup>22</sup>.

En nuestro medio, es uno de los primeros estudios que determina una relación de marcadores inflamatorios, en este caso microalbuminuria y PCR ultrasensible entre pacientes con EPOC estable y tabaquistas no EPOC. Un trabajo previo, de Casanova et al, realizó una demostración similar, postulando que la microalbuminuria podría ayudar en la identificación de un subgrupo de pacientes EPOC con incremento de riesgo cardiovascular y potencial pronóstico adverso. En el mismo, los pacientes con EPOC tuvieron significativamente niveles mayores de microalbuminuria que los fumadores sin obstrucción, contrariamente en lo observado en el presente estudio, probablemente por un tamaño muestral pequeño y naturaleza transversal del trabajo.

En cuanto a la PCR, si bien hubo una tendencia al aumento de la misma en el grupo EPOC con respecto a los controles, al no ser significativa, nuestro estudio no logró demostrar una asociación positiva de la misma, del mismo modo que sucedió con la microalbuminuria. Es de destacar que Casanova et al no tuvo en cuenta este biomarcador, considerando que la microalbuminuria tiene mayor asociación con eventos cardiovasculares y muerte que la PCR. Estos hallazgos no fueron comprobados por nuestra investigación. Quizás demostraron un mayor aumento de albuminuria en su grupo de pacientes EPOC estable por no descartar sujetos con cifras elevadas de HTA, de hecho demostraron que los pacientes con

microalbuminuria tenían niveles más elevados de presión arterial sistólica. Pudieron determinar que la  $PO_2$  y la presión arterial sistólica fueron predictores significativos de niveles de microalbuminuria. Los niveles de esta última fueron inversamente proporcionales a la  $PO_2$ , de esta forma establecieron una alta prevalencia de la misma asociada con hipoxemia, otro hallazgo no demostrado por nuestro trabajo.

Los principales resultados de nuestro estudio consisten en demostrar una tendencia al aumento de la PCR (la cual se encontró discretamente por encima del punto de corte) y mayor albuminuria media (a pesar de que los valores se encontraron dentro de la normalidad, sin rango de microalbuminuria) en pacientes EPOC en comparación con los controles, lo que podría demostrar una tendencia a mayor grado inflamatorio en pacientes con enfermedad obstructiva. Consideramos que los datos no fueron estadísticamente significativos debido al tamaño muestral reducido.

Aunque el potencial de los biomarcadores en la EPOC es prometedor, actualmente no existe ninguno realmente diferenciador que nos permita predecir con precisión el desarrollo y la progresión de la enfermedad, la aparición de exacerbaciones, la respuesta a un determinado tratamiento o el riesgo de mortalidad<sup>23</sup>. Son necesarios más estudios que logren determinar la correlación de determinados biomarcadores con inflamación sistémica en pacientes EPOC.

En conclusión, la determinación de albuminuria no mostró diferencias significativas entre los grupos, si bien se evidenció mayor grado de la misma en pacientes EPOC con respecto a controles, esta no fue en rango de microalbuminuria, por lo que no se la puede considerar como biomarcador de inflamación sistémica en los pacientes con EPOC estable.

En cuanto a la PCR ultrasensible, se evidenció una tendencia al aumento de la misma en los pacientes con EPOC en comparación con los controles, pero no se constató una diferencia significativa entre los grupos para considerarla también como otro biomarcador de utilidad para predecir inflamación sistémica asociada.

## Bibliografía

1. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 7ma edición. Barcelona (España): Elsevier Saunders; 2009 (cap. 15 El Pulmón) p: 723-4.
2. Agustí A, Vogelmeier, Celli B, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. U.S National Library of Medicine, Bethesda, USA. 2018. 12-15, Chapter 1: definition and overview, pathology, pathogenesis and pathophysiology.
3. Casanova Macario C, de Torres Tajés JP, Córdoba Lanús E. EPOC: inflamación bronquial y sistémica. Arch Bronconeumol. 2010; 46(Supl 4): 9-15.
4. Resendiz-Hernández J, Camarena A. Mecanismos inmunológicos de la respuesta inflamatoria en el EPOC, NCT. 2010; 69(4): 210-7.
5. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 7ma edición. Barcelona (España): Elsevier Saunders; 2009.519-520: Cap 11; Vasos sanguíneos.
6. Badimón L, Martínez-gonzález J. Disfunción endotelial. Rev Esp Cardiol Supl. 2006; 6:21-30.
7. Alegre J, Alles A, Angerosa M. Implicancia de la Proteinuria en el Diagnóstico y Seguimiento de la Enfermedad Renal Crónica. Sociedad Argentina de Nefrología. Documento de Consenso. 2015;1-22.
8. Ford E, Cunningham TJ, Mannino DM. Inflammatory markers and mortality among US adults with obstructive lung function. Respirology. 2015; 20(4): 587-3.
9. Alvar A, Claus V, Celli B, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. 2019;(4).Chapter 2: diagnosis and initial assessment.
10. Casas A, Sansores R, Tokumoto A. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Asociación Latinoamericana de Tórax. Edición 1; 2011.Capítulo 2: Curso clínico, diagnóstico, espirométrico y estratificación de la gravedad. 12-18
11. Alvar A MD, Claus V MD, Celli B MD, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. U.S National Library of Medicine, Bethesda, USA. 2018. 100-2, Chapter 5: Management of exacerbations
12. Gómez-León Mandujano A, Morales López S, Álvarez Díaz CJ. Técnica para una correcta toma de la presión arterial en el paciente ambulatorio. 2016; 59: 49-55.
13. García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, et al. Espirometría. Arch Bronconeumol. 2013; 499: 388-401.
14. Alegre J, Alles A, Angerosa M, et al. Implicancia de la Proteinuria en el Diagnóstico y Seguimiento de la enfermedad renal crónica. Sociedad Argentina de Nefrología. Documento de consenso. 2016. 8-18.

15. Calabia E. Medida de la función renal. Evaluación del cociente microalbuminuria. Valor de la tira reactiva y del examen del sedimento urinario. Indicaciones para solicitar ecografía renal. *Nefrología*. 2004; 24 (Supl 6): 35-46.
16. Figueroa Casas J, Schiavi E, Mazzei J. Recomendaciones de la EPOC en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 2012;72 (Supl 1): 2-15.
17. Gorosito M, Santamaría R, Alcázar R. Documento de la Sociedad Española de Nefrología sobre las guías KDIGO para la evaluación y el tratamiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2014; 34 (Supl 3): 302-16.
18. Agrawal A, Garg R, Sahu D, Kumar M. Study the association of COPD with early endothelial dysfunction and its impact on cardiovascular system by estimating urinary albumin creatinine ratio. *Lung India*. Pubmed. 2017; 34: 138-43.
19. Saldias F, Díaz O, Dreyse J, C et al. Etiología y biomarcadores de inflamación sistémica en las exacerbaciones leves a moderadas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Rev Med Chile*. 2012; 140: 10-8.
20. Jhon M, Hussain S, Prayle A, Simms R, Cockcroft JR, Bolton CE. Tarjet renal damage: the microvascular associations of increased aortic stiffness in patients with COPD. *John et al. Respiratory Research*. 2013; 14: 31.
21. Kaysoydu E, Arslan S, Yildiz G, Candan F. Factors Related to Microalbuminuria in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Adv Clin Exp Med*. 2014; 235): 749-55.
22. Morales A, Dreyse J, Diaz O, Saldias F, Carrasco F, Lisboa C. Marcadores de inflamación sistémica en pacientes ex fumadores con enfermedad pulmonar obstructiva crónica en etapa estable. *Rev med Chile*. 2010; 138: 957-64.
23. Izquierdo Alonso JL. Futuro de los marcadores biológicos en la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2017; 53: 541-2.