

# Cerebro, estrés y ovario poliquístico. Participación de la inervación simpática en el desarrollo de ovario poliquístico

VERÓNICA ARAYA<sup>a</sup>, PABLO JARA<sup>b</sup> Y HERNÁN E. LARA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Hospital Clínico J.J. Aguirre. Universidad de Chile. Santiago de Chile. Laboratorio de Neurobioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago de Chile. Chile.

Stress, as a general mechanism of sympathetic response, produces marked changes in the homeostasis of the body. It is well known that stress produces profound changes in sexual behavior and reproductive performance. In the present study we discuss stress-induced sympathetic nerve-mediated ovarian disturbance, which causes the most frequent ovarian disorder in women of reproductive age: polycystic ovary syndrome. We review central and peripheral mechanisms of regulation of sympathetic nerve activity and their role in polycystic ovary syndrome and provide a succinct outline of our findings in this area. The use of animal models to study the role of stress as an etiological factor in ovarian disorders and to translate this knowledge to patients with polycystic ovary syndrome provides strong support for the involvement of sympathetic nerves in normal and abnormal ovarian function.

*Key words:* Stress, polycystic ovary. Sympathetic innervation. Hyperandrogenemia.

El estrés, como un mecanismo general de respuesta simpática exagerada, involucra grandes cambios en la homeostasis del organismo. No existen dudas acerca de las alteraciones que provoca el estrés, tanto en el comportamiento sexual como en la capacidad reproductiva. En este trabajo discutiremos los cambios en la actividad nerviosa simpática que induce el estrés y su participación en la enfermedad ovárica de mayor frecuencia en mujeres durante su vida reproductiva, el síndrome del ovario poliquístico. Presentamos una revisión de los mecanismos centrales y periféricos de regulación de la actividad nerviosa simpática y su participación en el síndrome del ovario poliquístico. Se discute los resultados de nuestro grupo en esta área. El uso de modelos animales para estudiar la participación del estrés en enfermedad ovárica y trasladar este conocimiento hacia pacientes con síndrome de ovario poliquístico, apoya fuertemente la participación de los nervios simpáticos en la función ovárica en condiciones normales y patológicas.

*Palabras clave:* Estrés. Ovario poliquístico. Inervación simpática. Hiperandrogenemia.

## ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN OVÁRICA DE LOS NERVIOS SIMPÁTICOS DEL OVARIO

Las fibras simpáticas posganglionares que inervan el ovario derivan: *a)* de cuerpos celulares neuronales del ganglio ovárico, localizados en el origen de la arteria ovárica, y *b)* de cuerpos celulares de los plexos celíaco y renal<sup>1,2</sup>. En la rata, el ovario recibe su inervación simpática de dos fuentes: *a)* el plexo nervioso ovárico (PNO), que transcurre a través de la arteria ovárica, y *b)* el nervio ovárico superior (NOS), que se asocia con el ligamento suspensorio<sup>3</sup>. En general, las fibras del NOS inervan predominantemente los componentes secretorios del ovario, como la glándula intersticial y los folículos, mientras que las fibras del PNO son mayoritariamente perivasculares<sup>3</sup>.

La distribución intraovárica de las fibras simpáticas es similar en todas las especies, pero la densidad de la red varía considerablemente entre ellas<sup>2</sup>. Las fibras se asocian con la vasculatura, viajan a través del tejido intersticial y alrededor de los folículos en

Financiamiento: Fondecyt 1020581, DID Sal 002/2; ECOS/Conicyt.

Correspondencia: Dr. H.E. Lara.  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.  
Santiago de Chile. Chile.  
Correo electrónico: hlara@ll.ciq.uchile.cl

desarrollo, pero no penetran al cuerpo lúteo o a la capa de células de granulosa de los folículos. La inervación ovárica presenta un alto grado de plasticidad que se refleja en la rápida recuperación después del trasplante del órgano en un sitio ectópico<sup>4</sup>. La recuperación se manifiesta por la penetración ovárica de fibras nerviosas acompañadas de toda la maquinaria biosintética de noradrenalina (NA); 28 días después de la desnervación quirúrgica del NOS se recupera el contenido ovárico de NA al valor control<sup>5</sup>. Esta capacidad del ovario se debe probablemente al soporte trófico ejercido por la presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF) y sus receptores localizados en la glándula<sup>6,7</sup>. El bloqueo de la acción del NGF por la administración de anticuerpos contra el NGF, durante el período posnatal temprano, no sólo priva al ovario de los nervios simpáticos sino que también le impide reinervarse durante la vida adulta<sup>4</sup>.

Estudios morfológicos de histofluorescencia sugieren que las fibras son principalmente noradrenérgicas<sup>8,9</sup>, observación que confirma la medición bioquímica selectiva de catecolaminas ováricas<sup>10</sup>. En ese estudio, se mostró que adrenalina y dopamina, aunque detectables, forman una menor fracción de catecolaminas ováricas. Sin embargo, algunas diferencias existen entre especies; ya que hemos encontrado altos valores de dopamina en el ovario humano<sup>11</sup>. El posible papel fisiológico de la dopamina ovárica necesita ser aclarado debido a la presencia de receptores D<sub>1</sub>-dopaminérgicos en células de granulosa humana<sup>12,13</sup>.

### Activación nerviosa durante el ovario poliquístico

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es ampliamente reconocido como la causa más común de infertilidad en mujeres. El SOP es una enfermedad compleja, caracterizada por falla ovulatoria; presencia de ovarios quísticos multifoliculares, amenorrea, hiperandrogenemia y valores variables de gonadotropinas circulantes<sup>14</sup>. Está claro que el desarrollo del SOP depende de múltiples interacciones, pero aún no se logra consenso sobre las causas primarias que inician el síndrome. Esto se ha originado en gran medida por la falta de modelos de la enfermedad en primates no humanos. De hecho, el mono *Rhesus* no parece desarrollar ovario poliquístico (OP) en forma espontánea y de esa forma su utilidad como modelo animal para el estudio de la enfermedad ha sido limitado. Una forma de OP que presenta algunas características similares a las de humano como lo es la anovulación, la producción aumentada de andrógenos, los cambios en la razón de hormona luteinizante (LH)/hormona foliculostimulante (FSH) plasmática y la presencia de quistes ováricos multifoliculares<sup>14</sup>, puede estar inducida en ratas por la administración de valerato de estradiol (VE), un estrógeno de larga vida media. Usando este modelo hemos obtenido evidencias de que una hiperactivación de los nervios simpáticos que llegan al ovario es un constitu-

yente importante para la aparición y la persistencia del OP en la rata. La mayoría de los resultados que se discuten a continuación se refieren a este modelo experimental.

En 1993 encontramos<sup>15</sup> que el OP inducido por la administración de una dosis única de VE a ratas provoca cambios importantes en la homeostasis de catecolaminas ováricas, los que se inician antes del desarrollo de quistes y persisten después de que éstos se forman. Estos cambios incluyen un aumento en el contenido de NA ovárica y en la liberación de NA desde terminales nerviosas ováricas y una disminución en los receptores  $\beta$ -adrenérgicos presentes en las células de la teca y de la glándula intersticial del ovario. El incremento en NA liberada que se observó en ratas con OP después de 30 días de la administración de estradiol es incluso más pronunciada a los 60 días, es decir, cuando los quistes ováricos están completamente desarrollados<sup>15</sup>.

El aumento de la actividad de los nervios simpáticos durante el desarrollo de SOP en ratas se acompañó de un aumento de la sensibilidad en la respuesta secretora del ovario a la estimulación por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y gonadotropinas<sup>16</sup>. Es significativo que la capacidad secretora de progesterona y andrógenos de los ovarios quísticos al isoproterenol, un agonista  $\beta$ -adrenérgico, está aumentada, aunque la concentración de receptores  $\beta$ -adrenérgicos está disminuida. Una paradoja similar se observó cuando se estudió la respuesta secretora de progesterona inducida por zinterol, un agonista  $\beta_2$ -adrenérgico, durante el primer estro en la pubertad<sup>17</sup> y la respuesta de progesterona al isoproterenol durante el estro de ratas adultas<sup>16</sup>. En ambos casos la concentración de receptor  $\beta$ -adrenérgico estaba reducida, pero la activación de los receptores remanentes provocó una estimulación mucho mayor en la secreción de progesterona que en las otras fases del ciclo estral. Probablemente, el acoplamiento de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos a la adenililciclase se incrementa durante el OP. En apoyo a esta sugerencia, se ha demostrado que la activación constitutiva de la vía de transducción de señal que genera adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y característica del síndrome de McCune-Albright, también produce aumento en la secreción de esteroides ováricos junto con la formación de quistes foliculares<sup>18</sup>. La activación de la descarga noradrenérgica del ovario observado en animales con OP sugiere que un tono simpático anormalmente aumentado de la glándula es la base de la respuesta esteroidal aumentada del OP. La restauración de la ciclicidad estral y ovulación que resulta de la denervación del NOS<sup>16</sup>, que lleva la mayoría de los nervios que van a células endocrinas ováricas<sup>3</sup>, implica una anomalía neuronal que se relaciona con la persistencia de la condición de OP.

Aunque estos datos sugieren fuertemente la participación del sistema nervioso en el desarrollo y persistencia del OP, no permiten discriminar si la sobredosis de estradiol ha sido el estímulo primario que ha inicia-

do la enfermedad. De ser así, la activación nerviosa sería sólo una correlación entre múltiples cambios inducidos por el estradiol en el ovario. La activación de los nervios simpáticos ováricos está dirigido por un incremento de la expresión intraovárica de los genes que codifican al factor de crecimiento nervioso (NGF), y su receptor de baja afinidad, receptor de NGF p75<sup>19</sup>. Esto es especialmente importante, ya que ambos genes tienen elementos de respuesta para esteroides<sup>20</sup> y, por tanto, el estradiol tendría un sustrato génico sobre el que actuar y provocar los cambios en la actividad nerviosa. De hecho, el inmunobloqueo de las acciones de NGF y la administración intraovárica de un oligodeoxinucleótido antisentido a p75NGFR, parcialmente restauran la ciclicidad estral y la capacidad ovulatoria disminuida como consecuencia de la inducción de OP en ratas mediante la administración de VE<sup>19</sup>. Por otra parte, la sobreexpresión del gen para NGF, mediante el implante intraovárico de células genéticamente modificadas para producir NGF, aumentó la incidencia de folículos prequísticos acompañado con una disminución en el número de folículos antrales sanos. Por tanto, una producción anormalmente elevada de NGF es suficiente para iniciar varias de las alteraciones estructurales y funcionales asociadas con el desarrollo de quistes ováricos<sup>21</sup>, y quizá sea éste el estímulo que gatilla el aumento de la actividad nerviosa del ovario. ¿Es posible entonces que cambios en la actividad nerviosa simpática, independientes de un estímulo hormonal primario, sean capaces de crear una condición favorable para el desarrollo de OP?

## EFFECTOS DEL ESTRÉS Y ESTIMULACIÓN B-ADRENÉRGICA EN LA FORMACIÓN DE QUISTES OVÁRICOS

Considerando, entonces, la posibilidad de independizarse del efecto directo de estradiol como un factor etiológico primario en la formación de quistes, hemos estudiado la capacidad del estrés para activar los nervios simpáticos e inducir cambios en el desarrollo folicular y la formación de quistes<sup>22</sup>. Para el diseño del protocolo de estrés hay que considerar que estudios de cinética del desarrollo folicular utilizando ratones, hámsteres y ratas (y muy similar al humano), han demostrado que se necesitan 20 días para realizar un ciclo folicular completo, es decir, desde que ingresa la cohorte de folículos en desarrollo hasta la ovulación<sup>23</sup>. Con esta evidencia preliminar, utilizamos un estrés crónico intermitente de frío y movimiento durante 3 y 11 semanas (3 h/día, de lunes a viernes). El procedimiento de estrés combinado aumentó la actividad nerviosa simpática del ovario así como los valores plasmáticos de corticosterona y el contenido de catecolaminas en la glándula adrenal<sup>22</sup>. Aunque el incremento de NA en el ganglio celiaco representa un efecto general del estrés en los nervios simpáticos similar al descrito en ganglio cervical superior después

de estrés de restricción al movimiento<sup>24</sup>, el efecto local del estrés en el ovario se demostró por el aumento en la capacidad de liberación de NA por el ovario de ratas estresadas<sup>22</sup>. El incremento en la actividad de los nervios autonómicos se correlacionó con la aparición de folículos prequísticos en el ovario. Períodos más largos de estrés no intensificaron los cambios en el desarrollo folicular; incluso después de 11 semanas de estrés no aparecieron quistes y se recuperó la actividad nerviosa simpática. La participación de corticosterona de origen adrenal parece ser la responsable de la reversión del efecto del estrés en la fisiología ovárica. En apoyo a esta sugerencia, Axelrod y Reisine<sup>25</sup> demostraron un efecto inhibitorio de corticosterona en la síntesis de NA. En apoyo a esto último, hemos encontrado que la adrenalectomía, por sí sola, incrementó la liberación de <sup>3</sup>H-NA y aumentó los receptores  $\beta$ -adrenérgicos del ovario<sup>26</sup>. Un incremento aún mayor en la liberación de NA apareció cuando el mismo procedimiento de estrés se aplicó a ratas adrenalectomizadas. Este resultado sugiere que el estrés crónico incrementa la actividad nerviosa simpática del ovario y que existe un control sobre dicha actividad por esteroides adrenales. Además, sugiere que el incremento en la actividad nerviosa se asocia con cambios en el desarrollo folicular y la aparición de estructuras quísticas en el ovario. Para aislarnos del efecto de estrés sobre los valores de corticosterona plasmática, hemos estudiado recientemente el efecto de un procedimiento de estrés crónico intermitente (4 °C durante 3 h/día, de lunes a viernes durante 3 o 4 semanas) que no modificó los valores de corticosterona plasmática<sup>27</sup>. A las 3 semanas de estrés, detectamos una disminución de NA en el ovario, pero después de 4 semanas, el neurotransmisor ovárico aumentó por encima de los valores control de ratas no sometidas a estrés. El desarrollo folicular fue modificado durante el procedimiento de estrés, y se observó una disminución en los folículos sanos preantrales después de 3 y 4 semanas de estrés. En paralelo con el incremento en el contenido de NA en el ovario a las 4 semanas de estrés, observamos una recuperación en la población de folículos antrales y la aparición de una nueva población de folículos que presentan una capa de células de la teca, que está hipertrofiada, situación característica en pacientes con SOP<sup>27</sup>.

Ya que la respuesta al estrés es un episodio multifactorial que involucra complejas respuestas neuroendocrinas, hemos aplicado recientemente un método para remedar una estimulación adrenérgica y estimular directamente los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, mediante la administración *in vivo* de isoproterenol, un agonista  $\beta$ -adrenérgico<sup>5</sup>. Utilizamos la administración de isoproterenol (125  $\mu$ g/g/día) durante 10 días, para estudiar los cambios inducidos por la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos *in vivo* sobre el desarrollo folicular ovárico. Ya que el período necesario para completar el desarrollo folicular es prolongado<sup>23</sup>, elegimos 3 tiempos diferentes; in-

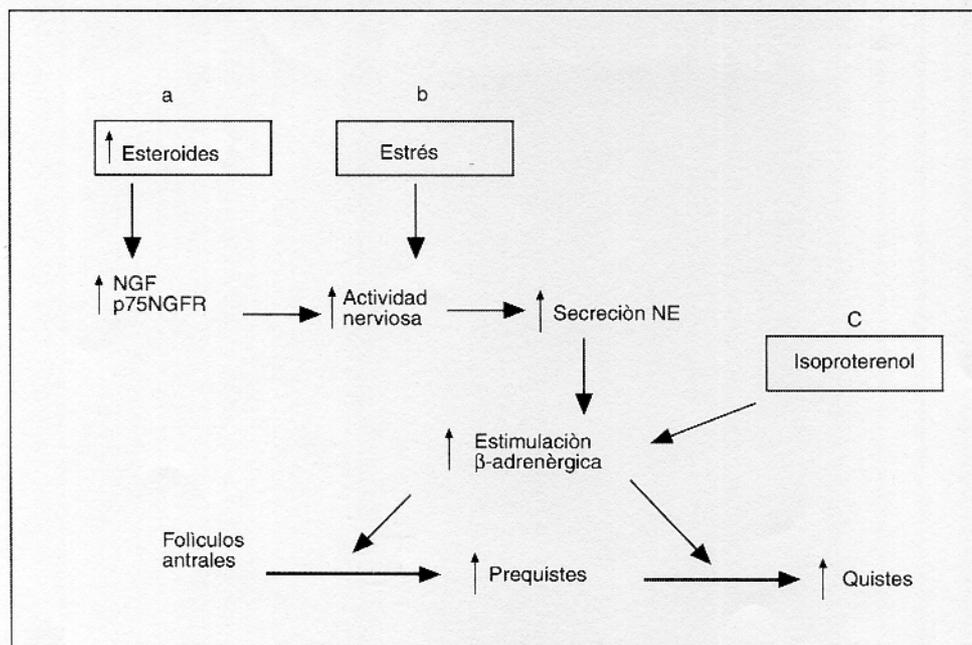


Fig. 1. Principales hallazgos en relación con los efectos de los esteroides, del estrés y de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos sobre el folículo ovárico de rata. NGF: factor de crecimiento nervioso; NA: noradrenalina.

mediatamente después de terminar el tratamiento, 20 y 30 días después. Al término del tratamiento con isoproterenol, el ovario ya presenta quistes foliculares. Ello se mantiene durante 20 días, pero después de 30 días de terminada la administración del agonista  $\beta$ -adrenérgico aparece un aumento aún mayor en el número de quistes. Probablemente, el mecanismo involucrado en estos procesos está asociado a una condición de hiperandrogenismo evocado por la estimulación crónica de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos inducida por isoproterenol, ya que el ovario de estas ratas presenta un aumento en la capacidad para secretar andrógenos cuando se incubaba *in vitro*<sup>5</sup>. Es interesante mencionar que este aumento sólo se presenta mientras el agonista  $\beta$ -adrenérgico está presente, ya que la producción de andrógenos por el ovario vuelve a valores control después de 20 y 30 días de terminado el tratamiento. Así, la administración crónica de un agonista  $\beta$ -adrenérgico incrementa la producción de andrógenos y puede inducir un desarrollo folicular aberrante, que finalmente conduce al desarrollo de quistes en un proceso que se expresa completamente después de 30 días de la administración de isoproterenol.

En la figura 1 se resumen los principales hallazgos con relación a los efectos de los esteroides, del estrés y de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos sobre la dinámica folicular del ovario de rata. Hemos encontrado que la administración de esteroides (a) y el estrés (b) producen una activación de los nervios simpáticos que está directamente relacionada con la generación de quistes ováricos ya que la administración de un agonista  $\beta$ -adrenérgico (c), remedia el proceso.

## CONCLUSIONES

Las evidencias presentadas en este artículo sugieren que el aumento crónico en la actividad nerviosa simpática ovárica produce cambios en el desarrollo folicular y ovarios anovulatorios no cíclicos que desarrollan quistes. El proceso parece ser reversible si la actividad simpática se atenúa. La descripción reciente de que en el ovario humano hay terminales nerviosos simpáticos que secretan NA, y que están acoplados a la síntesis de esteroides<sup>11</sup>, abre una interesante perspectiva de estudio de la regulación nerviosa en la producción de esteroides y desarrollo folicular en pacientes con SOP. El aumento de los valores de estrés que hemos encontrado en pacientes con SOP y los cambios en la respuesta supresora a dexametasona<sup>28</sup> parecen indicar que posiblemente existen mecanismos comunes de regulación que también pudieran estar afectados y advierten de la importancia a tratar el estrés en pacientes para disminuir el impacto en la persistencia del SOP y sus bien reconocidas complicaciones metabólicas asociadas con estrés y SOP.

## BIBLIOGRAFÍA

- Baljet B, Drukker J. Extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anat* 1979;104:243-67.
- Burden HW. The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: Ben-Jonathan N, Bahr JM, Weiner RI, editors. *Catecholamines as hormone regulators*. New York: Serono Symposia Publications, Raven Press, 1985; p. 261-78.
- Lawrence IE, Burden HW. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* 1980;196:51-9.

4. Lara HE, Dees WL, Hiney JK, Dissen GA, Rivier C, Ojeda SR. Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: contribution of the extrinsic innervation. *Endocrinology* 1991;129:1849-60.
5. Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, et al. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech* 2002;59:495-502.
6. Lara HE, Hill DF, Katz KH, Ojeda SR. The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology* 1990;126:357-63.
7. Lara HE, McDonald MJK, Ojeda SR. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 1990;126:364-75.
8. Jacobowitz D, Wallach EE. Histochemical and chemical studies of the autonomic innervation of the ovary. *Endocrinology* 1967;81:1132-9.
9. Ozman CH, Rosengreen E, Sjoberg NO. Adrenergic innervation of the human female reproductive organs: a histochemical and chemical investigation. *Obstet Gynecol* 1967;30:763-73.
10. Bahr JM, Ben-Jonathan N. Elevated catecholamines in porcine follicular fluid before ovulation. *Endocrinology* 1985;117:620-3.
11. Lara HE, Porcile A, Espinoza J, Romero C, Luza SM, Fuhrer J, et al. Release of norepinephrine from human ovary. Coupling to steroidogenic response. *Endocrine* 2001;15:187-92.
12. Mayerhofer A, Hemmings HC, Snyder GL, Greengard P, Boddien S, Berg U, et al. Functional dopamine-1 receptors and DARPP-32 are expressed in human ovary and granulosa cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:257-64.
13. Mayerhofer A, Fritz S, Grünert R, Sanders S, Duffy DM, Ojeda SR, et al. D1-receptor, DARPP-32 and PP-1 in the primate corpus luteum and luteinized granulosa cells: evidence for phosphorylation of DARPP-32 by dopamine and human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4750-7.
14. Yen SSC. Polycystic ovary syndrome (hyperandrogenic chronic anovulation). En: Yen SSC, Jaffe RB, editors. *Reproductive endocrinology*, Philadelphia: WB Saunders, 1999; p. 436-76.
15. Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante D, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 1993;133:2690-5.
16. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and  $\beta$ -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: Role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 1993;133:2696-703.
17. Ojeda SR, Aguado LI. Adrenergic control of the prepubertal ovary: Involvement of local innervation and circulating catecholamines. En: Ben-Jonathan N, Bahr JM, Weiner RI, editors. *Catecholamines as hormones regulators*. New York: Serono Symposia Publications, Raven Press, 1985; p. 293-310.
18. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman R, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 1991;325:1688-95.
19. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, et al. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low-affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 2000;141:1059-72.
20. Toran-Allerand CD. Mechanism of estrogen action during neural development: mediation by interactions with the neurotrophins and their receptors? *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996;56:169-78.
21. Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, et al. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgens secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 2000;141:1073-82.
22. Paredes A, Gálvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler JL, Bustamante D, et al. Stress promotes development of ovarian cyst in rats. The possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine* 1998;8:309-15.
23. Greenwald GS, Roy SK. Follicular development and its control. En: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1994; p. 629-724.
24. Nankova B, Kvetnansky E, Hiremagalur B, Sabban B, Rusnak M, Sabban EL. Immobilization stress elevates expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids. *Endocrinology* 1996;137:5597-604.
25. Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: their interactions and regulation. *Science* 1984;224:452-8.
26. Gálvez A, Paredes A, Fiedler JL, Venegas M, Lara HE. Effects of adrenalectomy on the stress-induced changes in ovarian sympathetic tone in the rat. *Endocrine* 1999;10:131-5.
27. Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL, Lara HE. Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod* 2003;68:2038-43.
28. Dorfman M, Araya V, Fiedler JL, Luna SL, Romero C, Lara HE. Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome [in press]. *Ann Rev Biomed Sci* 2003; 5.