

# La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina

José Pontón

*Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Leioa, Vizcaya*

## Resumen

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad que protege a la célula de diferentes tipos de estrés ambiental, entre los que destacan los cambios osmóticos. Además, la pared celular permite la interacción con el medio externo ya que algunas de sus proteínas son adhesinas y receptores. Algunos de sus componentes tienen una alta capacidad inmunogénica. La pared celular es una estructura característica de los hongos y está compuesta por glucanos, quitina y glicoproteínas. Al no estar presentes los componentes de la pared celular fúngica en el ser humano, esta estructura es una diana excelente para la terapia antifúngica. La anidulafungina, como el resto de las equinocandinas, actúa sobre la  $\beta$ -1,3-D-glucan sintetasa inhibiendo la formación del  $\beta$ -1,3-D-glucano y produce, según el tipo de hongo, un efecto fungicida o fungistático.

## Palabras clave

Anidulafungina, Equinocandinas, Hongos, Mecanismo de acción, Pared celular

## The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin

## Summary

The fungal cell wall is a structure with a high plasticity that protects the cell from different types of environmental stresses including changes in osmotic pressure. In addition to that, the cell wall allows the fungal cell to interact with its environment, since some of its proteins are adhesins and receptors. Some of its components are highly immunogenic. The structure of the fungal cell wall is unique to the fungi, and it is composed of glucan, chitin and glycoproteins. Since humans lack the components present in the cell walls of fungi, this structure is an excellent target for the development of antifungal drugs. Anidulafungin, like the rest of echinocandins acts on  $\beta$ -1,3-D-glucan synthase inhibiting the formation of  $\beta$ -1,3-D-glucan and causing, depending on the type of fungus, a fungicidal or either a fungistatic effect.

## Key words

Anidulafungin, Echinocandins, Fungi, Mechanism of action, Cell wall

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da la forma a la célula, controla la permeabilidad celular y protege a la célula de los cambios osmóticos. Además de estas importantes funciones, constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella las adhesinas y un gran número de receptores que tras su activación, desencadenarán una compleja cascada de señales en el interior de la célula.

Dada su localización en el exterior de la célula, la pared es el primer lugar de interacción con el hospedador, jugando un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica [6,21,26]. Algunos componentes de la pared son muy inmunogénicos y estimulan un gran número de respuestas celulares y humorales durante la infección. Componentes de la pared celular como los  $\beta$ -glucanos y los mananos, así como los anticuerpos dirigidos contra ellos son de utilidad diagnóstica al detectarse en pacientes con infección fúngica invasora [23]. Otros componentes como los mananos y las manoproteínas son potentes inmunomoduladores.

La pared celular es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis. Dado el papel vital que la pared celular juega en la fisiología de la célula fúngica, puede considerarse el talón de Aquiles de los hongos y por tanto, una diana muy importante para la acción de los fármacos antifúngicos [11].

La pared es una estructura específica de la célula fúngica y es muy diferente de la pared de las células vegetales, compuesta fundamentalmente de celulosa. La pared

## Dirección para correspondencia:

Dr. José Pontón  
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología  
Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco  
Barrio Sarriena s/n  
48940 Leioa, Vizcaya, España  
Tel.: +34 946012855  
Fax: +34 946013495  
E-mail: jose.ponton@ehu.es

©2008 Revista Iberoamericana de Micología  
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)  
1130-1406/01/10.00 €

fúngica está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos destacan la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida que se esquetiza en la figura.

**Glicoproteínas.** Las proteínas representan el 30-50% del peso seco de la pared fúngica en los hongos levaduriformes y el 20-30% del peso seco de la pared de los hongos filamentosos. La mayoría de las proteínas están asociadas a glúcidos por enlaces O o N, formando glicoproteínas. Las proteínas de la pared tienen diversas funciones, participando en el mantenimiento de la forma celular, interviniendo en los procesos de adhesión (Als y Hwp1), protegiendo a la célula de sustancias extrañas, participando en la absorción de moléculas, transmitiendo señales al citoplasma y sintetizando y remodelando los componentes de la pared [3].

**Quitina.** La quitina se sintetiza a partir de N-acetil glucosamina por la enzima quitin sintasa, que deposita los polímeros de quitina en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplásmica. El contenido en quitina de la pared fúngica varía según la fase morfológica del hongo. Representa el 1-2% del peso seco de la pared celular de las levaduras mientras que en los hongos filamentosos puede llegar al 10-20%. El contenido de quitina en la pared de las hifas de *Candida albicans* es tres veces más alto que el de las levaduras [7] mientras que el contenido en quitina de las fases miceliales de *Paracoccidioides brasiliensis* y *Blastomyces dermatitidis* es 25-30% del de la fase levaduriforme [13]. Dada su importancia en la estructura de la pared, la síntesis de la quitina es una buena diana para la acción de los antifúngicos. Aunque se han descubierto algunos agentes que interfieren con la síntesis de quitina (nikomicinas y polioxinas), todavía no se ha comercializado ningún antifúngico que utilice este mecanismo de acción.

**Glucano.** El glucano es el polisacárido estructural más importante de la pared y representa el 50-60% del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones  $\beta$ -1,3 (65-90%), aunque también hay glucanos con enlaces  $\beta$ -1,6 (en *Candida* pero no en *Aspergillus*),  $\beta$ -1,4,  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,4. El  $\beta$ -1,3-D-glucano es el componente estructural más importante de la pared, al que se unen covalentemente otros componentes de esta estructura (Figura).

El  $\beta$ -1,3-D-glucano se sintetiza por un complejo de enzimas situado en la membrana plasmática, denominadas glucano sintetasa. Estas enzimas catalizan la formación de cadenas lineales de glucano compuestas por aproximadamente 1.500 residuos de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,3. En estas cadenas, cada 40-50 residuos de glucosa se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces  $\beta$ -1,3 para dar lugar a una estructura ramificada. Estas ramificaciones pueden unirse a otros glucanos, a la quitina o a las manoproteínas, proporcionando a la pared una gran resistencia mecánica esencial para mantener la integridad celular (Figura).

Los genes que codifican la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetasa fueron identificados inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae* y se denominan *FKS1* y *FKS2* [8,28]. Actualmente se conoce análogos de estos genes en varias especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis*. *FKS1* codifica una proteína de la membrana citoplásmica de 215 kDa que es la subunidad principal de la glucano sintetasa (Figura). La disrupción de los genes *FKS1* o *FKS2* produce mutantes con un crecimiento lento y una

pared defectuosa [8,19]. Sin embargo, la eliminación simultánea de los dos genes es letal [2, 19].

La actividad de la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetasa se encuentra regulada por el ciclo celular y está bajo el control del gen *RHO1*, que interactúa no solo con las proteínas Fks sino con la proteína quinasa C, un regulador de la cascada MAP (*mitogen-activated protein*). Rho1p se activa por las proteínas Rom1 y Rom2 y esta última a su vez se activa por las glicoproteínas de la pared celular Wsc1 y Mid2 (Figura). La disrupción del gen *RHO1* es letal.

**Mecanismo de acción de la anidulafungina.** Las equinocandinas son lipopéptidos que incluyen equinocandina B, aculeacina A, cilofungina, anidulafungina, caspofungina y micafungina [27]. El mecanismo de acción antifúngica de todas es común y se basa en la producción de daños en la pared celular al unirse a la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetasa (Fks1p) responsable de la síntesis del  $\beta$ -1,3-D-glucano. Esta acción resulta fungicida para *Candida* y fungistática para *Aspergillus*. El tratamiento con equinocandinas produce el hinchamiento y la lisis celular en las zonas de crecimiento de la pared, así como la activación de los genes relacionados con la biosíntesis de la pared [29]. Las alteraciones en la pared celular de los hongos causadas por las equinocandinas podrían exponer el  $\beta$ -1,3-D-glucano en la superficie celular y por tanto este componente podría interactuar con el receptor para el  $\beta$ -glucano dectina-1, activando la secreción de citocinas por las células de la inmunidad innata [30]. Las equinocandinas también son activas contra *Pneumocystis jirovecii* pero no actúan contra *Cryptococcus*, *Fusarium*, zigomicetos y *Scedosporium*.

La resistencia a las equinocandinas es por el momento excepcional y se están empezando a caracterizar los genes implicados en este proceso. Utilizando una biblioteca de mutantes delecionados de *S. cerevisiae*, Markovich et al. [17] estudiaron la hipersensibilidad o la sensibilidad reducida a caspofungina y observaron que los genes relacionados con una sensibilidad aumentada a caspofungina (4-8 veces) estaban relacionados con la función de la membrana plasmática y la pared celular, especialmente en la ruta de integridad PKC, la síntesis de manano, quitina y ergosterol, las funciones de la vacuola y el transporte y el control general de la transcripción. Por el contrario, los genes relacionados con la disminución de la sensibilidad (4 veces) estaban relacionados con la función de la pared, la transducción de señales y la función de las vacuolas. Se identificaron 52 genes cuya deleción condujo a una hipersensibilidad a caspofungina y 39 genes cuya deleción dio lugar a una sensibilidad reducida a caspofungina [16].

El mecanismo de resistencia a las equinocandinas mejor estudiado es la alteración del gen *FSK1* [9,15,20]. Los aislamientos clínicos con una sensibilidad disminuida frente a caspofungina que presentan mutaciones en el gen *FKS1* tienen una glucano sintetasa que es menos susceptible a caspofungina y necesitan una mayor cantidad de antifúngico para controlar la infección renal en un modelo animal de candidiasis que los aislamientos sin mutaciones en el gen *FKS1* [22]. Las mutaciones incluyen sustituciones de aminoácidos en una región de la Fsk1 denominada HS1 (hot-spot 1, Phe641-Pro649). En *S. cerevisiae* se han observado las sustituciones F639I, V641K, D646Y, mientras que en *C. albicans* se han descrito las sustituciones S645F, S645P, S645Y. Los aislamientos clínicos de *C. albicans* de pacientes que no respondieron al tratamiento con caspofungina tenían una sustitución en la Ser 645 de la región HS1 de la Fsk1. Estos aislamientos son por el momento muy infrecuentes y las mutaciones en la región HS1 sólo se han observado en cepas resistentes de *C. albicans* y *Candida krusei* [12,22]. Se ha descrito otra región de la

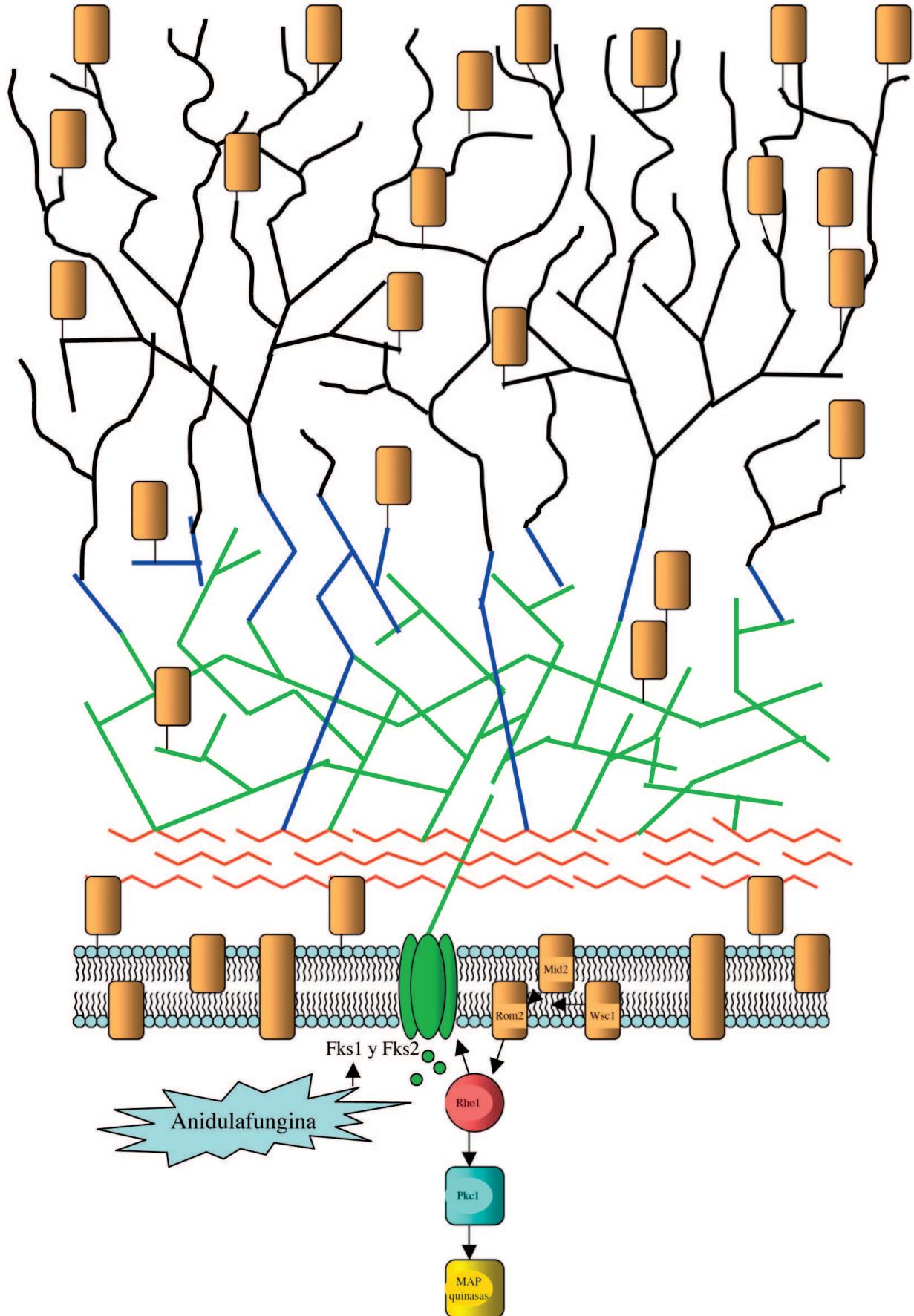


Figura. Esquema de la pared celular de *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Los polisacáridos de la pared están representados en diferentes colores: quitina (rojo)  $\beta$ -1,3-D-glucano (verde),  $\beta$ -1,6-D-glucano (azul) y mananos (negro). Las proteínas están representadas por rectángulos de color naranja. Las subunidades de la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetasa en la membrana plasmática están coloreadas en verde.

**Tabla.** Resistencia cruzada a las equinocandinas en aislamientos clínicos de *Candida albicans* con mutaciones en Fks1. Las pruebas de sensibilidad se realizaron según el protocolo M27A2 del CLSI. [24].

Cepa	Mutación	Caspofungina CMI (µg/ml)	Micafungina CMI (µg/ml)	Anidulafungina CMI (µg/ml)
<i>C. albicans</i> ATCC90028	Silvestre	0,125	0,016	0,016
<i>C. albicans</i> M85	S645F	4,0	2,0	0,5
<i>C. albicans</i> M86	S645P	16,0	2,0	0,3
<i>C. albicans</i> M89	S645Y	16,0	2,0	0,5
<i>C. albicans</i> NR3	S645Y	16,0	2,0	0,5
<i>C. albicans</i> M195	S645F	4,0	1,0	0,5
<i>C. albicans</i> M196	S645F	4,0	1,0	0,5
<i>C. albicans</i> C31	S645P	16,0	16,0	2,0
<i>C. albicans</i> C41	S645P	16,0	16,0	2,0

Fsk1 denominada HS2 que también se ha relacionado con la disminución de la sensibilidad a caspofungina en *C. albicans* y *C. krusei*, aunque está menos estudiada que la HS1 [22].

Las cepas de *C. albicans* con sensibilidad disminuida a caspofungina también muestran una sensibilidad reducida a micafungina y anidulafungina, lo que sugiere la existencia de una resistencia cruzada (Tabla). Las CMI fueron más altas para caspofungina (4 a >16 µg/ml) y micafungina (1-16 µg/ml) que para anidulafungina (0,5-2 µg/ml).

La resistencia a las equinocandinas demostrada en *C. albicans* también se observa en otras especies del género *Candida* como *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *C. krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida dubliniensis* [12,14]. La existencia de mutaciones en las regiones HS1 y HS2 de la Fks1 también pueden estar relacionadas con la menor sensibilidad intrínseca a las equinocandinas que presentan *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* (CMI 0,5-8 µg/ml) [10].

Algunos hongos como *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp. *Scedosporium* spp. y los zigomicetos son resistentes a las equinocandinas (CMI >16 µg/ml) [25,31]. El mecanismo de resistencia no parece estar relacionado con la Fks1, ya que caspofungina inhibe la actividad de la glucanasa sintetasa de estas especies. Es por tanto probable que existan mecanismos de resistencia a las equinocandinas alternativas a las mutaciones en Fks1 [24].

Como era de esperar por su mecanismo de acción, no se han observado resistencias cruzadas entre equinocandinas polienos y azoles [1].

## Expectativas

Dado el carácter esencial y sus componentes específicos, la pared de los hongos es una diana muy importante para los antifúngicos. Los primeros antifúngicos que se han desarrollado con un mecanismo de acción que

afecta a la estructura de la pared son las equinocandinas. Estos antifúngicos han mostrado un amplio espectro de actividad y una ausencia de resistencia cruzadas con otros antifúngicos. Es por tanto previsible que en el futuro se diseñen nuevos fármacos de la misma familia que mejoren la actividad de los actuales.

Además del β-1,3-D-glucano, la pared celular tiene otras dianas interesantes que pueden ser utilizadas en el futuro. En este sentido las glucosil transferasas de la pared que realizan las uniones entre los distintos componentes de la pared pueden ser una diana excelente y los antifúngicos que actúen sobre ellas tendrían un efecto similar al de la penicilina con la pared celular bacteriana. Además la HSP90, la Als3 y el manano pueden ser la diana de anticuerpos que ayuden a combatir la infección por *Candida* y otros hongos. Actualmente se está estudiando la utilidad del tratamiento en pacientes con un anticuerpo recombinante (Mycograb) contra la HSP90 [18] y se ha demostrado que los anticuerpos contra la Als3, el β-glucano y el manano son protectores en modelos animales [4,5,32].

*Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos PI040556 (Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad) e GIC07/123-IT-264-07 del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza.*

## Bibliografía

1. Bachmann SP, Patterson TF, Lopez-Ribot JL. In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2228-2230.
2. Beauvais A, Bruneau JM, Mol PC, Buitrago MJ, Legrand R, Latge JP. The glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* 2000; 83: 2273-2279.
3. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 2006; 28: 799-808.
4. Brena S, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Cabezas J, Moragues MD, Pontón J. Fungicidal monoclonal antibody C7 binds to *Candida albicans* Als3. *Infect Immun* 2007; 75: 3680-3682.
5. Cutler JE. Defining criteria for anti-mannan antibodies to protect against candidiasis. *Curr Mol Med* 2005; 5: 383-392.
6. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 130-180.
7. Chattaway FW, Holmes MR, Barlow JE. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1968; 51: 367-376.
8. Douglas CM, Foor F, Marrinan JA, Morin N, Nielsen JB, Dahl AM, Mazur P, Baginsky W, Li W, el-Sherbeini M, Clemas JA, Mandala SM, Frommer BR, Kurtz MB. The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of  $\beta$ -1,3-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12907-12911.
9. Douglas CM, D'Ippolito JA, Shei GJ, Meinz M, Onishi J, Marrinan JA, Li W, Abruzzo GK, Flattery A, Bartizal K, Mitchell A, Kurtz MB. Identification of the *FKS1* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-d-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2471-2479.
10. Espinel-Ingroff A. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 121-136.
11. Heitman J. Cell biology. A fungal Achilles' heel. *Science* 2005; 309: 2175-2176.
12. Kahn JN, Garcia-Effron G, Hsu MJ, Park S, Marr KA, Perlin DS. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1876-1878.
13. Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 1969; 97: 1036-1041.
14. Katiyar S, Pfaller M, Edlind T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2892-2894.
15. Kurtz MB, Abruzzo G, Flattery A, Bartizal K, Marrinan JA, Li W, Milligan J, Nollstadt K, Douglas CM. Characterization of echinocandin-resistant mutants of *Candida albicans*: genetic, biochemical, and virulence studies. *Infect Immun* 1996; 64: 3244-3251.
16. Lesage G, Shapiro J, Specht CA, Sdicu AM, Menard P, Hussein S, Tong AH, Boone C, Bussey H. An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet* 2005; 6: 8.
17. Markovich S, Yekutieli A, Shalit I, Shadkhan Y, Oshero N. Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3871-3876.
18. Matthews RC, Rigg G, Hodgetts S, Carter T, Chapman C, Gregory C, Illidge C, Burnie J. Preclinical assessment of the efficacy of Mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2208-2216.
19. Mazur P, Morin N, Baginsky W, El-Sherbeini M, Clemas JA, Nielsen JB, Foor F. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast  $\beta$ 1,3-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5671-5681.
20. Mio T, Adachi-Shimizu M, Tachibana Y, Tabuchi H, Inoue SB, Yabe T, Yamada-Okabe T, Arisawa M, Watanabe T, Yamada-Okabe H. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *GSC1/FKS1* and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* 1997; 179: 4096-4105.
21. Nimrichter L, Rodrigues ML, Rodrigues EG, Travassos LR. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect* 2005; 7: 789-798.
22. Park S, Kelly R, Kahn JN, Robles J, Hsu MJ, Register E, Li W, Vyas V, Fan H, Abruzzo G, Flattery A, Gill C, Chrebet G, Parent SA, Kurtz M, Teppler H, Douglas CM, Perlin DS. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3264-3273.
23. Pazos C, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, del Palacio A. Diagnostic potential of detection of (1-3)- $\beta$ -D-glucan and antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 209-215.
24. Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 2007; 10: 121-130.
25. Pfaller MA, Marco F, Messer SA, Jones RN. In vitro activity of two echinocandin derivatives, LY303366 and MK-0991 (L-743,792), against clinical isolates of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, and other filamentous fungi. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 30: 251-255.
26. Pontón J, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Alvarez M, Moragues MD. Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Med Mycol* 2001; 39 (Supl. 1): 101-110.
27. Pontón J, Quindós G. Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Med Clin (Barc)* 2006; 126 (Supl. 1): 56-60.
28. Qadota H, Python CP, Inoue SB, Arisawa M, Anraku Y, Zheng Y, Watanabe T, Levin DE, Ohya Y. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of  $\beta$ 1,3-glucan synthase. *Science* 1996; 272: 279-281.
29. Reinoso-Martin C, Schuller C, Schuetzer-Muehlbauer M, Kuchler K. The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Sit2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell* 2003; 2: 1200-1210.
30. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 1-23.
31. Singh J, Rimek D, Kappe R. In vitro susceptibility of 15 strains of zygomycetes to nine antifungal agents as determined by the NCCLS M38-A microdilution method. *Mycoses* 2005; 48: 246-250.
32. Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, De Bernardis F, Berti F, Norelli F, Galli C, Bellucci C, Polonelli L, Costantino P, Rappuoli R, Cassone A. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* 2005; 202: 597-606.