

Índice acrosómico en hombres jóvenes con mala calidad seminal

Elia Roldán Reyes^{1,2,3} y Claudia Jessica Castillo Villanueva^{1,3}

Citogenética y Mutagénesis UMIEZ-CII¹, Investigación y Posgrado², Carrera de Biología³,

FES-Zaragoza,

Universidad Nacional Autónoma de México

CdMx, México.

eliar@unam.mx, 415jessicacv@gmail.com

Abstract— The Acrosomic Index indicates the percentage of sperm with morphologically normal acrosomes in a semen sample, it is considered evidence of the functional capacity of the sperm, it was evaluated in individuals with density problems, establishing an adequate staining method and determining the relationship between Acrosomic Index and poor semen quality. Samples with polyspermia and oligospermia were evaluated, which were compared with normozoospermic samples. The Acrosomic Index decreased in comparison with the normozoospermic samples, the relationship between density and Acrosomic Index was established, using Pearson's coefficient (r), a positive correlation was observed, which shows the importance of this parameter in the seminal evaluation, due to its importance to guide studies, that determine the cause of failed fertilization.

Keyword— *Acrosome, normozoospermia, oligospermia, polyspermia, teratozoospermia, sperm density.*

Resumen— El Índice Acrosómico indica el porcentaje de espermatozoides con acrosomas morfológicamente normales en una muestra de semen, se considerarse evidencia de la capacidad funcional de los espermatozoides. Se evaluó en individuos con problemas de densidad, estableciendo un método de tinción adecuado y determinando la relación entre el Índice Acrosómico y mala calidad seminal. Se evaluaron muestras con polispermia y oligospermia, que fueron comparadas con muestras normozoospermicas. El Indice Acrosómico disminuyó en comparación con las muestras normozoospermicas y se estableció la relación entre densidad y el Indie Acrosómico, mediante coeficiente de Pearson (r), se observó correlación positiva, que muestra la importancia de este parámetro en la evaluación seminal, por su trascendencia para reforzar estudios que determinen la causa de fecundación fallida.

Palabras claves— Acrosoma, densidad espermática, normozoospermia, oligospermia, polispermia, teratozoospermia.

I. INTRODUCCIÓN

El factor masculino contribuye a la infertilidad de la pareja en el 50% de las ocasiones, observando una alteración cuantitativa o cualitativa de uno o más valores seminales; infertilidad se define como la incapacidad de lograr un embarazo espontáneo después de un año de relaciones sexuales sin el uso de métodos anticonceptivos [1].

La densidad espermática es el número de espermatozoides contenidos en un mililitro de semen. Una densidad menor o mayor de lo normal (< 15 millones de espermatozoides por ml, > 200 millones) puede indicar problemas de fertilidad; por lo tanto, es un parámetro fundamental en el Espermiograma [2]. La oligospermia, afecta a la cantidad de espermatozoides en el eyaculado, encontrándose en menor número [1]. Disminuyendo la probabilidad de que éstos consigan atravesar todas las barreras, lleguen al óvulo y fecunden [2].

La polispermia se presenta en individuos con una densidad mayor a 200 millones de espermatozoides por ml, tiene como consecuencia la penetración de más de un espermatozoide dentro del óvulo [2]. Si se produce la fusión de más de un espermatozoide se genera la formación de husos mitóticos multipolares,

ocasionando la segregación defectuosa de los cromosomas durante la división celular; se forman células no diploides resultando en muerte embrionaria temprana y aborto espontáneo [3].

El acrosoma es un orgáñulo membranoso de doble capa ubicado en la parte apical de la cabeza espermática, contiene enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina, cuya función es degradar la zona pelúcida del óvulo [4]. El índice acrosómico (IA) por lo tanto es una indicación del porcentaje de espermatozoides con acrosomas morfológicamente normales presentes en una muestra de semen y se considera un precedente de la capacidad funcional de los espermatozoides. Su incorporación en el proceso de evaluación morfológica de los espermatozoides es, por lo tanto, una herramienta importante en la predicción del resultado de fertilización [5]. Los objetivos fueron, establecer el método de tinción adecuado para evaluar la morfología del acrosoma, cuantificar el Índice Acrosómico en individuos jóvenes con problemas de densidad espermática (polispermia y oligospermia) y, establecer la relación con la calidad seminal.

II. MATERIAL Y MÉTODO

A. Obtención de las muestras

Las muestras fueron obtenidas de individuos voluntarios en edades comprendidas entre 18 y 30 años que se encontraban clínicamente sanos (contestaron un cuestionario relacionado con su estado de salud general y reproductiva). La muestra se obtuvo por auto masturbación en un contenedor estéril de un solo uso, luego de un periodo de abstinencia sexual de 3 a 5 días, como mínimo.

B. Evaluación de la calidad seminal

Los espermiogramas fueron realizados en el Laboratorio de *Citogenética y Mutagenesis* de la UMIEZ en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza C-II, donde se evaluó: color, volumen, pH, viscosidad, densidad, morfología y viabilidad espermática, bajo los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud [2].

C. Criterios de inclusión

Si la densidad espermática comprendía entre 70 y 100 millones de espermatozoides por ml se incluían en el grupo control; si esta era mayor a 200 millones por ml se consideraba como polyspermia y, cuando era menor a 5 millones por ml, se consideró como oligospermia, según los criterios del manual de la OMS [2]. Se utilizaron 15 muestras normozoospermicas como control, 13 con polyspermia y 7 con oligospermia para la evaluación del Índice Acrosómico (IA) del presente estudio.

III. MÉTODOS DE TINCIÓN

A. Frotis

Para realizar los frotis descritos en los siguientes métodos se tomó en consideración lo siguiente; para muestras seminales con concentraciones mayores a 30 millones por ml se tomaron 10 microlitros de muestra y para concentraciones menores a 30 millones se tomaron 20 microlitros de muestra.

B. Eosina

Se colocaron 2 gotas de eosina 1% (V/V) en tubos eppendorff que contenían 10 microlitros de muestra seminal, se resuspendió la muestra y se dejó reposar para posteriormente realizar un frotis y evaluar en el microscopio Nikon E200 (Japón) a 100x en campo claro.

C. Eosina-Nigrosina

Se tomaron 10 microlitros de la muestra seminal y se agregaron 10 microlitros de eosina 1% (V/V), se resuspendió y se dejó reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 10 microlitros de nigrosina 1% (V/V), se resuspendió nuevamente y se dejó reposar por 2 minutos. Finalmente se realizó un frotis, se dejó secar a temperatura ambiente y se observó en el microscopio Nikon E200 (Japón) en campo claro a 100x.

D. Esperma-form®

Se realizó un frotis, que se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se introdujo en un fijador por 3 minutos, se dejó secar a temperatura ambiente y se introdujo el frotis en el colorante A por 3 minutos este se enjuago con agua destilada y finalmente el frotis fue introducido en el colorante B por 5 minutos, se enjuago con agua destilada, se secó a temperatura ambiente y se observó en el microscopio Nikon E200 (Japón) en campo claro a 100x.

IV. CRITERIOS DE EVALUACIÓN DEL ACROSOMA

Se contaron 200 espermatozoides por duplicado, en cada individuo, se cuantificaron los acrosomas morfológicamente intactos y anormales para posteriormente calcular el IA.

Puede tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

Acrosoma normal: El mismo criterio para una cabeza de esperma normal, con respecto al acrosoma, es decir, que sea claramente visible y bien definido con una configuración ovalada lisa y que comprenda del 40% al 70% de la cabeza del espermatozoide, para clasificar el acrosoma como normal.

Defectos de tinción: La tinción irregular o la presencia de tres o más vacuolas se consideró como un defecto de tinción. Además, la unión ecuatorial tenía que formar una línea clara regular a través de la cabeza del espermatozoide.

Demasiado pequeño: En los casos en que el acrosoma cubra menos de 40% de la parte anterior de una cabeza normal, se considera demasiado pequeño.

Demasiado grande: En los casos en que el acrosoma cubra más de 70% de la cabeza del espermatozoide.

Amorfo: Todas las demás anormalidades en cuanto a que su estructura difiere de una configuración ovalada lisa se clasificaron como amorfos.

Se calculó el índice acrosómico (IA) utilizando la siguiente fórmula [10]:

$$IA = \frac{\text{Espermatozoides con acrosomas normales}}{\text{Número total de espermatozoides evaluados}} \times 100 \quad (1)$$

V. ANÁLISIS ESTADISTICO

Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar. Se realizó una prueba estadística de Z para proporciones como análisis estadístico para evaluar diferencias significativas entre el índice acrosómico de las muestras con oligospermia y polispermia con respecto a las del grupo control, de igual manera se realizó una prueba de t de Student para evidenciar diferencias significativas de las medias obtenidas de los grupos ya mencionados con respecto al grupo control. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) para determinar el grado de correlación entre IA y mala calidad seminal. El nivel de significancia aceptado fue de $p<0.05$.

VI. RESULTADOS

Las tinciones realizadas se muestran en las figuras 1, 2 y 3; se estableció que la tinción adecuada para llevar a cabo la evaluación de los IA es la tinción con Esperma-form®.

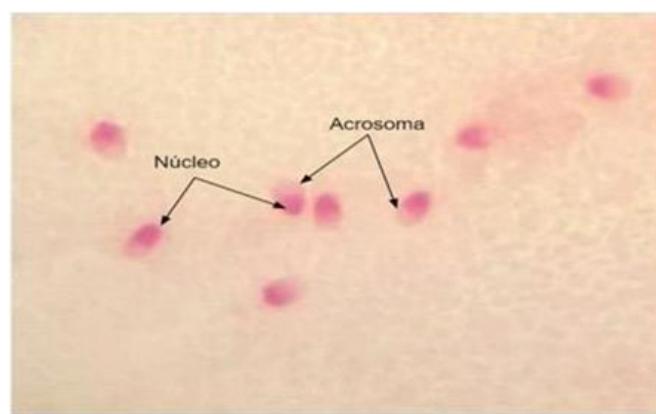


Fig. 1. Espermatozoides teñidos con Eosina, 100X campo claro, Citogenética y Mutagénesis UMIEZ CII, FESZ-UNAM.

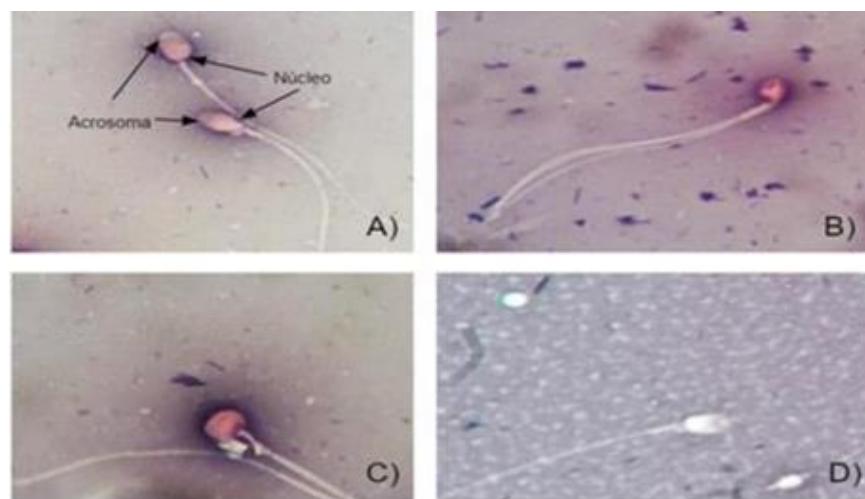


Fig. 2. Espermatozoides teñidos con Eosina-Nigrosina. A) con acrosomas morfológicamente normales. B) con tres flagelos y acrosoma morfológicamente pequeño. C) sin acrosoma. D) con defecto de tinción, 100X campo claro, Citogenética y Mutagénesis UMIEZ C-II, FESZ-UNAM.

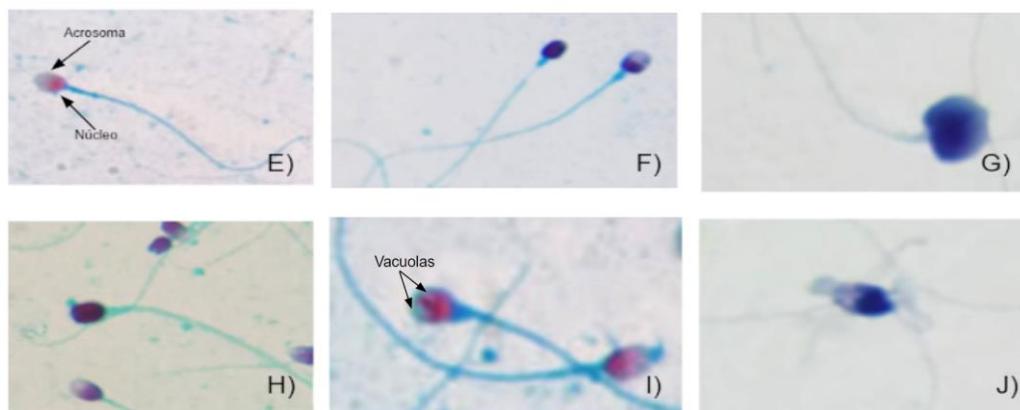


Fig. 3. Espermatozoides teñidos con Esperma-form®. E) con acrosoma morfológicamente normal. F) con acrosoma ausente y con acrosoma normal. G) con acrosoma morfológicamente pequeño. H) acrosoma ausente y acrosoma normal. I) defecto en tinción y J) con acrosoma amorfó. 100X campo claro, Citogenética y Mutagénesis UMIEZ CII, FESZ-UNAM.

Los resultados obtenidos de los IA del grupo con oligospermia y polispermia para probar si existían diferencias atribuibles a la densidad espermática con respecto a las muestras normozoospermicas se muestran en la Tabla 1 como media ± desviación estándar.

La prueba estadística Z para proporciones ($p<0.05$) evidenció una disminución significativa entre el IA para los grupos que presentan problemas en densidad con respecto al grupo control. De igual manera, la prueba de t de Student mostró disminuciones significativas en las medias de los grupos con problemas de densidad con respecto al grupo control (Tabla II).

La Correlación de Pearson mostró una relación positiva entre IA y la mala calidad seminal de los individuos con polispermia y oligospermia (Tabla I).

Tabla I. Análisis de correlación entre la densidad espermática y el IA.

Densidad	r	Correlación	Magnitud
Normozoospermia	0.01	Positiva	Débil
Oligospermia	0.52	Positiva	Moderada
Polispermia	0.38	Positiva	Moderada

Tabla II. Índice acrosómico de hombres jóvenes con problemas de densidad.

Normozoospermia		Polispermia		Oligospermia	
Muestra código	IA %	Muestra código	IA %	Muestra código	IA %
NL-332	73.00	NN-321	58.00	NN-19	51.00
NL-328	81.00	NN-140	71.75	NN-30	49.00
NL-329	74.00	NN-123	67.50	NN-324	52.00
NL-330	71.75	NN-300	62.00	NN-67	41.50
NL-331	76.25	NN-247	66.75	NN-44	64.75
NL-319	78.75	NN-298	74.25	NN-338	63.00
NL-315	78.00	NN-240	71.25	NN-342	67.00
NL-316	71.00	NN-18	63.00		--
NL-313	85.25	NN-211	68.25		--
NL-333	84.00	NN-216	66.00		--
NL-325	90.25	NN-261	64.75		--
NL-320	75.25	NN-13	65.25		--
NL-317	87.25	NN-341	74.00		--
NL-334	62.758		--		--
NL-335	79.25		--		--
$X = 77.65 \pm 7.22$		$X = 67.13 \pm 4.78^*$		$X = 55.46 \pm 9.52^*$	
$r = 0.01$		$r = 0.38$		$r = 0.52$	
$N = 15$		$N = 13$		$N = 7$	

NL Donadores estándares o NormaLes; **NN** donadores no estándares, Z para proporciones, t de Student, (r) Correlación de Pearson, * $p < 0.05$ ($X =$ media \pm desviación estandar).

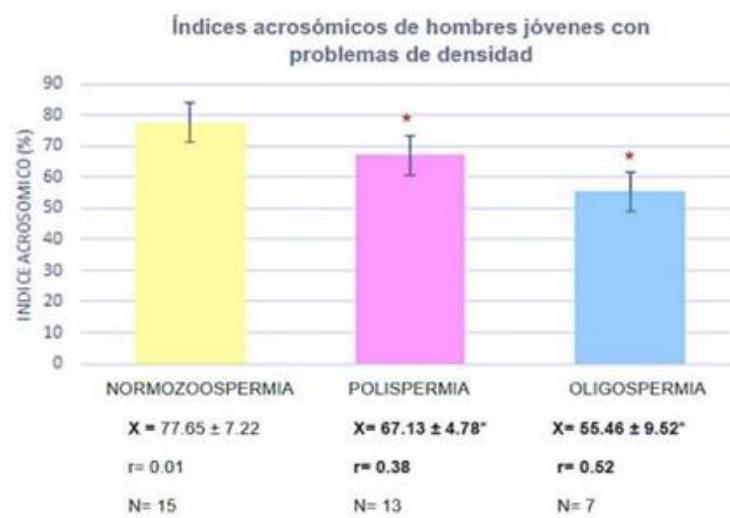


Fig. 4. Índice Acrosómico de individuo normozoospermicos, polispérmicos y oligospérmicos. Z para proporciones, t de Student y Correlación de Pearson, (* $p < 0.05$).

VII. DISCUSIÓN

La tinción realizada con eosina no permitió la visualización de los flagelos lo cual dificultó la evaluación morfológica del espermatozoide por lo que se consideró una tinción inadecuada para nuestro objetivo (Fig. 1). La tinción eosina-nigrosina proporcionó una mejor visualización morfológica de los espermatozoides, sin embargo, en ocasiones el contraste entre el acrosoma y el núcleo no era visiblemente claro lo que podía conducir a errores al momento de evaluar el IA (Fig. 2).

Finalmente, la tinción Esperma-form® definió de manera precisa la zona ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, lo que permite evaluar de manera exacta la morfología del acrosoma, por lo que fue la tinción que se utilizó para la evaluación de los índices en la presente investigación (Fig. 3).

Las pruebas estadísticas de Z para proporciones y t de Student mostraron disminuciones significativas en los IA para los grupos con problemas de densidad con respecto al grupo control, siendo que los individuos con oligospermia presentaron los IA más bajos.

Se observó además que las muestras con polispermia presentaban en su mayoría acrosomas alargados que ocupaban más del 70% de espacio de la cabeza del espermatozoide, De la Paz et al. [6] demostraron que la presencia de espermatozoides con acrosomas alargados se asocian con infertilidad e incluso se obtienen pobres resultados cuando tales espermatozoides son utilizados en procedimientos de fertilización in vitro; en otro estudio realizado por Dirican et al. [7] se reportó que la deficiencia del gen AURKC genera infertilidad debido a la producción de espermatozoides con cabeza grande que poseían acrosomas muy alargados, condición a la que también se le denomina globozoospermia.

AURKC es un gen ubicado en el cromosoma 19 que proporciona instrucciones para producir una proteína llamada aurora quinasa C, abundante en los testículos, donde se regula la producción de espermatozoides, asegurando que cada uno de ellos contenga una copia de cada cromosoma [8].

Por otra parte, en las muestras con oligospermia se observó numerosos de espermatozoides con cabezas pequeñas y redondas que usualmente presentan acrosomas muy pequeños o ausentes, lo cual se asocia con su incapacidad para penetrar la zona pelúcida del ovocito debido a la ausencia de acrosina [6].

Koscinski et al. [9], analizaron tres individuos con globozoospermia, encontró que portaban una mutación homocigótica de SPATA16 y por consecuencia IA menores al 10%, debido a que la expresión testicular de SPATA16 es necesaria para la formación del acrosoma, por lo que genera malformaciones del acrosoma, donde en la mayoría de los casos graves, esta ausente [10].

Radu et al. [11], realizaron otro estudio en cinco individuos con globozoospermia, cuatro de estos individuos tenían una delección homocigótica de 200 kb en el cromosoma 12 que abarca al gen DPY19L2 que codifica para una proteína que se encuentra en el desarrollo de las células espermáticas, que participa en la unión del acrosoma formado a la membrana nuclear; por lo que se asocia con un correcto desarrollo de la morfología acrosómica [12].

En el presente trabajo se evidenció la presencia de variadas anomalías morfológicas acrosómicas que afectan de forma significativa a los individuos con problemas en densidad, afectando principalmente a los individuos con oligospermia. Aunque la muestra es pequeña, los resultados indican que el IA no solo se ve alterado en individuos con problemas de morfología o teratozoospermia, sino que también está influenciado por otras alteraciones seminales como la densidad, posiblemente por causas ambientales o infecciosas, de igual manera los defectos genéticos están frecuentemente involucrados en este tipo de alteraciones.

También es importante mencionar que una parte de los individuos que presentaban alteraciones en su densidad tenían como hábito el consumo de tabaco y bebidas alcohólicas; se ha observado que estos

factores asociados con el estilo de vida afectan la calidad fecundante [13]. Algunos investigadores como Martini en 2004 [14] han notificado que el consumo de tabaco tiene efectos adversos sobre la densidad y morfología de los espermatozoides.

Se ha reportado en estudios elaborados por Makar et al. [15] que del total de las alteraciones que se presentan en la calidad seminal, la Teratozoospermia es la más frecuente representando el 92% de los pacientes, seguida por la oligozoospermia que representa al 34% de la población afectada. Cabe mencionar que en el 33% se manifiestan dos o más alteraciones, y de este porcentaje, el 10% de los casos presentan oligoteratozoospermia, donde se ve alterada la densidad y morfología.

Además, se ha reportado que a partir de los 30 años se evidencia el deterioro gradual de los valores seminales, disminuyendo la calidad fecundante del varón. Sin embargo, en este trabajo los hombres diagnosticados con oligospermia/polispermia fueron hombres jóvenes, en los que se observó un claro descenso en el IA posiblemente esto debido a que, en la actualidad, el estilo de vida, el medio ambiente, etc., son factores que han influido en la capacidad fecundante.

Como es el caso reportado por Rubes et al. [16], donde muestran cómo una población joven (18 años) de varones con hábitos de fumar, se ve mayormente afectada en parámetros como la densidad y morfología, así como la presencia de una tasa mayor de aneuploidías en espermazas, en comparación con un grupo de la misma edad, sin el hábito de fumar.

Los índices mencionados en el presente estudio si mostraron una disminución significativa con respecto al control, sin embargo, estos no fueron lo suficientemente bajos, ya que estudios realizados por Menkveld [5] determina que el índice acrosómico necesario para poder lograr un embarazo es del 5%. No obstante, es importante su evaluación en individuos con problemas de densidad, ya que es trascendental contar con una concentración adecuada de espermatozoides que sean morfológicamente normales para poder ser considerados como individuos fértiles, por lo que la morfología del acrosoma ha ganado mayor importancia en los parámetros seminales convencionales, ya que forman parte y, son esenciales para considerar a un espermatozoide como normoformo.

Por lo tanto, el índice acrosómico es una herramienta importante en la predicción del resultado de fertilización, no únicamente en casos de teratozoospermia grave, sino también en casos donde se presenten problemas de densidad, ya que se corrobora que es una condición que está relacionada con índice acrosómico bajo.

Sin embargo, aún falta profundizar e investigar otros factores, que complementar el entendimiento del IA, importante en el diagnóstico de Infertilidad, problema de salud que se ha incrementado en la actualidad.

VIII. CONCLUSIONES

El Índice Acrosómico se evaluó de una manera exhaustiva mediante la técnica de tinción Espermaform®, siendo ésta la que proporciona una mejor imagen del acrosoma.

El Índice Acrosómico en hombres con oligospermia y polispermia, disminuyó significativamente en comparación con los del grupo control.

Existe una estrecha relación, (correlación positiva) entre el Índice Acrosómico y la densidad espermática ($r=0.38$ y 0.52), siendo significativa para la condición oligospermica.

Con base en los resultados, se recomienda tomar en cuenta el Índice Acrosómico en estudios de fertilidad.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a PAPIIT-UNAM Clave IN221919-3, el financiamiento otorgado al presente trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Rosas Rafaela. (2007). Infertilidad Masculina. Offarm, 26(7):70-75. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13108305> <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13108305>
- [2] World Health Organization. (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and the Interaction between Semen and Cervical Mucus, 4th ed. Panamerican Medical Publishing House. Madrid (España).
- [3] Gardner, A.J. y Evans, J.P. (2006). Mammalian membrane block to polispermia: new insights into how mammalian eggs prevent fertilization by multiple sperm. Reproduction, Fertility and Development, 18:53-61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16478602/>
- [4] Ramalho-Santos J, Schatten G, Moreno RD. (2002). Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. Biology of Reproduction, 67:1043-1051. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/67/4/1043/2683272>
- [5] Menkveld R. (2010). Importancia clínica del bajo valor normal de la morfología espermática según lo propuesto en la quinta edición del Manual de Laboratorio de la OMS para el Examen y Procesamiento de Semen Humano. Revista asiática de andrología 12(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3739680/>
- [6] De la Paz T., López Pérez I., García Gutiérrez R., Pérez Pérez de Prado N., Menéndez Hernández E.M. y Sánchez Freire. (2016). Identificación de subpoblaciones, según la morfometría de la cabeza espermática, en hombres con Espermiograma normal. Medicentro Electrónica; 20(4). Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/mdc/v20n4/mdc05416.pdf>
- [7] Dirican E.K., Isik A., Vicedan K., Sozen E. y Suludere Z. (2008). Embarazos clínicos y nacimientos vivos logrados por inyección intracitoplasmática de espermatozoides acrosómicos sin cabeza redonda con y sin activación de ovocitos en globozoospermia familiar: reporte de caso. Revista asiatica de andrologia; 10(2). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-7262.2008.00248.x>
- [8] Dietrich, M. A., Dietrich, G. J., Mostek, A. y Ciereszko, A. (2007). Motility of carp spermatozoa is associated with profound changes in the sperm proteome. Journal of Proteomics; 138:124-135. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26926441/>
- [9] Koscienski I, Ellinati E, Fossard C, Redin C, Muller J. y Velez de la Calle J. (2011). Deletion of DPY19L2 como causa principal de globozoospermia. The American Journal of Human Genetics; 88(344). Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii>
- [10] Menkveld, R., Rhemrev, J. P., Franken, D. R., Vermeiden, J. P., y Kruger, T. F. (1996). Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosina activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. Fertility and sterility; 65(3):637-644. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8774300/>
- [11] Radu H, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, et al. (2011). A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. Am J Hum Genet.; 88(3):351-361. Available from: <https://europepmc.org/article/med/21397064#free-full-text>

- [12] Coutton C, Abada F, Karaouzene T, Sanlaville D, Satre V, Lunardi J, et al. (2013). Fine characterization of a recombination hotspot at the DPY19L2 locus and resolution of the paradoxical excess of duplications over deletions in the general population. *PLoS Genet.*; 9(3):16-29. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1003363>
- [13] Tapia, SR. (2012). Una visión actual de la infertilidad masculina. *Rev Mex Reprod*; 4(3): 103-109. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/reproduccion/mr-2012/mr123b.pdf>
- [14] Martini AC. (2004). Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertil Steril.*; 82(2):374-377. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15302286/>
- [15] Makar, S. y Toth, TL. (2002). The evaluation of Infertility. *Am J Clin Pathol.*; 34(3):95-103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14569805/>
- [16] Rubes, J., Lowe, X., Moore, D., Perreault, S., Slott, V. (1998). Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertility and Sterility.*; 70(4):715-723. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9797104/G>.