



Título del artículo.

**Efecto del resveratrol en la fosforilación de AMPK en isquemia cerebral.**

Título del artículo en idioma Inglés.

**Effect of resveratrol on AMPK phosphorylation in cerebral ischemia.**

Autores.

Narayana Pineda Ramírez  
Alma Ortíz Plata  
Penélope Aguilera  
Mónica Espinoza Rojo.

Referencia bibliográfica:

MLA

Pineda Ramírez, Narayana, Alma Ortíz Plata, Penélope Aguilera y Mónica Espinoza Rojo. "Efecto del resveratrol en la fosforilación de AMPK en isquemia cerebral". *Tlamati* 7.3 (2016): 11-15. Print.

APA

Pineda Ramírez, N., Ortíz Plata, A., Aguilera P. y Espinoza Rojo, M. (2016). Efecto del resveratrol en la fosforilación de AMPK en isquemia cerebral. *Tlamati*, 7(3), 11-15.

---

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Diciembre del 2016

© 2016 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

*TLAMATI*, es una publicación trimestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



## Efecto del resveratrol en la fosforilación de AMPK en isquemia cerebral

Narayana Pineda Ramírez<sup>1,2</sup>  
 Alma Ortíz Plata<sup>3</sup>  
 Penélope Aguilera<sup>2</sup>  
 Mónica Espinoza Rojo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Guerrero. Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Av. Lázaro Cárdenas s/n. Col. La Haciendita, Chilpancingo, Guerrero, México. C. P. 39087. Tel: +52 (747) 122 3974

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Laboratorio de Neuropatología Experimental

\*Autor de correspondencia  
 moniespinoza@yahoo.com

### Resumen

La isquemia cerebral resulta de la oclusión de una arteria cerebral importante. La disminución del flujo sanguíneo cerebral restringe el suministro de oxígeno y glucosa disminuyendo el metabolismo energético de la célula. La pérdida neuronal puede prevenirse al modular la función mitocondrial y el estado energético celular. El resveratrol [RSV] aumenta la función mitocondrial a través de mecanismos estrechamente asociados con el metabolismo de la glucosa y la activación de vías de generación de ATP, en las que está involucrada la cinasa activada por AMP (AMPK). En modelos *in vivo* se ha observado que el RSV previene el daño mitocondrial. Evaluamos si el tratamiento con RSV regula la fosforilación de AMPK en isquemia cerebral. Ratas macho Wistar (250 a 350 gr.), fueron sometidas a oclusión de la arteria cerebral media (OACM) durante 2 horas. Una dosis de RSV (1mg/kg; i.v.) diluido en etanol al 50%, se administró al inicio de la reperfusión [R]. Las ratas se sacrificaron a diferentes tiempos de R (0, 15, 30, 60 y 120 minutos). Los niveles de AMPK total y pAMPK fueron evaluados por Western Blot en corteza frontoparietal. La R provocó un aumento en los niveles de pAMPK después de 15 min y alcanzó un nivel máximo a los 120 min. El RSV aumentó los niveles de pAMPK en los grupos sometidos a MCAO con y sin R. En el grupo tratado con RSV se observó un incremento máximo a los 60 min de R y se mantuvo hasta los 120 min. El RSV reduce el daño neuronal inducido por la isquemia y su mecanismo de acción podría estar asociado a la activación de la AMPK, es posible que en nuestro modelo el RSV este activando un mecanismo similar que favorezca la supervivencia neuronal.

**Palabras clave:** isquemia cerebral, resveratrol, AMPK

### Abstract

Cerebral ischemia results from occlusion of an important cerebral artery. Decreased cerebral blood flow restricts the supply of oxygen and glucose by lowering the energetic metabolism of the cell. Neuronal loss can be prevented by modulating mitochondrial function and cellular energy status. Resveratrol [RSV] enhances mitochondrial function through mechanisms closely associated with glucose metabolism and the activation of ATP generation pathways, in which AMP-activated kinase (AMPK) is involved. In *in vivo* models it has been observed that RSV prevents mitochondrial damage. We evaluated whether RSV treatment regulates AMPK phosphorylation in cerebral ischemia. Male

### Como citar el artículo:

Pineda Ramírez, N., Ortíz Plata, A., Aguilera P. y Espinoza Rojo, M. (2016). Efecto del resveratrol en la fosforilación de AMPK en isquemia cerebral. *Tlamati*, 7(3), 11-15.

Wistar rats (250 to 350 g) were subjected to occlusion of the middle cerebral artery (CCAM) for 2 hours. A dose of RSV (1mg / kg; i.v.) diluted in 50% ethanol was given at the start of reperfusion [R]. Rats were sacrificed at different R times (0, 15, 30, 60 and 120 minutes). Total AMPK and pAMPK levels were evaluated by Western Blot in fronto-environmental crust. The R caused an increase in pAMPK levels after 15 min and peaked at 120 min. RSV increased pAMPK levels in the MCAO groups with and without R. In the group treated with RSV a maximal increase was observed at 60 min of R and maintained until 120 min. RSV reduces neuronal damage induced by ischemia and its mechanism of action may be associated with the activation of AMPK, it is possible that in our model the RSV is activating a similar mechanism that favors neuronal survival.

**Keywords:** cerebral ischemia, resveratrol, AMPK

## Introducción

La isquemia cerebral [IC] resulta de la reducción del flujo sanguíneo cerebral [FSC], por un trombo en una arteria cerebral importante. Para recuperar la función neuronal, es determinante un rápido retorno del FSC o reperfundión, paradójicamente, su restablecimiento tiene consecuencias que terminan agravando la lesión cerebral (Dirnagl, Ladecola y Moskowitz, 1999). Este proceso de isquemia/reperfundión [I/R], desencadena una secuencia de fenómenos moleculares que pueden inducir la muerte celular por diversos mecanismos, entre ellos la falla energética asociada a la disminución de la producción de ATP [Adenosín trifosfato] (Dirnagl et al., 1999; Rovigno, Soto, Sáez y von Bernhardt, 2012). Durante la isquemia se obstaculiza la función mitocondrial, provocando un déficit en los niveles energéticos de la célula y un incremento en la producción de radicales libres (Nicholls y Ward, 2000). La proteína quinasa activada por AMP [AMPK] es una enzima que regula algunos procesos metabólicos durante condiciones energéticas anormales, se activa alostericamente por AMP, sin embargo necesita ser fosforilada para su completa activación, una vez activada inhibe vías que consumen energía y activa vías que producen ATP (Li y McCullough., 2010; Hardie, 2011). En neuronas, incrementa la producción de lactato como fuente alterna de energía (Li y McCullough., 2010). Además, facilita la translocación del transportador GLUT-3 a la membrana plasmática, incrementando la captación de glucosa y su metabolismo, lo que resulta en un incremento en la producción de ATP (Kuramoto, Wilkins, Fairfax, Revilla-Sanchez, Terunuma, Tamaki, Iemata, Warren, et al., 2007; Weisová, Concannon, Devocelle, Prehn y Ward, 2009). Se ha observado que la activación de AMPK con 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleosido [AICAR] incrementa la supervivencia en un cultivo de neuronas de hipocampo sometidos a insultos metabólicos y excitotóxicos y disminuye la muerte celular en ratas con isquemia cerebral global (Culmsee, Monnig, Kemp y Mattson, 2001). Así mismo, la inhibición de AMPK por el compuesto C, reduce la viabilidad de cultivo primario de neuronas corticales en condiciones fisiológicas de oxígeno y glucosa (Culmsee et al., 2001).

Por otro lado, antioxidantes como el resveratrol, reducen parcialmente el daño neuronal inducido por la IC y la reperfundión [R] (Baur y Sinclair., 2006). Se ha reportado que dosis moderadas de RSV activan a AMPK y estimulan la función mitocondrial tanto *in vivo* como *in vitro*, incrementa la activación de AMPK de la misma manera que lo hace AICAR e induce la biogénesis mitocondrial activando la proteína LKB1. Estos resultados sugieren que la activa-

ción neuronal de AMPK influye en la homeostasis energética y contribuye al efecto neuroprotector del resveratrol (Dasgupta y Milbrand, 2007; Hardie, 2011; Price, Gomes, Ling, Duarte, Martin-Montalvo, North, Agarwal, et al., 2012). Por lo tanto, en el presente trabajo se decidió evaluar si el resveratrol regula la fosforilación de AMPK en ratas sometidas a isquemia cerebral transitoria.

## Materiales y métodos

### *Animales de Laboratorio.*

Se utilizaron ratas machos Wistar (280-350 gr.) proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Los animales fueron colocados en jaulas de acrílico con libre acceso a agua y alimento. Durante el estudio las ratas fueron mantenidas bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (12 horas luz/oscuridad). Todos los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo a las reglas de uso y manejo de animales establecido por la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y a los principios éticos para las investigaciones médicas descritos por Helsinki y sus enmiendas (Asociación Médica Mundial).

### *Diseño experimental para el modelo in vivo de Isquemia cerebral.*

Los animales fueron divididos aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales (n= 4), Sham (Sh), control [CT], control con resveratrol [RSV], control con vehículo [Vh], isquemia/ reperfundión [I/R], I/R+RSV e I/R+Vh. Y para cada análisis se usaron grupos independientes. Las ratas fueron sometidas a IC, mediante oclusión de la arteria cerebral media [MCAO] durante 2 h, posteriormente se realizó R y fueron sacrificadas a diferentes tiempos (0, 15, 30,60 y 120 min). Las ratas fueron decapitadas y se diseccionó el cerebro para extraer la corteza frontoparietal, la cual fue analizada en ensayos de Western Blot.

### *Modelo experimental de isquemia cerebral inducido por la oclusión de la arteria cerebral media [OACM].*

La IC focal transitoria fue producida por la OACM. Los animales fueron anestesiados con isoflurano al 2%. La bifurcación de la carótida cervical fue expuesta a través de una incisión en el cuello. Posteriormente, un monofilamento de nylon fue introducido a través de la arteria carótida proximal externa hasta el interior de la arteria carótida (aproximadamente 17 mm); en este punto el filamento ocluye el origen de la arteria cerebral media. Después de 2 h, el filamento fue retirado para permitir la reperfundión. El

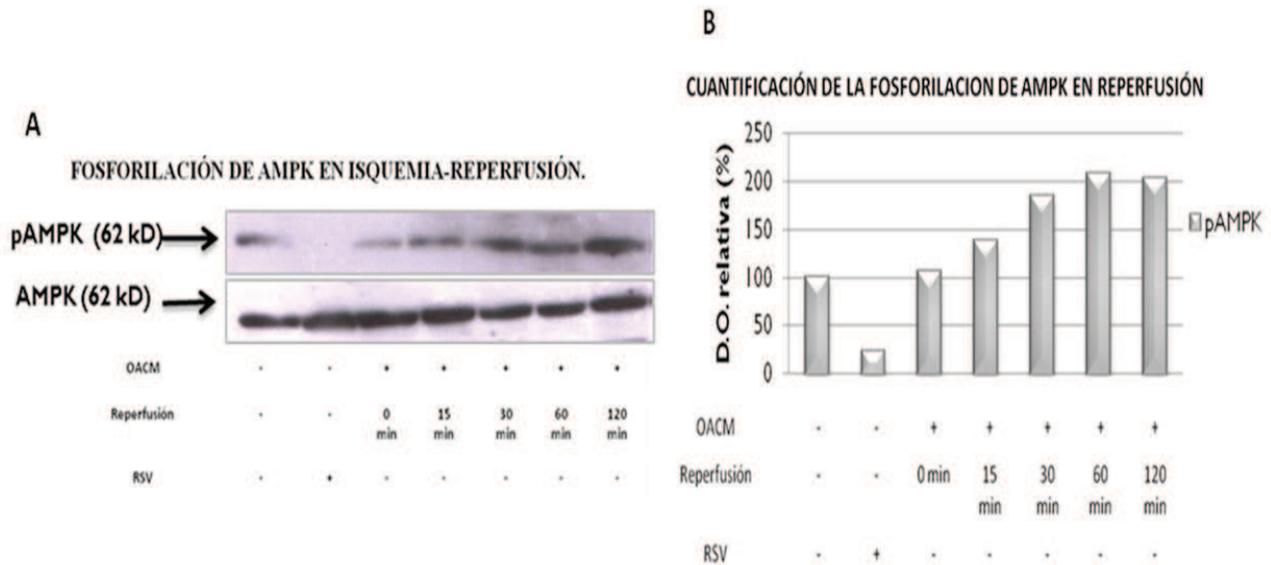


Figura 1. Efecto de la isquemia y la reperfusion en la fosforilación de AMPK. Western Blot representativo de los cambios en los niveles de pAMPK; se observa un incremento gradual de los niveles de pAMPK que parece ser dependiente de la R y de la duración de la misma (A). Cuantificación de las bandas observadas en el Western Blot (B), se observa que pAMPK incrementa a partir de los 15 min de R y el incremento es proporcional al tiempo de R alcanzando un pico máximo a los 60 min (100%).

grupo Sham fue sometido al mismo procedimiento que el grupo con I/R pero sin introducir el monofilamento de nylon.

#### Tratamientos.

Las ratas fueron tratadas al inicio de R. Se aplicó una dosis de 1 mg/kg de RSV por vía intravenosa (vena coccígea, localizada en la cola de la rata). Se utilizó una solución de RSV de 5 mM en 96% de etanol, para su administración se diluyó en etanol al 50% (100µM). Los grupos tratados con vehículo recibieron una dosis de 100 µM de etanol al 96% *i.v.*

#### Evaluación del nivel de fosforilación de AMPK por Western Blot.

Las muestras (200 µg de proteína) se separaron por peso molecular en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10%, durante 1 h a 100 voltios. Las proteínas fueron electrotransferidas (350 mA) a membranas de nitrocelulosa durante 1 h. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (anti-AMPKα 1:1000, Cell Signaling Technology, catálogo 2532), (anti Phospho-AMPKα (Thr172) 1:1000, catálogo 2531) durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 5 veces con 25 mL de *Tris Buffered Saline with Tween* [TBST] (0.1%) durante 5 min., cada uno en agitación y a temperatura (T°) ambiente. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario IgG anti-Rabbit conjugado con peroxidasa (1:15 000, Jackson ImmunoResearch) 2 horas a T° ambiente en agitación. Las membranas fueron lavadas 5 veces con 25 mL de TBST (0.1%) durante 5 min. La señal específica se reveló por quimioluminiscencia (Millipore).

#### Análisis de datos.

Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Los datos crudos se analizaron por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), donde los valores con un valor de  $p < 0.05$  serán considerados estadísticamente significativos.

#### Resultados preliminares

La AMPK total se mantuvo constante durante la MCAO y la reperfusion aun con tratamiento de RSV (véase figura 1 y 2). Sin embargo, se observó un aumento en los niveles de la pAMPK. La reperfusion provocó un aumento en los niveles de pAMPK en un 30% después de 15 min y alcanzó un nivel máximo después de 60 min con un incremento del 100% (ambos en comparación con el control; véase figura 1).

Se observó que el RSV incrementó los niveles de pAMPK en los grupos sometidos a MCAO con y sin reperfusion. En el grupo con MCAO sin reperfusion se observó un incremento del 181.66 %, así mismo en aquellos con reperfusion se observó un incremento del 207.62% a partir de los 15 min de R y el pico de fosforilación de AMPK se observó a los 60 min de reperfusion con un aumento de 322.53%, el cual se mantuvo hasta los 120 min de reperfusion. Todos fueron comparados con el control (véase figura 2).

#### Discusión y conclusiones

*In vivo* se ha demostrado la activación de AMPK en isquemia y se cree que puede estar funcionando como una manera autónoma de la célula para recuperar su balance energético (Li, Zeng, Viollet, Ronnett y McCullough

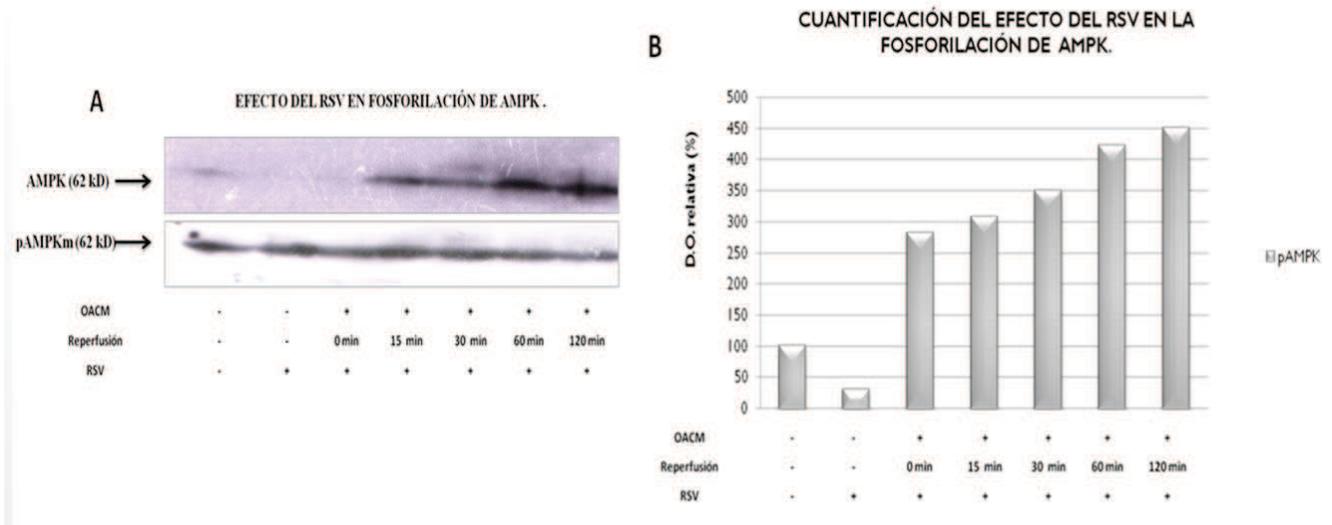


Figura 2. Efecto del RSV en la fosforilación de AMPK. Western Blot de los niveles de AMPK total y pAMPK (A), el RSV (1mg/kg; i.v.) incrementa los niveles de pAMPK en el grupo con OACM (181.66%), a partir de los 15 min de R se va incrementando de manera proporcional a la R y al tiempo de duración de la misma alcanzando su nivel máximo a los 60 min (322.53%) como se observa en el análisis cuantitativo (B).

2007). Los resultados preliminares en este estudio muestran que después de 2 h de MCAO no hay un incremento en los niveles totales de AMPK, lo que coincide con reportes donde no observaron cambios de AMPK total después de 2 h de MCAO en ratones (McCullough, Zeng, Hong, Landree, McFadden, y Ronnett, 2005). Nuestros resultados indican que el proceso isquémico incrementa la fosforilación de AMPK, a partir de los 15 min de R, y que aumenta con respecto al tiempo, esto podría ser debido a que en la célula se activan vías de supervivencia que incrementan el metabolismo energético, en la cual participa la AMPK (Culmsee et al., 2001; McCullough et al., 2005; Li, Zeng, Viollet, Ronnett y McCullough, 2007; Li y McCullough, 2010). Observamos un pico de fosforilación a los 60 min que se mantiene hasta los 120 min de R. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros grupos de trabajo. *In vivo* con ratones sometidos a 2 h de MCAO se observó un incremento en la fosforilación de AMPK después de 90 min, que fue estable hasta por 24 h (McCullough et al., 2005). En modelos *in vitro* donde se ha realizado privación de oxígeno y glucosa [OGD] se han observado incrementos importantes en la fosforilación de AMPK después de 2 h de OGD estables hasta por 6 h, en otros se reporta que después de exponer cultivos celulares a excitotoxicidad por glutamato, se ha observado un incremento en los niveles de AMP que activa a AMPK por tiempos prolongados (McCullough et al., 2005; Weisová et al., 2009).

El RSV ha demostrado tener efectos citoprotectores relacionados con la regulación de vías involucradas con el metabolismo energético y la función mitocondrial (Breen, Sanli, Giacca y Tsiani, 2008; Price et al., 2012), aunque aún se desconoce el mecanismo por el cual ejerce su efecto, hay quienes lo relacionan con la activación de AMPK (Baur y Sinclair et al., 2006; Dasgupta y Milbrand, 2007). Se ha demostrado que la activación de AMPK con AICAR (0.1mM) protege neuronas de hipocampo durante OGD, estrés metabólico, excitotóxico y oxidativo (Culmsee et al.,

2001). Se ha demostrado que el RSV estimula la captura de glucosa y que este efecto está mediado por la activación de AMPK (Breen et al., 2008). En nuestro estudio, observamos que el tratamiento con RSV, no provoca cambios significativos en los niveles totales de AMPK lo que coincide con lo reportado por Breen y col., en su modelo *in vitro* (Breen et al., 2008). Sin embargo, el tratamiento con RSV indujo la fosforilación de AMPK en ratas con isquemia sin y con reperfusion. Observamos que el RSV potencia la fosforilación de AMPK en forma dependiente del tiempo de reperfusion. El mecanismo por el cual el RSV activa a AMPK no está bien descrito sin embargo al ser un activador de sirtuinas, estas podrían estar involucradas en la estimulación de la fosforilación de AMPK, ya que se ha visto una disminución en los niveles de pAMPK cuando se da tratamiento con nicotinamida (inhibidor de sirtuinas) y se ha demostrado que utilizando inhibidores específicos de SIRT-1 hay anulación de la fosforilación de AMPK (Breen et al., 2008; Price et al., 2012). Otros autores reportan que la fosforilación de AMPK por el RSV depende de cinasas río arriba como LKB1 (Dasgupta y Milbrand, 2007).

El incremento en la activación de AMPK eleva la actividad de los transportadores de glucosa en la membrana plasmática con cambios significativos en la captura de glucosa, asociada a la hiperpolarización de la membrana mitocondrial (Abbud, Habinowski, Zhang, Kendrew, Elkairi, Kemp, Witters, et al., 2000; Ciudad, Almeida y Bolaños 2004; ). En células que expresan solo GLUT1 el transporte de glucosa incrementa notablemente en respuesta a hipoxia, cuando AMPK está activa (Abbud et al., 2000). También se ha observado que la activación de AMPK facilita la translocación de GLUT3 a la superficie membranal y no solo de este transportador ya que en músculo esquelético la activación de AMPK con AICAR induce el incremento en la captura de glucosa a través de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Fryer,

Hajdуч, Rencurel, Salt, Hundal, Haxdie y Carling, 2000; Weisová et al., 2009).

El resveratrol reduce el daño neuronal inducido por la isquemia y su mecanismo de acción podría estar asociado a la activación de la AMPK. Por lo tanto, es posible que en nuestro modelo el resveratrol este activando un mecanismo similar que favorezca la supervivencia neuronal dependiente de la translocación de los transportadores de glucosa a la membrana celular.

### Agradecimientos

Este proyecto está financiado por CONACYT CB-2012-1 con el número de proyecto 182266 y por la Universidad Autónoma de Guerrero a través de apoyos a la investigación.

Narayana Pineda Ramírez recibió apoyo económico de CONACYT con el número de becario 484304 y de la Universidad Autónoma de Guerrero por medio del programa de Movilidad Estudiantil Nacional.

### Referencias

- Abbud, W., Habinowski, S., Zhang, J.Z., Kendrew, J., Elkairi, F.S., Kemp, B.E., Witters, L.A. y Ismail-Beigi, F. (2000). Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of Glut1-mediated glucose transport. *Archives of biochemistry and biophysics*, 380, 347–352.
- Baur, J.A. y Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews drug discovery*, 5, 493–506.
- Breen, D.M., Sanli, T., Giacca, A., Tsiani, E. (2008). Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochemical and biophysical research communications*, 374, 117–122.
- Cidad, P., Almeida, A., Bolaños, J.P. (2004). Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide rapidly stimulates cytoprotective GLUT3-mediated glucose uptake through 5-AMP-activated protein kinase. *Biochemical journal*, 384, 629–636
- Culmsee C, Monnig J, Kemp BE, Mattson MP (2001) AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *Journal of molecular neuroscience*, 17:45–58
- Dasgupta, B., Milbrandt, J. (2007). Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17). 7212-7222.
- Dirnagl, U., Ladecola, C., Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22, 391-7.
- Fryer, L. G. D., Hajdуч, E., Rencurel, F., Salt, I.P., Hundal, H.S., Haxdie, D.G. y Carling, D. (2000). Protein Kinase via Stimulation of Nitric Oxide Synthase. *Diabetes*, 49, 1978-1985.
- Hardie, D.G. (2011). AMP-activated protein kinase- an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development*, 25, 1895–1908.
- Kuramoto, N., Wilkins, M.E., Fairfax, B.P., Revilla-Sanchez, R., Terunuma, M., Tamaki, K., Iemata, M., Warren, N., Couve, A., Calver, A., Horvath, Z., Freeman, K., Carling, D., Huang, L., Gonzales, C., Cooper, E., Smart, T.G., Pangalos, M.N., Moss, S.J. (2007). Phospho-dependent functional modulation of GABA (B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron*, 53, 233–47.
- Li, J. y McCullough, D.L. (2010). Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow & metabolism*, 30, 480-492.
- Li, J., Zeng, Z., Viollet, B., Ronnett, G.V., McCullough, L.D. (2007) Neuroprotective effects of adenosine monophosphate activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke. *Stroke*, 38 (11), 2992–2999.
- McCullough, L.D., Zeng, Z., Hong, Li., Landree, L.E., McFadden, J., Ronnett, G.V. (2005). Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 20493–502.
- Nicholls, D.G., and Ward M.W. (2000). Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends in Neurosciences*, 23, 166-174.
- Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, Y.J.A., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North, J.B., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, S.J., Hubbard, P.B., Verela, T.A., Davis J.G., Varamini, B., Hafner A., Moaddel, R. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metabolism*, 15(5), 675–690.
- Rovegno, M., Soto, P.A., Sáez, J.C., von Bernhardt, R. (2012). Mecanismos biológicos involucrados en la propagación del daño en el traumatismo encefálico craneano. *Medicina intensiva*. 36(1), 37-44.
- Weisová, P., Concannon C.G., Devocelle, M., Prehn, M.H.J., Ward, W.M. (2009). Regulation of Glucose Transporter 3 Surface Expression by the AMP-Activated Protein Kinase Mediates Tolerance to Glutamate Excitation in Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 29(9), 2997-3008.