

Terapia celular en enfermedades renales y cardiovasculares

JUAN MANUEL SENIOR SÁNCHEZ¹

RESUMEN

AUNQUE SE HAN LOGRADO GRANDES AVANCES en el campo de la biología molecular, todavía no se han esclarecido completamente los mecanismos responsables de la organogénesis y los factores que modulan el proceso de desarrollo, proliferación, crecimiento y maduración celulares durante la vida fetal y adulta. Los animales comparten la capacidad de regenerar tejidos y órganos, como un mecanismo biológico importante de defensa. En el caso del riñón, luego del daño tisular secundario a una noxa, se produce recuperación anatómica y funcional de la integridad, acompañada por la activación de un proceso sofisticado, mal comprendido, que lleva al reemplazo de las células tubulares dañadas por otras funcionalmente normales que reorganizan la arquitectura tubular. Este fenómeno de recambio se produce gracias a la presencia de células madre adultas somáticas exógenas, responsables del proceso de mantenimiento de la homeostasis renal, y posiblemente por células renales intrínsecas.

PALABRAS CLAVE

CÉLULAS MADRE RENALES
NEFROGENESIS
REGENERACIÓN RENAL
REGENERACIÓN TISULAR

.....
¹ Jefe del Grupo de Trasplante Cardíaco, Miembro del Grupo de Terapia Celular Regenerativa, Universidad de Antioquia - Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Profesor Asociado Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Recibido: septiembre 30 de 2005
Aceptado: junio 05 de 2006

SUMMARY

CELL THERAPY IN RENAL AND CARDIOVASCULAR DISEASE

ALTHOUGH THERE HAVE BEEN IMPORTANT ADVANCES in the field of molecular biology, the mechanisms responsible for nephrogenesis and the factors that modulate the process of development, proliferation, growth, and maturation during fetal and adult life have not been thoroughly explained. Animals, including mammals, share the intrinsic ability to regenerate tissues and organs as an important biological defense mechanism. In the case of the kidney, after tissue damage secondary to injury, anatomical and functional recovery of integrity is achieved, accompanied by the activation of a complex, poorly understood process, leading to the replacement of damaged tubular cells by functional ones that reorganize tubular architecture. This regeneration and repair process is produced by somatic, exogenous, adult stem cells, and probably by intrinsic renal stem cells, that are responsible for maintaining renal homeostasis

KEYWORDS

KIDNEY REGENERATION
NEPHROGENESIS
RENAL STEM CELLS
TISSUE REGENERATION

INTRODUCCIÓN

AUNQUE SE HAN LOGRADO GRANDES AVANCES en el campo de la biología molecular, no se han esclarecido completamente los mecanismos responsables de la organogénesis y los factores que modulan

este proceso de desarrollo, proliferación, crecimiento y maduración celulares durante la vida fetal y adulta.¹ El riñón adulto es una estructura compleja, dependiente del crecimiento y la diferenciación de líneas celulares precursoras hasta la formación de nefrones. Se estima que existen 26 tipos de células diferenciadas en el riñón, que se desarrollan a partir de cuatro líneas: los precursores epiteliales, los angioblastos y precursores endoteliales, los precursores del músculo liso y los precursores de células estromales.² El riñón se deriva del mesodermo, específicamente de tres estructuras: el pronefros, el mesonefros y el metanefros. Las dos primeras son transitorias, pero necesarias para la formación del órgano definitivo, el metanefros. Este aparece alrededor de la quinta semana de gestación y se inicia por la interacción del brote ureteral con las células mesenquimáticas del blastema nefrogénico. El brote ureteral induce al mesénquima a su diferenciación en epitelio tubular glomerular; a su vez el mesénquima inducido produce el crecimiento y la ramificación del uréter dentro del mesénquima renal. Alrededor de la punta de cada uno de los brotes ureterales, las células se agrupan en un proceso llamado condensación y forman una vesícula cuya hendidura inferior es penetrada por precursores celulares mesangiales y endoteliales. Como resultado del proceso nefrogénico, el mesénquima metanéfrico se diferencia en glomérulos, túbulos proximales, asas de Henle y fibroblastos intersticiales, mientras que el brote ureteral y sus ramificaciones dan origen al epitelio de los túbulos colectores.¹ La formación de nuevos nefrones se completa a las treinta y cinco semanas de gestación, en el ser humano. En la vida postnatal no se forman nuevos nefrones, pero los túbulos continúan su maduración por varios meses. Después de una lesión o noxa tisular se pueden regenerar segmentos de glomérulo por aumento de la longitud del capilar y su ramificación, con reabsorción del segmento esclerosado. En la misma dirección proliferan las células mesangiales y las células endoteliales glomerulares, mientras que los

podocitos expresan inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (IQDC), por lo que su capacidad regenerativa es pobre. Diversas familias de factores de transcripción y de crecimiento son esenciales para el desarrollo y la morfogénesis renales normales, entre ellos Pax 2, WT 1, Wnt, Emx 2 y BF 2 y otros.³

CICLO CELULAR

LA ACTIVIDAD DEL CICLO CELULAR es un componente intrínseco de la diferenciación y la morfogénesis, lo que se demuestra por sus altos niveles en la fase inicial del mesodermo y por la disminución gradual de la proliferación durante las últimas etapas de la embriogénesis. El ciclo celular es un proceso ordenado que lleva a la duplicación y transmisión de la información genética de una generación a la siguiente. Durante la división, el ADN debe ser replicado exactamente y las copias cromosómicas se distribuyen en forma idéntica, en dos células hijas. Está dividido en cuatro fases, a saber: G1 o Gap 1, S o de síntesis de ADN, G2 o Gap 2 y M o de mitosis.

La regulación del ciclo celular permite monitorizar los eventos que se producen en cada fase, antes de pasar a la siguiente, para asegurar la integridad del ADN e impedir la propagación de células dañadas o con mutaciones en su material genético.⁴ Esta regulación se produce en dos sitios estratégicos localizados al final de la fase G1, conocido como punto de restricción, y en la interfase de G2/M; G0 se refiere a la fase en que la célula se encuentra en estado quiescente, temporal o permanentemente, tal como en los cardiomiocitos y en las neuronas en la etapa postnatal.⁵ Reguladores positivos del ciclo celular como las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (QDC) se expresan en la etapa embrionaria cuando la actividad proliferativa es alta, mientras que la producción de los inhibidores de QDC (IQDC) está aumentada en el

corazón del adulto, cuando no hay actividad.⁵ Las ciclinas son la unidad reguladora y las QDC su porción catalítica; el complejo ciclina/QDC fosforila sustratos proteicos específicos que permiten la progresión del ciclo, con activación de la síntesis de ADN en la fase G1/S y formación de componentes estructurales asociados con la mitosis en la fase G2 y M.

El control del punto de restricción en la fase G1 está mediado por dos QDC, dependientes de las ciclinas D y E. La ciclina D en asociación con las QDC 4 y 6 fosforilan la proteína de supresión tumoral del retinoblastoma (RB), lo que permite la liberación del factor de transcripción E2F, y de esta forma su acción en la transcripción de diferentes genes necesarios para sobrepasar el punto de restricción. A medida que el ciclo progresa a través de la fase G1 aumenta la expresión de la ciclina E, la cual, en asociación con la QDC 2, es requerida para la transición de G1 a S. La integridad del genoma celular es monitorizada por el factor de transcripción p53, el cual opera a través de la regulación del IQDC p21 que previene la fosforilación de la RB, interrumpiendo en forma temporal el ciclo celular mientras se repara el ADN; si el daño de éste excede la capacidad reparativa celular, el p53 guía el proceso hacia la apoptosis, por inducir la expresión de la proteína proapoptótica Bax.⁴

REGENERACIÓN RENAL

LOS ANIMALES COMPARTEN LA CAPACIDAD de regenerar tejidos y órganos, como un mecanismo biológico importante de defensa. Algunos tejidos de los mamíferos, como el epitelio intestinal y la epidermis, poseen un alto grado de plasticidad y por lo tanto gran capacidad regenerativa. Este fenómeno de recambio se produce gracias a la presencia de células madre adultas somáticas.⁶

El riñón también posee una importante capacidad de regeneración. Luego del daño tisular secundario

a una noxa se produce recuperación anatómica y funcional de la integridad renal, la cual es acompañada por la activación de un sofisticado proceso, pobremente comprendido, que lleva al reemplazo de las células tubulares dañadas por otras funcionalmente normales que reorganizan la arquitectura tubular. Después de la nefrectomía unilateral se produce un crecimiento compensatorio del riñón contralateral y se aumenta la regeneración por la estimulación de un sistema renotrópico.⁶ El factor de crecimiento del hepatocito (FCH) es el principal candidato del sistema renotrópico, teniendo efecto no solo endocrino, sino también paracrino y autocrino. Las células del estroma renal producen el FCH, cuya estimulación produce la expresión del receptor c-Met por las células tubulares epiteliales y la activación de mecanismos mitogénicos, morfogénicos y antiapoptóticos.⁷

Otro mecanismo importante de respuesta a una lesión es la desdiferenciación y posterior proliferación del epitelio celular tubular, lo cual implica la pérdida de sus propiedades especializadas y la reaparición de marcadores mesenquimales detectados durante la nefrogénesis como la Vimentina y la Molécula neural de adherencia celular (N-CAM, por su sigla en inglés).⁸ Otro mecanismo propuesto es el de la presencia de células madre renales residentes en la papila, las cuales migran y se diferencian en células epiteliales.⁹ El reclutamiento de células madre derivadas de la médula ósea puede contribuir a la reparación del daño tisular, aunque no parece ser el mecanismo fisiopatológico más importante en la recuperación funcional renal.^{10,11}

El análisis de riñones de pacientes de sexo masculino trasplantados con el riñón de una donante de sexo femenino y que se recuperan de una falla renal aguda postransplante, revela en el material de biopsia que el 1% de las células tubulares

tienen cariotipo masculino y son negativas para CD45, lo cual demuestra que el tejido fue repoblado por células autólogas. Los trasplantados renales con las mismas características, pero que no presentaron falla renal, no expresan este tipo de células, evidenciando que en condiciones normales este proceso no ocurre.

CÉLULAS PROGENITORAS, TRONCULARES O MADRE

CADA CÉLULA SOMÁTICA DEL SER HUMANO posee el código genético completo, el cual permite el desarrollo y la expresión de absolutamente todas nuestras características fenotípicas y funcionales. Durante el crecimiento, nuestras células somáticas se diferencian y especializan con el objetivo de cumplir una función específica en un órgano determinado, sin que pierdan la información genética contenida en el ADN del organismo como un todo.¹² Este hecho permite la clonación reproductiva al transferir el núcleo de una célula adulta a un oocito enucleado, formando un blastocisto que se desarrolla al ser implantado en el útero materno; la clonación terapéutica se refiere al desarrollo de una línea celular embrionaria autóloga derivada de un embrión clonado y que puede ser utilizada para reemplazar tejidos.¹³

Las células progenitoras, tronculares o madre son indiferenciadas, poseen la capacidad de autorregeneración y pueden diferenciarse en múltiples líneas celulares. Mientras que las células progenitoras embrionarias se derivan de embriones de mamíferos en la etapa de blastocisto y tienen gran capacidad para generar cualquier tipo de célula del organismo, las células progenitoras adultas son parte de tejidos específicos del organismo postnatal en los cuales ellas pueden diferenciarse.¹⁴ Este tipo de células retienen algún grado de desarrollo de plasticidad, lo que les

permite diferenciarse en líneas celulares de diversos tejidos y capas germinales. Algunas células son totipotentes porque conservan la capacidad de desarrollar un organismo humano completo; otras son multipotentes y producen múltiples tipos celulares. Hay 200 billones de células en el cuerpo humano, 200 tipos de células se derivan de 20 ó 30 células madre.¹⁵ Las células madre de origen embrionario son totipotentes y pueden ser obtenidas para investigación o aplicación terapéutica de fetos abortados o no utilizados luego de fertilización in vitro; las células madre somáticas adultas residen en diferentes órganos, entre ellos la médula ósea, y son multipotentes, lo que les confiere una capacidad de diferenciación más limitada.¹⁴ (Tabla N° 1).

Tabla N° 1
TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE LAS
CÉLULAS MADRE

	AUTÓLOGA	ALOGÉNICA	EMBRIONARIA
Inmunosupresión	--	++	++
Carcinogénesis	--	?	++
Disponibilidad	++	?	?
Problemas éticos	--	++	++

-- No; ++ Si; ? Datos dudosos

TIPOS CELULARES

UNO DE LOS ASPECTOS IMPORTANTES, aún no resueltos, en la terapia celular regenerativa es el tipo de célula apropiada para reparar el tejido lesionado. Cada uno de los tipos celulares tiene un perfil característico con ventajas, limitaciones y aplicaciones prácticas, las cuales han permitido su utilización en experimentos clínicos.

Células madre embrionarias. Las células madre embrionarias son totipotentes, inmortales, deriva-

das de la capa interna del blastocisto. En condiciones especiales se diferencian en cuerpos embrioides multicelulares que desarrollan células de las tres capas germinales. Su utilización en estudios clínicos ha sido difícil debido a su inmunogenicidad, potencial teratogenicidad y a dilemas éticos y legales difíciles de superar.¹⁶

Células derivadas de la médula ósea. La médula ósea está compuesta por una población heterogénea de células de varios linajes y características. La fracción hematopoyética es responsable de la producción de más del 95% de las células sanguíneas. La fracción no hematopoyética está compuesta principalmente por células madre mesenquimáticas y en menor proporción por células adultas progenitoras multipotentes y células progenitoras endoteliales.¹⁷ Durante muchos años se les reconoció a las células madre derivadas de la médula ósea única y exclusivamente su capacidad para generar cada uno de los diferentes tipos de células sanguíneas, con su consecuente utilización en el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas. En la última década se ha demostrado su plasticidad para diferenciarse en células de diferentes capas germinales y órganos tales como las del hígado, riñón, pulmón, piel, tracto gastrointestinal, músculo esquelético y cardiomiocitos.¹⁸

Células madre hematopoyéticas. Estas células tienen una capacidad importante de autorregeneración y la posibilidad de diferenciarse en diversas líneas celulares. Además, se ha demostrado que poseen una alta capacidad de anidación, lo que les permite establecerse en un órgano determinado como cualquier célula nativa. Se ha utilizado la expresión de la molécula de superficie celular CD34 para marcar esta fracción hematopoyética; sin embargo, existen reportes que aseguran la ausencia de un marcador universal para identificar la célula madre de la médula ósea. Constituyen aproximadamente el 1 a 3% de las células de la médula.¹⁹ Se ha reportado la presencia de células hematopoyéticas CD34 negativas, las cuales son

más inmaduras que las CD34 positivas, aunque conservan su plasticidad.²⁰ Posiblemente la expresión de la molécula está en relación con el estado de activación más que con su comportamiento como célula madre.²¹ Como alternativa al CD34 se ha utilizado el CD133, el cual se expresa en células hematopoyéticas y en células progenitoras endoteliales, las cuales tienen la capacidad de integrarse para promover la neovascularización en tejidos isquémicos. Pueden ser aisladas por aspirado de médula ósea o de sangre periférica, aunque estas últimas expresan menor número de moléculas de adherencia, tienen menor plasticidad y deben ser estimuladas con el factor estimulante de crecimiento granulocítico.

Células madre mesenquimáticas. Las células madre mesenquimáticas tienen capacidad clonogénica y pueden diferenciarse en células maduras del cartílago, la grasa, el hueso, los tendones y músculos.²² Dada su multipotencialidad y facilidad para aislarse y expandirse en cultivos *in vitro* sin perder su capacidad como célula madre y su escasa inmunogenicidad, se las ha utilizado en múltiples estudios experimentales y clínicos para regeneración. No tienen un marcador universal que las diferencie, no poseen marcadores de células hematopoyéticas como CD31, CD34 y CD45 y expresan CD44, CD90, CD105, CD106 y CD166. Se aíslan de la médula ósea, la sangre periférica y el cordón umbilical.^{23,24}

Células progenitoras adultas multipotentes. Constituyen una población con un alto grado de plasticidad. A diferencia de las células mesenquimáticas, pueden ser cultivadas indefinidamente en un medio pobre en nutrientes; sin embargo, no está claro si son un grupo diferente o sólo una subpoblación normalmente presente en seres humanos, cuyas características son un fenómeno desarrollado bajo las condiciones de cultivos *in vitro*. Cambios específicos en factores de crecimiento inducen su diferenciación en células de las tres capas germinales.²⁵

Células progenitoras endoteliales. Estas células expresan CD133, CD34 y factor de crecimiento vascular endotelial 2 (VEGF2, por su sigla en inglés). La lesión vascular produce elevación de factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A, por su sigla en inglés) y el factor de crecimiento plaquetario (PLGF, por su sigla en inglés), los cuales a su vez activan la metaloproteínasa 9 (MMP-9), lo que conduce a aumento de la biodisponibilidad del ligando soluble de la citoquina sKit, desencadenando un fuerte estímulo para la proliferación y movilización de precursores hibernantes de la médula ósea, incluyendo los progenitores endoteliales marcados VEGF2 y cKit,²⁶ para la reparación vascular en la zona del daño.

Células progenitoras renales. Se ha demostrado la existencia de células madre renales, con un ciclo celular lento que permite su división para mantener el reservorio de células para recambio y reparación, que expresan Vimentina y E-Caderina.²⁷

Movilización de células madre. La movilización de células madre desde la médula ósea permite disponer de un número importante de ellas para la regeneración tisular y la neovascularización. El tejido lesionado libera sustancias que producen señales moleculares, que permiten la movilización del reservorio medular y la expresión de receptores para su anidación. El G-CSF moviliza células madre desde la médula ósea, mediante un mecanismo indirecto dado que no expresan el receptor específico. Una dosis del factor induce la expresión de CXCR4, el cual es importante para el tráfico y el reclutamiento de los linfocitos en los sitios de inflamación y potencia la capacidad de las células madre para la anidación y la diferenciación.²⁸ El riñón tiene la capacidad de producir G-CSF en respuesta a la isquemia y las células del asa ascendente lo producen por la exposición a especies reactivas de oxígeno, lo que explica la actividad inflamatoria durante las lesiones tisulares

y puede participar en el reclutamiento de células madre derivadas de la médula ósea.²⁹

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA TERAPIA CELULAR

No está claro el mecanismo principal por el cual la terapia celular actúa en el proceso de protección y reparación renal, específicamente las células derivadas de la médula ósea. Las células mesenquimáticas pueden reparar directamente las células tubulares por la secreción de factores que promueven la desdiferenciación y la proliferación de las células epiteliales tubulares o por estimular el aflujo de células madre renales residentes. Otras células derivadas de la médula ósea, posiblemente las células hematopoyéticas, mejoran el flujo sanguíneo medular renal y se transdiferencian o fusionan en células tubulares y participan en el reparación del túbulo.^{30,31}

En conclusión, la comprensión de los mecanismos de reparación tisular renal anuncia un horizonte alentador en la recuperación funcional del órgano y proporciona las bases científicas para la utilización de la terapia celular regenerativa, con el fin de disminuir la progresión del daño hacia el deterioro definitivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHERNAUSKY DR, SEQUEIRA LOPEZ ML, GOMEZ RA. Bases moleculares del desarrollo renal. *Arch Latin Nefr Ped* 2002; 2: 13-29.
2. HAMMERMAN MR. Applications of cell therapy to whole kidney replacement. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 1-3.
3. FOGO A. The potential for regression of renal scarring. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 223-225.
4. ISRAELS ED, ISRAELS LG. The cell cycle. *Stem Cells* 2001; 19: 88-91.
5. GUPTA PK. Key regulators of the cell cycle: 2001 Nobel Prize for Physiology or Medicine. *Current Science* 2001; 81: 1280-1287.
6. ANGLANI F, FORINO M, DEL PRETE, et al. In search of adult renal stem cells. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 474-487.
7. MATSUMOTO K, NAKAMURA T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potentials therapeutics for renal disease. *Kidney Int* 2001; 59: 2023-2038.
8. ABBATE M, BROWN D, BONVENTRE JV. Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999; 277: F454-F463.
9. OLIVER JA, MAAROUF O, CHEEMA FH, et al. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 2004; 114: 795-804.
10. LIN F, MORAN A, IGARASHI P. Intrarenal cells, not bone marrow derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest* 2005; 115: 1756-1764.
11. DUFFIELD J, PARK KM, HSIAO LL, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow derived stem cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 1743-1755.
12. SCHUARTZ Y, KORNOWSKI R. Progenitor and embryonic stem cell transplantation for myocardial angiogenesis and functional restoration. *Eur Heart J* 2003; 24: 404-411.
13. HOCHEDLINGER K, JAENISCH R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* 2003; 349: 275-286.
14. WEISSMAN IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157-168.
15. KORBLING M, ESTROV Z. Adult stem cells for tissue repair: A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003; 349: 570-582.

16. GARRY DJ, MASINO AM, MEESON AP, MARTIN CM. Stem cell biology and therapeutic applications. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 447-454.
17. HAIDER HKH, ASHRAF M. Bone marrow stem cell transplantation for cardiac repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2557-H2567.
18. HERZOG EL, CHAI L, KRAUSE DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-3493.
19. NAKAUCHI H. Haematopoietic stem cells: are they CD34-positive or CD34-negative? *Nat Med* 1998; 4:1009-1010.
20. HAIDER HKH, ASHRAF M. Bone marrow stem cells in the infarcted heart. *Coron Artery Dis* 2005; 16: 99-103.
21. SATO T, LAVER JH, OGAWA M. Reversible expression of CD34 by murine haematopoietic stem cells. *Blood* 1999; 94: 2548-2554.
22. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
23. KIM DK, FUJIKI Y, FUKUSHIMA T, et al. Comparison of haematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. *Stem Cells* 1999; 17: 286-294.
24. BIANCO P, RIMINNUCCI M, GRONTHOS S, ROBEY PG. Bone marrow stem cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-192.
25. JIANG Y, VAESSEN B, LENVIK T, et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002; 30: 896-904.
26. RAFII S, LYDEN D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; 9: 702-712.
27. LIN F, IGARASHI P. Searching for Stem/Progenitor cells in adult mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3290-3292.
28. ORLIC D, ARAI AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* 2002; 91: 1092-1102.
29. KIELAR M, JEYARAJAH R, LU CY. The regulation of ischemic acute renal failure by extrarenal organs. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11: 451-457.
30. KRAUSE D, CANTLEY LG. Bone marrow plasticity revisited: protection or differentiation in the kidney tubule. *J Clin Invest* 2005; 115: 1705-1708.
31. POULSOM R, ALISON M, COOK T, et al. Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: S48-S54.

