

# Estudo Morfométrico do Plexo Mientérico do Duodeno de Ratos Submetidos ao Alcoolismo

## Morphometric Study of Duodenum Myenteric Plexus in Rats Submitted to Alcoholism

Michel de Lima Arceles<sup>a</sup>; Sama Beatriz Kuhn<sup>a</sup>; Arethusa Lobo Pimentel<sup>a</sup>; Fabio José Bianchi<sup>b</sup>;  
Larissa Renata de Oliveira-Bianchi<sup>a</sup>; Sônia Aparecida de Mello<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Paranaense, Paraná, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná e Universidade Paranaense, Paraná, Brasil.

\*Email: samello@unipar.br

Recebido: 07 de Fevereiro de 2011; Aceito: 01 de Agosto de 2011.

### Resumo

O etanol é uma molécula que se difunde facilmente pelas membranas celulares e no citosol leva a produção de compostos tóxicos que podem alterar as proteínas celulares e o DNA. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do etanol sobre os parâmetros corporais e a morfometria dos neurônios mientéricos do duodeno de ratos submetidos ao alcoolismo crônico. Foram utilizados 14 *Rattus norvegicus*, mantidos durante 16 semanas, divididos em dois grupos: Grupo controle (n=7), que recebeu ração padronizada e água *ad libitum*, e Grupo experimental (n=7), que recebeu a mesma ração e aguardente de cana em concentrações crescentes *ad libitum*. Ao final do período, os ratos foram anestesiados para a realização da laparotomia e retirada do duodeno, que foi submetido à realização de preparados de membrana e corados com Giemsa. Os dados foram submetidos ao teste estatístico t (Student) com nível de significância de 5%. Os animais alcoolizados apresentaram médias inferiores na ingesta líquida, sólida, crescimento e peso corporal, sendo que a diferença entre as médias foi significativa ( $p < 0,005$ ). Nos animais do GE a área do pericário foi 40,6% menor que o GC, do núcleo 70,5% menor no GE e do citosol 26% menor no GE, sendo a diferença estatisticamente significativa para as três regiões celulares observadas ( $p < 0,05$ ). Logo, o consumo crônico de etanol por 16 semanas interferiu na ingestão e ganho de peso dos animais e provocou redução na área do pericário, núcleo e citosol dos neurônios mientéricos do duodeno de ratos.

**Palavras-chave:** Etanol. Neurônios. Intestino Delgado.

### Abstract

*Ethanol is a molecule that diffuses easily through cellular membranes, and in cytosol leads to the production of toxic compounds that can alter cellular proteins and DNA. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of ethanol on body parameters and morphometry of duodenum myenteric neurons of rats submitted to chronic alcoholism. We used 14 Rattus norvegicus, which were kept for 16 weeks, divided into two groups: control group (n = 7), which received standard feed and water ad libitum, and experimental group (n = 7), which received the same feed and sugar cane brandy in increasing concentrations ad libitum. At the end of the period, the rats were anesthetized for the realization of laparotomy and duodenum removal, which was submitted to preparations of membrane and stained with Giemsa. The data were submitted to statistical test t (Student) with a significance level of 5%. The intoxicated animals showed lower average in liquid and solid intake, growth and body weight, and the difference between both groups average was significant ( $p < 0.005$ ). In animals of the EG, the area of pericardium was 40.6% lower than the CG, the nucleus was 70.5% lower in the EG, and cytosol was 26% lower in the EG. The difference is statistically significant for all the three cellular regions observed ( $p < 0.05$ ). Therefore, the chronic consumption of ethanol for 16 weeks interfered with intake and weight gain of animals, and caused a reduction in the area of perikarion, nucleus and cytosol of duodenum myenteric neurons in rats.*

**Keywords:** Ethanol. Neurons. Intestine, Small.

### 1 Introdução

O consumo excessivo de etanol tem se mostrado sério problema de saúde pública, não apenas no Brasil, mas no mundo. O etanol é tido como uma droga socialmente aceita, o que facilita a utilização dessa substância em diferentes estratos sociais<sup>1</sup>. No corpo humano o etanol alcança rapidamente a circulação sanguínea e os demais tecidos devido sua alta lipossolubilidade, sendo que não há limites para sua passagem pela barreira hematoencefálica, alcançando livremente o Sistema Nervoso, o que, mesmo em baixas doses, causa a diminuição da coordenação motora e dos reflexos<sup>2,3</sup>. O metabolismo do etanol pode resultar em doenças hepáticas induzidas pelo álcool, incluindo esteatose hepática, originando hepatite alcoólica e cirrose.

O principal produto tóxico do metabolismo do etanol inclui acetaldeído e radicais livres. O acetaldeído forma complexos com proteínas e outros compostos. O radical hidroxietila, produzido por meio do sistema microsossomal oxidante (MEOS), e outros radicais produzidos durante a inflamação causam alterações irreversíveis no fígado. Vários outros tecidos são afetados adversamente pelo etanol, pelo acetaldeído ou por alteração no metabolismo hepático e doenças. Polimorfismos genéticos em enzimas do metabolismo de etanol podem ser responsáveis por variações individuais de desenvolvimento de alcoolismo ou cirrose hepática<sup>4</sup>.

Ao ser ingerida a bebida alcoólica passa pelo sistema digestório, que é o primeiro local a sofrer a ação tóxica do etanol. Nos órgãos do trato gastrointestinal os efeitos do

álcool se manifestam de modo evidente, difundindo-se rapidamente através da mucosa<sup>5</sup>. No estômago, pode alterar o equilíbrio do suco gástrico interferindo na ação das enzimas; no intestino sua ação pode ser mais intensa, pois permanece mais tempo nesta região, onde é também absorvido. No entanto, os efeitos do consumo de etanol, sobre a mucosa intestinal são muito pouco conhecidos, sabe-se que a absorção do álcool acontece rapidamente no intestino, porém não há relatos sobre as alterações provocadas por essa substância na população neuronal mientérica e seus efeitos nas funções motoras desempenhadas pelo trato gastrointestinal.

Nas camadas muscular (entre a circular e a longitudinal) e submucosa do intestino encontram-se os gânglios contendo numerosos neurônios, que compõe o Sistema Nervoso Entérico (SNE)<sup>6</sup>. O SNE atua de maneira independente do sistema nervoso central, sendo considerado como segundo cérebro ou “cérebro intestinal”<sup>7</sup>. Os neurônios do sistema nervoso entérico são responsáveis pela motilidade intestinal, controle da secreção glandular e fluxo sanguíneo<sup>8</sup>. Os gânglios mientéricos estão presentes em todo o trato gastrointestinal, e o número total de neurônios entéricos é grande, tendo sido estimado que este número seja semelhante ao número de neurônios existentes na medula espinhal<sup>9</sup>, que somam cerca de 100 milhões de neurônios<sup>10</sup>.

Diferentes dietas podem promover mudanças no perfil neuronal nos gânglios mientéricos, alterando a área do pericário dos neurônios, influenciando na dinâmica dos neurônios do plexo mientérico e levando a alterações adaptativas do órgão. Estudos realizados com dieta hipoproteica e vitaminas do complexo B revelaram alterações na densidade neuronal mientérica<sup>11,12</sup>, no entanto, não são muito frequentes estudos correlacionando ingestão alcoólica e alterações no SNE.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do etanol sobre os parâmetros corporais e a morfometria dos neurônios mientéricos do duodeno de ratos.

## 2 Material e Métodos

Os procedimentos colocados em prática neste estudo estão de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da Universidade Paranaense (Protocolo nº 15244/2009). Foram utilizados 14 ratos adultos machos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar), com 90 dias de idade, que foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura constante e alternância de ciclos claro-escuro de 12 horas.

Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo controle (GC), formado por sete animais que durante 16 semanas receberam a ração para roedores comercializada pelo NUVITAL (recomendado pelo *National Research Council & National Institute of Health – USA*) e água *ad libitum*; Grupo experimental (GE), formado por sete animais que durante 16 semanas receberam a mesma ração para roedores e aguardente de cana a 30° *Gay Lussac* diluída (30° v/v) *ad libitum*. Para

indução do alcoolismo foram ministradas doses crescentes de etanol na escala de diluição: 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30%.

Estas diluições alcoólicas tiveram duração de 2 semanas, até a diluição de 30% ser alcançada. A administração gradativa de etanol tem como objetivo a adaptação dos animais ao modelo experimental denominado como semivoluntário, no qual o etanol é fornecido como único alimento líquido disponível para os animais para estabelecer o alcoolismo crônico.

Durante todo o experimento, uma vez por semana, foi quantificada a ingestão de aguardente de cana (ml) por animal do GE e de água nos animais do GC e aferido o peso (g) e comprimento focinho-ânus (cm) e ingestão de ração dos animais de ambos os grupos.

Após 120 dias os ratos foram submetidos a eutanásia por administração de Acepran (1,26 ml/Kg) + Xilazina-2% (0,42 ml/Kg) e Atropina-1% (0,22 ml/Kg) por injeção intramuscular na face medial da coxa<sup>13</sup>. Depois de verificada a ausência de dor, foi realizada a laparotomia para retirada do duodeno, considerando a porção a partir do piloro gástrico até a região onde se inicia o jejuno.

Amostras do duodeno de sete animais de cada grupo foram submetidas à microdissecação em microscópio estereoscópio para a obtenção de preparados totais de membrana, que foram corados de acordo com a técnica de Giemsa<sup>18</sup>. Posteriormente foram desidratados em série crescente de alcoóis e diafanizados em xilol para realizar a montagem entre lâmina e lamínula com Bálsamo do Canadá.

Para a análise morfométrica dos neurônios mientéricos foi utilizada a documentação fotográfica por meio do programa de captura de imagens Image Plus 2.0, com auxílio de microscópio de luz MOTIC com câmera acoplada em objetiva de 40X, capturando 75 imagens por animal, divididas em 25 imagens para cada região intermediária e antimesentérica (I-A-I) da circunferência intestinal. Foram mensurados o núcleo e pericário de 150 neurônios por região de cada animal no programa de análise de imagens Image Plus 2.0.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do Software STATISTICA, versão 7. A distribuição normal dos dados foi verificada com o teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) com nível de significância de 5%. Para análise da diferença entre os resultados foi aplicado o Teste t (Student) com nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média.

## 3 Resultados e Discussão

Em relação a ingestão líquida dos animais, observou-se que os animais experimentais ingeriram menos que os animais do grupo controle, diferença esta significativa ( $p=0,00002$ ).

Na ingesta sólida os animais do GE também consumiram significativamente menos ração que os animais do GC ( $p=0,0005$ ).

Verificamos que durante o período de estudo os animais do GC apresentaram crescimento corporal maior que os

animais do GE, sendo que esta diferença foi significativa estatisticamente ( $p=0,02$ ).

O GC apresentou ao final do tratamento  $494,55 \pm 15,5$ g de peso corporal, já o GE apresentou  $447,98 \pm 19,03$ g de peso corporal, isso representa uma diferença de 10,4% no peso dos animais do GC em relação ao GE ( $p=0,0004$ ).

A análise morfométrica mostrou que os animais alcoolizados apresentaram redução de 40,6% na área do pericário ( $p=0,0005$ ), 70,5% na área do núcleo ( $p=0,000002$ ) e 26% na área do citosol ( $p=0,00003$ ).

A má nutrição está intimamente relacionada a questão do alcoolismo, primeiramente porque o etanol substitui as calorias da dieta, dando falsa sensação de saciedade, o que diminui a ingestão de alimentos. No entanto, alguns autores consideram suas calorias como vazias por não serem acompanhadas de vitaminas e sais minerais, e parecem não ser aproveitadas para crescimento corporal, interferindo no desenvolvimento do organismo<sup>14</sup>. Neste estudo os animais submetidos a ingestão crônica de etanol apresentaram menor ingestão de ração, menor peso e comprimento corporal. A menor ingestão de alimento nos animais alcoolizados altera a farmacocinética do álcool, resultando em maior permanência do etanol no organismo o que significa maior exposição dos órgãos e toxicidade aumentada, interferindo no metabolismo normal dos órgãos expostos ao etanol, especialmente os do tubo digestório, que são os primeiros a ter células que recebem altas doses de etanol<sup>15</sup>. A má absorção de nutrientes interfere no ganho de peso dos animais, porém, devido ao seu alto teor energético não chega a causar estado de desnutrição, a sensação de saciedade causada pelo etanol, promove menor consumo de alimentos, e ainda interfere diretamente no metabolismo de macromoléculas essenciais, o que leva os alcoolistas a apresentar diminuição de sua massa corporal como resultado do déficit nutricional<sup>16</sup>.

O estado nutricional é determinado pelo suprimento de nutrientes e pela utilização destes pelo organismo<sup>17</sup>. Os quadros de má nutrição causados pelo alcoolismo podem interferir na saúde geral do indivíduo e favorecer a instalação e agravamento de diversas patologias<sup>18</sup>, resultando em prejuízo funcional levando a má absorção, má digestão e prejuízo aos processos de detoxicação. Sua ação tóxica direta provoca alterações hepáticas, insuficiência pancreática e deficiência de enzimas intestinais o que agrava o estado de má nutrição<sup>19</sup>.

Os resultados mostram que o etanol exerceu efeitos tóxicos sobre os neurônios mientéricos do duodeno de ratos alcoolizados, modificando o perfil destas células, com alterações na área de todas as regiões celulares (pericário, núcleo e citoplasma).

Estes resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos com ratos diabéticos<sup>20</sup> e com ratos desnutridos<sup>21</sup>. A ação lesiva do etanol pode estar relacionada à ação direta de seus metabólitos ou à absorção de endotoxinas do intestino, decorrente da redução da barreira intestinal induzida pelo etanol<sup>22</sup>.

O etanol é uma molécula que atravessa facilmente as membranas celulares, sendo degradado no citosol em acetaldeído, e este em acetato, que são compostos tóxicos para as células, especialmente quando há acúmulo destes no citoplasma, como ocorre nos casos de alcoolismo crônico<sup>23</sup>. O acetaldeído pode formar complexos com diferentes moléculas, especialmente com proteínas, o que pode alterar o metabolismo celular, comprometendo funções celulares vitais<sup>24,25</sup>.

Além de se combinar com proteínas, o acetaldeído é um metabólito capaz de provocar a quebra da dupla fita de DNA<sup>24</sup>, o que pode ter favorecido a redução significativa (70,5% sendo  $p=0,000002$ ) na área do núcleo dos neurônios mientéricos nos animais alcoolizados. O núcleo é o centro de controle das atividades metabólicas da célula<sup>26</sup>, e o tamanho do núcleo está diretamente relacionado ao metabolismo celular<sup>27</sup>.

Durante o consumo crônico do álcool, o transporte ativo de diversas substâncias é afetado, provavelmente devido à inibição de ATPase do epitélio intestinal, implicando possíveis prejuízos ao transporte ativo de nutrientes como a tiamina, glicose e aminoácidos<sup>28-30</sup>, o que pode ter contribuído para reduzir a área do citosol e conseqüentemente do pericário. Observações semelhantes foram feitas por outros pesquisadores na mesma condição experimental de alcoolismo crônico<sup>31,32</sup>.

À medida que o efeito tóxico do etanol e seus metabólitos agem provocando desnutrição, ocorre o comprometimento das funções de absorção de nutrientes<sup>19,33</sup>. Pode existir o déficit de micronutrientes, independente da redução da ingestão energética, pela simples adição de álcool à ingestão energética usual<sup>34</sup>. Com menor disponibilidade de nutrientes, os neurônios do GE não acompanharam a manutenção de área observada no GC. A ingestão de álcool afeta as membranas plasmáticas e organelas celulares devido a alterações no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas, predispondo os tecidos às injúrias<sup>35</sup>.

Estas alterações no metabolismo celular dos neurônios podem provocar a redução em diferentes regiões celulares, como também a redução no aporte e síntese de proteínas, além de alterações estruturais dos diversos órgãos que compõem o sistema digestório, podendo resultar em alterações do trânsito intestinal, constipação, inflamações e diarreia<sup>36,37</sup>.

Há estudos que relatam a existência de relação entre o tipo e o grau de deficiência nutricional e a severidade das alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais induzidas<sup>38</sup>. Permite-se sugerir que os neurônios do grupo alcoolizados sofreram um processo de readaptação, modulando seu metabolismo frente à exposição tóxica do etanol. Estudos mostram que cada região da circunferência intestinal pode responder de forma diferente a condição adversa imposta aos animais<sup>12</sup>, assim como cada região celular.

O fato de o duodeno ser a primeira região do intestino a receber o etanol, pode ter favorecido para que os efeitos tóxicos desta droga tenham sido bastante significativos na morfometria dos neurônios mientéricos desta região.

#### 4 Conclusão

O consumo crônico de aguardente de cana, fornecida a ratos adultos, durante 16 semanas, provocou a redução do pericário, núcleo e citosol de neurônios mientéricos na região do duodeno, comprovando o efeito tóxico do etanol na morfometria destas células nesta região intestinal.

#### Referências

- Meloni JN, Laranjeira R. Custo social e de saúde do consumo do álcool. Rev Bras Psiquiatr 2004;26(11):7-19.
- Andreo JC, Silva FB, Souza SMG, Santos NB. O efeito da dieta alcoólica sobre o desenvolvimento da glândula submandibular de *Rattus norvegicus* é definitivo? Cienc Odontol Bras 2006;9(2):89-95.
- Apfel MIR, Ésberard CA, Rodrigues FKP, Bahamad-Junior FM, Sillero RO. Estudo estereológico das células de Purkinge cerebelares submetidas à desintoxicação alcoólica em ratos *Wistar*. Arq Neuropsiquiatr 2002;60(2):258-63.
- Smith C. Bioquímica médica básica de Marks. Porto Alegre: Artmed; 2007.
- Bandeiras JA, Gaitan LA, Portilla J, Aguirre A. Effects of chronic ethanol consumption on the rat parotid gland. Arch Oral Biol 1992;37(1):69-72.
- Furlan MM. Ontogenia e filogenia do sistema nervoso entérico. Arq Ciênc Saúde Unipar 2000;4(2):149-57.
- Gershon MD. O Segundo cérebro. Rio de Janeiro: Campus; 2000.
- Hansen MB. The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. Farmacol Toxicol 2003;92:249-57.
- Safrey MJ. Ageing of the enteric nervous system. Mechan of Ageing Develop 2004;125(12):899-906.
- Gabella G. Inervation of the gastrointestinal tract. Rev Cytol 1979;59:129-91.
- Moreira, MM, Hermes C, Almeida CSL, Santana EC, Sant'Ana DMG, Araujo EJA. Quantitative analysis of the neurons from the myenteric plexus in the ileum of rats submitted to severe protein deficiency. Arq Neuropsiquiatr 2008;66(2):242-5.
- Sant'Ana DMG, Molinari SL, Araújo EJA, Miranda-Neto MH. The effect of both protein and vitamin B complex deficiency on the morphoquantitative features of the myenteric plexus of the ascending colon of adults rats. Arq Ciênc Vet Zool UNIPAR 2006;9(2):135-40.
- Pachaly JR, Sant'Ana DMG, Araujo EJA, Ciffoni EMG, Acco O. Anestesia of *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*) with allometrically scaled dose of Ketamine, Xylazine, Acepromazine and Atropine – preliminary report. Arq Ciênc Vet Zool UNIPAR 2003;6(2):195.
- Lieber, CS. The Metabolism of alcohol. Scientific American 1976;243:23-33.
- Silva VA. Ambiente e Desenvolvimento: efeitos do álcool etílico e da desnutrição. Mundo Vida 2000;2(1):1-27.
- Moreno-Otero R, Cortés JR. Nutrition and chronic alcohol abuse. Nut Hosp Madrid 2008;23(2):3-7.
- Zanin STM, Molinari SL, Sant'Ana DMG, Miranda Neto MH. Neurônios NADH-diaforase positivos do jejuno de ratos adultos (*Rattus norvegicus*) desnutridos: Aspectos Quantitativos. Arq Neuro-Psiquiatr 2003;3A(61):650-3.
- Fernandes EV, Goessler KF, Ramos SP, Altimari LR, Venancio EJ, Andrade FG. Efeitos da ingestão alcoólica crônica e do exercício físico na Massa corporal, no consumo alimentar e na ingestão líquida de ratos *Wistar*. Rev Educ Fis 2010;21(3):527-5.
- Lieber CS. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. J Hepatol 1991;32(1):113-28.
- Miranda-Neto MH, Defani MA, Fregonesi CE, Natali MRM, Pereira A. Morphometric and quantitative evaluation of the NADH-diaforase positive myenteric neurons of the jejunum of streptozotocin-diabetic rats supplemented with acetyl-L-carnitine. Anat Histol Embryol 2005;34(3):154-8.
- Natali MR, Molinari SL, Valentini LC, Miranda-Neto MH. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic ration. Biocell 2005;29(1):39-46.
- Gonçalves CS, Gomes MPZ, Gonçalves PL, Gonçalves LL, Pereira FEL. Hepatite alcoólica. J Bras Gastroenterol 2006;6:59-68.
- Carrard VC, Pires AS, Paiva RL, Chaves ACM, Sant'Ana Filho M. Alcool e câncer bucal: considerações sobre os mecanismos relacionados. Rev Bras Cancerol 2008;54(1):49-56.
- Bird RP, Draper HH, Badsur PK. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells. Production of micronuclei and chromosomal aberrations. Mutat Res 1982;101(3):237-46.
- Delarco VL. A mutagenicity assessment of acetaldehyde. Mutat Res 1988;195(1):1-20.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes Médicas; 2004.
- Andrade CGTJ, Jordão BQ. O núcleo da célula. In: Junqueira LC, Carneiro J. Biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- Morgan M. Alcohol and nutrition. Brit Med Bull 1982;38(1):21-9.
- Dinda PK, Beck IT. Effects of ethanol on cytoplasmic peptidases of the jejunal epithelial cell of the hamster. Dig Dis And Sci 1984;29:46-55.
- Bode C, Bode JC. Effect of alcohol consumption on the gut. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2003;17:575-92.
- Ratcliffe F. The effect of chronic ethanol administration on the growth of rats. Arch Int Pharmacodyn Ther 1972;197:19-30.
- Pereira MAS, Molinary SL, Souza FC, André OE, Miranda-Neto MH. Density and morphometry of myenteric neurons of the ileum of rats subjected to chronic alcoholism. Int J Morphol 2003;21(3):245-50.
- Maio R, Dichi JB, Burini RC. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes. Arq Gastroenterol 2000;37(2):120-4.
- Sarin SK, Dhingra N, Bansal A, Malhotra S, Guptan RC. Dietary and nutritional abnormalities in alcoholic liver disease: a comparison with chronic alcoholics without liver disease. Am J Gastroenterol 1997;92(5):777-83.
- Melo-Junior MR, Machado MCFP, Araujo-Filho JLS, Patu VJRM, Beltrão EIC, Pontes-Filho NT. Avaliação histoquímica da mucosa gastrointestinal de ratos expostos ao álcool. Rev Para Med 2006;20(4):7-12.
- Waterlow JC. Malnutrición proteico-energética. Washington: OPS; 1996.
- Souza APO, Araújo EJA. Alterações morfológicas do duodeno causadas pela desnutrição protéico-energética. Arq Ciênc Saúde Unipar 2004;8(Supl.1):38.
- Viteri FE, Schneider MD. Gastrointestinal alterations in protein-calorie malnutrition. Sym Gastr Phys 1974;58(6):1487-505.