

Comparación de los genotipos CYP2C19 entre caucásico español y mestizo colombiano

Resumen

*Algunos alelos del gen CYP2C19 producen enzima con actividad catalítica defectuosa, pero este gen no ha sido caracterizado en mestizo suramericano ni en caucásico español. Nos propusimos determinar la prevalencia y comparar los alelos CYP2C19*1 (nativo), CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*4, CYP2C19*5, CYP2C19*6 y CYP2C19*8 en muestras de población mestiza colombiana y caucásica española. Para ello genotificamos 189 colombianos y 183 españoles mediante la técnica de mini-secuenciación con el ABI Prism SNaPshot Multiplex System.*

*Entre los colombianos encontramos 83.6% de portadores de los dos alelos nativos (fenotipo EM, metabolizador rápido), 15.3% de heterocigotos para un alelo no funcional (fenotipo IM, metabolizador intermedio) y dos personas (1.1%) portadoras de los dos alelos no funcionales (fenotipo PM, metabolizador pobre). El 77% de españoles son portadores de los dos alelos nativos (EM), 21.8% son heterocigotos para un alelo no funcional (IM) y el 1.1% son homocigotos *2/*2 (PM). El equilibrio de Hardy-Weinberg se confirmó para la distribución genotípica de ambos grupos. En los dos grupos la variante mutada *2 fue la más frecuente, sólo en un individuo español se encontró el alelo *4, y los alelos *3, *5, *6 y *8 no se hallaron en ninguno de los dos grupos. No hubo diferencias significativas en las prevalencias alélicas y genotípicas de los dos grupos étnicos comparados, lo cual permite suponer que también sean semejantes las respuestas farmacogenéticas relacionadas con el metabolismo de los medicamentos que son sustratos de la enzima CYP2C19.*

Carlos A. Isaza M.

Médico Farmacólogo. Director del Grupo de Investigación en Farmacogenética de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Julieta Henao B.

Médica Genetista. Profesora de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira y Directora del Laboratorio de Genética Médica de la UTP.

Gloria L. Porras H.

Médica Bióloga Molecular. Profesional del Laboratorio de Genética Médica de la UTP.

Palabras Clave: farmacogenética, gen CYP2C19, polimorfismo genético.

Abstract

Gene CYP2C19 is polymorphic, with a serie of alleles that codify enzymes with null or minimum catalytic activity towards their substrates, but genotypic or phenotypic studies of this gene in many populations do not exist, including the South American Mestizo and Caucasians Spaniards. We determined the prevalence and compared the alleles CYP2C19*1 (wild-type), CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*4, CYP2C19*5, CYP2C19*6 y CYP2C19*8 in samples of Spanish Caucasian and Colombian Mestizo populations. For this purpose we genotyping 189 Colombians and 183 Spaniards using the minisequention Multiplex SNaPshot assay.

Between Colombians we found 83.6% of carrier of the two wild-type alleles (extensive metabolizer, EM), 15.3% of heterozygous of one nonfunctional allele (intermediate metabolizer, IM) and two persons (1.1%) carriers of two nonfunctional alleles (poor metabolizer, PM). 77% of Spaniards are carrier of both native alleles (EM), 21.8% are heterozygous of one nonfunctional allele (IM) and the 1.1% are homozygous *2/*2 (PM). The Hardy-Weinberg equilibrium was confirmed to the genotype frequencies of Mestizos and Spaniards.

In both groups the nonfunctional variant *2 was the most frequent, only in an individual Spaniard we found the *4 allele, and the *3, *5, *6 and *8 alleles were not found in neither groups. The allelic and genotypic prevalences of the CYP2C19 gene are statistically similars among the two ethnic groups compared. These data suggest that there are not differences in pharmacogenetic responses among Colombian Mestizos and Spanish Caucasians, in relation to drugs that are metabolized by CYP2C19 enzyme.

Key words: CYP2C19 gene, genetic polymorphism, pharmacogenetics.

Recibido para publicación: 07-04-2006

Aceptado para publicación: 10-05-2006

Introducción

El citocromo P-450 2C19 (CYP2C19), un miembro de la superfamilia de enzimas xenobióticas del citocromo P-450, es responsable de la formación de metabolitos activos o inactivos de una variedad de fármacos de uso frecuente, tales como inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lanzoprazol, pantoprazol), antidepresivos (citalopram, moclobemide, imipramina, clomipramina, amitriptilina), benzodiazepinas (diazepam, flunitrazepam, clobazam), antiepilépticos (valproato, fenitoina), propranolol y proguanil (1-5).

El gen *CYP2C19* contiene una serie de polimorfismos de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphisms, SNPs) que codifican enzimas con actividad catalítica nula o mínima hacia sus sustratos (tabla 1). Dicho polimorfismo divide las poblaciones en tres subgrupos fenotípicos: metabolizadores rápidos (EM), metabolizadores intermedios (IM) y metabolizadores lentos (PM). La deficiencia enzimática se hereda como un rasgo autosómico recesivo (6). Las frecuencias y los tipos de alelos varían entre los diferentes grupos étnicos. Así, del 13 al 23% de los orientales son metabolizadores lentos, con los alelos defectuosos *2 y *3 responsables de más del 99% de los individuos PMs (7). Entre caucásicos el alelo *2 es el responsable de la mayoría de los individuos PM (2-5% de la población), la variante *3 es muy rara, y se han reportado pequeñas frecuencias de los otros alelos descritos en la tabla 1 (8-10). En población negra se han hallado algunas mutaciones nuevas (*9, *10, *12) y la prevalencia de individuos PMs es del 4 al 8% (11,12). Recientemente se reportó un nuevo alelo responsable del metabolismo ultrarrápido del omeprazol (13).

Las consecuencias clínicas del polimorfismo del gen *CYP2C19* aún no han sido dilucidadas en detalle, pero pueden ilustrarse con el caso de los medicamentos inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lanzoprazol y pantoprazol). Las personas pertenecientes al fenotipo EM metabolizan estos fármacos a una velocidad tal que requieren dosis hasta cuatro veces mayores que los individuos con fenotipo PM, para alcanzar concentraciones séricas y efectos similares del fármaco (14,15).

No existen estudios genotípicos o fenotípicos *CYP2C19* en muchas poblaciones, incluyendo el mestizo suramericano y, aunque el polimorfismo genético *2C19* está bien descrito en caucásicos europeos, sólo encontramos en la literatura un reporte referido específicamente a españoles (16,17). Como se sabe, el caucásico español está relacionado ancestralmente con el mestizo latinoamericano, en la medida que el español contribuyó al mestizaje, junto con el amerindio y el negro africano. El grado de microheterogeneidad en la estructura y expresión del gen *CYP2C19* entre estos dos grupos étnicos sería un reflejo del aporte del caucásico español al mestizaje latinoamericano. Adicionalmente, la genotipificación *CYP2C19* da información útil para el empleo de fármacos sustratos de esta enzima a dosis más acordes con el perfil farmacogenético de cada grupo étnico (18).

En este estudio nos propusimos determinar la prevalencia de los genotipos y alelos *CYP2C19**1 (nativo), *CYP2C19**2, *CYP2C19**3, *CYP2C19**4, *CYP2C19**5, *CYP2C19**6 y *CYP2C19**8 en sendas muestras de población mestiza colombiana y caucásica española, y comparar los genotipos y frecuencias alélicas halladas en estos dos grupos relacionados étnicamente.

Tabla 1. Principales alelos mutantes del gen *CYP2C19* asociados con el fenotipo PM (poor metabolizer).

ALELO	DESCRIPCIÓN	EFEECTO
<i>CYP2C19</i> *2	G ₆₈₁ A en el exón 5	Defecto splicing
<i>CYP2C19</i> *3	G ₆₃₆ A en el exón 4	Codón de terminación prematuro, proteína truncada
<i>CYP2C19</i> *4	A ₁ G en el exón 1	Met,Val, se bloquea la traducción de la proteína
<i>CYP2C19</i> *5	C ₁₂₉₇ T en el exón 9	Arg ₄₃₃ Trp, incapacidad de la apoproteína para incorporar el grupo hemo.
<i>CYP2C19</i> *6	G ₃₉₅ A en el exón 3	Arg ₁₃₂ Gln, enzima inactiva
<i>CYP2C19</i> *8	T ₃₅₈ C en el exón 3	Trp ₁₂₀ Arg, enzima inactiva

Materiales y métodos

Individuos. 189 colombianos y 183 españoles sanos, de ambos sexos, no consanguíneos y mayores de edad fueron genotipificados. Cada participante fue informado sobre el proyecto y firmó su respectivo consentimiento informado. Este protocolo fue aprobado en la categoría de investigación con riesgo mínimo, según la resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Genotipificación. Para la genotipificación se aplicó la técnica de mini-secuenciación o “ddNTP primer extension”. Las referencias sobre las localizaciones de los nucleótidos están basadas en la secuencia del gen *CYP2C19* obtenida de la base de datos GenBank, número de acceso AY796203. Previa extracción del DNA genómico de células obtenidas por escobillado bucal o manchas de sangre, utilizando el método de extracción desde tarjetas FTA, se procedió a la amplificación de 5 fragmentos del gen *CYP2C19* correspondientes a los exones 1, 2-3, 4, 5 y 9 con

tamaños de 410, 719, 310, 410 y 529 pares de bases, respectivamente, en los cuales quedan incluidos los SNPs a ser estudiados. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25µl con 100-200ng de DNA genómico, 1x de buffer PCR, dNTPs 0.2mM, 0.4µM de cada uno de los primers usados por Morita *et al* (19) (tabla 2), MgCl₂ 2.5mM y 0.8U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Brazil). La amplificación se realizó en un termociclador automático (DNA Thermal Cycler PJ 2000, Perkin Elmer) con los siguientes parámetros: un paso inicial de desnaturalización por 5 min a 94°C, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron en el lector de geles GelDoc. Las bandas cortadas se purificaron con el Kit GFX Purification (Amersham Pharmacia Biotech). Usando este producto amplificado como plantilla, se efectuaron

Tabla 2. Secuencias de los primers usados en la PCR de pre-amplificación (ref. 21) y en las reacciones SNaPshot multiplex.

USADO PARA	SECUENCIAS DE PRIMER (5' a 3')
<i>Amplificación de fragmentos en :</i>	
Exon 1	agtgggcctaggtgattggccactt tcaaagtattttactttacaatgatctc
Exones 2-3	atacaatgaaaatatgaatctaag caggactccaaataaaagatc
Exon 4	tgctttaaggggaattcatagg aaaatgtacttcagggttgg
Exon 5	caaccagagcttggcatattg tgatgcttactggatattcatgc
Exon 9	atctactcatccctcctatgattcaccg atgtggcactcaatgaactattataga
<i>Detección de alelos :</i>	
*2	aataattttcccaactatcattgattatttccc
*3	aaaacatcaggattgtaagcaccctcg
*4	agaggagaaggcttca
*5	aacagctccatgcgggcccaggccctctcccacacaaaatcc
*6	ggcgtttctccctcatgacgctgc
*8	tttcagcaatggaagaga

las reacciones de multiplex en un solo tubo para la detección de la forma nativa del gen y de las mutaciones *2, *3, *4, *5, *6 y *8.

La mini-secuenciación se realizó con el kit ABI Prism SNaPshot ddNTP Primer Extension (PE Applied Biosystems), con base en el método propuesto por Bernat *et al* (20). Las reacciones de extensión ddNTP de los primers se realizaron en un volumen total de 10µl conteniendo 0.01 a 0.4pmol/µl del amplicón, 0.15pmol/µl de cada uno de los primers (tabla 2) y 5µl de la mezcla de reacción SNaPshot que contiene Amplitaq DNA polimerasa FS y los dye-terminator marcados. La amplificación se hizo durante 25 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 96°C por 10s, anillaje a 50°C por 5s y extensión a 60°C por 30s. Los productos resultantes se inyectaron electroquinéticamente por 5s a 15kV y se sometieron a electroforesis por 24 min a 15kV, 9µA y 60°C en un capilar de 36 cm de longitud, usando el POP4 (performance optimum polymer 4) con el láser a potencia constante de 9.9mW. Los datos se analizaron por el color de los picos y el tamaño de los fragmentos, mediante el software Genemapper Analysis (PE Applied Biosystems).

Con el propósito de verificar las mutaciones encontradas e identificar alteraciones adicionales del gen *CYP2C19*, se tomaron como plantillas para posterior secuenciación los productos amplificados de los exones 1, 2-3, 4, 5 y 9. Las secuenciaciones se realizaron en el equipo secuenciador de DNA ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Manejo estadístico. Las frecuencias alélicas se calcularon a partir del número observado de cada alelo y del número de cromosomas examinados. Los individuos se clasificaron de acuerdo con su genotipo de esta manera: a los homocigotos para el alelo nativo se les predice el fenotipo EM, mientras a los portadores de uno o dos alelos mutados se les predice el fenotipo IM o PM, respectivamente. La significancia de las comparaciones y el equilibrio de Hardy-Weinberg se establecieron mediante la prueba de Chi cuadrado. Para el análisis de las diferencias alélicas y genotípicas se utilizaron intervalos de confianza del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron en el software SPSS 10.0 para Window y se consideraron significativos valores de $p < 0.05$.

Tabla 3. Frecuencias de los alelos y genotipos *CYP2C19* entre mestizos colombianos (n=189) y caucásicos españoles (n=183).

	Mestizos Colombianos		Caucásicos Españoles		P ^a
Alelos <i>CYP2C19</i>	n	frecuencia (95% CI)	n	frecuencia (95% CI)	
*1	345	0.913 (0.885-0.941)	322	0.88 (0.847-0.913)	
*2	33	0.087 (0.059-0.115)	43	0.117 (0.084-0.15)	
*3	0	0.0	0	0.0	
*4	0	0.0	1	0.003 (0.002-0.009)	
*5	0	0.0	0	0.0	
*6	0	0.0	0	0.0	
*8	0	0.0	0	0.0	NS
Genotipos <i>CYP2C19</i>					
*1/*1	158	0.836 (0.783-0.889)	141	0.77 (0.71-0.831)	
*1/*2	29	0.153 (0.102-0.204)	39	0.213 (0.154-0.272)	
*1/*4	0	0.0	1	0.005 (0.005-0.015)	
*2/*2	2	0.011 (0.004-0.03)	2	0.011 (0.004-0.03)	NS

^a: Chi cuadrada para las diferencias entre mestizos colombianos y caucásicos españoles. NS: no significativo. 95% CI: intervalo de confianza del 95%.

Resultados

Los DNA genómicos de 189 colombianos y de 183 españoles fueron sometidos a tipificación del gen *CYP2C19*. Se investigaron las mutaciones *2, *3, *4, *5, *6 y *8, las cuales están relacionadas con actividad deficiente de la enzima. Entre los colombianos genotipificados se encontraron 158 portadores de los dos alelos nativos (genotipo *1/*1, 83.6%), que corresponderían al fenotipo EM, 29 individuos heterocigotos para un alelo no funcional (genotipo *1/*2, 15.3%) que corresponderían al fenotipo IM, y dos personas portadoras de los dos alelos no funcionales (genotipo *2/*2, 1.1%) pertenecientes al fenotipo PM. Entre los españoles se encontraron 141 portadores de los dos alelos nativos (genotipo *1/*1, 77%), que corresponderían al fenotipo EM, 40 individuos heterocigotos para un alelo no funcional (genotipos *1/*2 y *1/*4, 21.8%) que corresponderían al fenotipo IM, y dos personas homocigotos *2/*2 (1.1%) pertenecientes al fenotipo PM. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos *CYP2C19* de los dos grupos analizados (tabla 3). El equilibrio de Hardy-Weinberg se confirmó para la distribución genotípica tanto de los mestizos colombianos (Chi=0.26; df=2; p=0.88) como de los

caucásicos españoles (Chi=0.15; df=3; p=0.98).

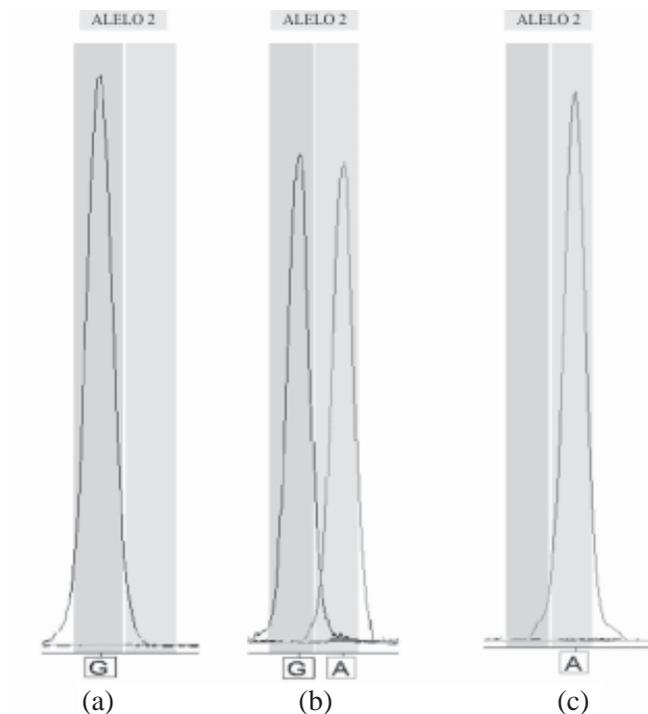
Tanto en españoles como en colombianos la variante mutada *2 fue la más prevalente (figura 1); sólo en un individuo español se encontró el alelo *4, y los alelos *3, *5, *6 y *8 no se hallaron en ninguno de los dos grupos. Tampoco existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas de los dos grupos étnicos comparados (tabla 3).

Discusión

El polimorfismo de los genes que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos es la causa principal de la variabilidad interindividual e interétnica de la respuesta a los medicamentos (21). El control genético de la actividad de la enzima *CYP2C19* explica que en cualquier población los individuos se pueden categorizar como metabolizadores rápidos, intermedios o lentos de los fármacos que son sustratos de dicha enzima. Este estudio es el primero en caracterizar y comparar los genotipos *CYP2C19* de una muestra de población caucásica española con otra mestiza colombiana, cuyo antecedente genético comprende la mezcla triétnica de amerindio, negro africano y caucásico español.

Para el grupo europeo, los resultados de este estudio están cercanos al rango de la prevalencia de PM del 2

Figura 1. Electroferogramas correspondientes a los genotipos *1/*1 (a), *1/*2 (b) y *2/*2 (c).



al 5% reportada entre caucásicos, con el alelo *2 como responsable de la mayoría de los individuos metabolizadores intermedios y lentos; de igual modo, las variantes no encontradas por nosotros (*3, *5, *6 y *8) son raras también entre caucásicos europeos (7). El perfil genético hallado en los mestizos colombianos se parece más al de los caucásicos españoles de nuestro estudio que al de otros grupos étnicos reportados, incluyendo al negro africano, con quien también el mestizo está emparentado genéticamente (7, 8, 11). Tales similitudes permiten suponer que también sean muy semejantes las respuestas farmacogenéticas de

los dos grupos étnicos comparados, al menos en lo que tiene que ver con el metabolismo de los medicamentos sustratos de la enzima CYP2C19.

Finalmente, hacemos énfasis en que para la caracterización genética de esta investigación hemos aplicado la técnica de miniselección Multiplex SNaPshot, la cual no había sido usada en estudios del gen *CYP2C19*, y que dicha estrategia puede resultar más segura y costo-efectiva que las técnicas convencionales basadas en PCR alelo-específica o en RFLP (restriction fragment length polymorphism).

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el Centro de Investigación Biomédica EuroEspes, La Coruña (España) y por el Centro de Investigaciones y Extensión de la Universidad Tecnológica de Pereira (Colombia).

Referencias bibliográficas

1. Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:269-96.
2. Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41(12):913-58.
3. Leon J, Armstrong SC, Cozza KL. Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19. *Psychosomatics* 2006; 47(1):75-85.
4. Brøsen K. Some aspects of genetic polymorphism in the biotransformation of antidepressants. *Therapie* 2004; 59(1):5-12.
5. Cho JY, Yu KS, Jang IJ, Yang BH, Shin SG, Yim DS. Omeprazole hydroxylation is inhibited by a single dose of moclobemide in homozygotic EM genotype for CYP2C19. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 53(4):393-7.
6. Brøsen K, de Morais SMF, Meyer UA, Goldstein JA. A multifamily study on the relationship between *CYP2C19* genotype and S-mephenytoin oxidation phenotype. *Pharmacogenetics* 1995; 5:312-7.
7. Garcia-Barceló M, Chow LY, Chiu HFK, Wing YK, Lee DTS, Lam KL, *et al.* Frequencies of defective *CYP2C19* alleles in a Hong Kong Chinese population: detection of the rare allele *CYP2C19*4*. *Clin Chem* 1999; 45(12):2273-4.
8. Ibeanu GC, Blaisdell J, Ferguson RJ, Ghanayem BI, Brosen K, Benhamou S, *et al.* A novel transversion in the intron 5 donor splice junction of *CYP2C19* and a sequence polymorphism in exon 3 contribute to the poor metabolizer phenotype for the anticonvulsant drug S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290:635-40.
9. Ferguson RJ, de Morais S, Benhamou S, Bouchardy C, Blaisdell J, Ibeanu G, *et al.* A new genetic defect in human *CYP2C19*: mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284:356-61.
10. Ibeanu GC, Goldstein JA, Meyer URS, Benhamou S, Bouchardy C, Dayer P, *et al.* Identification of new human *CYP2C19* alleles (*CYP2C19*6* and *CYP2C19*2B*) in a Caucasian poor metabolizer of mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 288:1490-5.

11. Xie HG, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR, Wood AJ. Genetic polymorphism of (S)-mephenytoin 4'-hydroxylation in populations of African descent. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48(3):402-8.
12. Blaisdell J, Mohrenweiser H, Jackson J, Ferguson S, Coulter S, Chanas B, *et al.* Identification and functional characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19. *Pharmacogenetics* 2002; 12(9):703-11.
13. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79(1):103-13.
14. Furuta T, Shirai N, Xiao F, Ohashi K, Ishizaki T. Effect of high-dose lansoprazole on intragastric pH in subjects who are homozygous extensive metabolizers of cytochrome P450C19. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70(5):484-92.
15. Kita T, Sakaeda T, Aoyama N, Sakai T, Kawahara Y, Kasuga M, *et al.* Optimal dose of omeprazole for CYP2C19 extensive metabolizers in anti-Helicobacter pylori therapy: pharmacokinetic considerations. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(7):923-7.
16. Gonzalez HM, Romero EM, Peregrina AA, de J Chavez T, Escobar-Islas E, Lozano F, *et al.* CYP2C19- and CYP3A4-dependent omeprazole metabolism in West Mexicans. *J Clin Pharmacol* 2003; 43(11):1211-5.
17. Reviriego J, Bertilsson L, Carrillo JA, Llerena A, Valdivielso MJ, Benitez J. Frequency of S-mephenytoin hydroxylation deficiency in 373 Spanish subjects compared to other Caucasian populations. *Eur J Clin Pharmacol* 1993; 44(6):593-5 (Abstract).
18. Hiratsuka M, Sasaki T and Mizugaki M. Genetic testing for pharmacogenetics and its clinical application in drug therapy. *Clinica Chimica Acta* 2006; 363:177-86.
19. Morita J, Kobayashi K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Ishizaki T, Chiba K. A novel single nucleotide polymorphism (SNP) of the CYP2C19 gene in a Japanese subject with lowered capacity of mephobarbital 4'-hydroxylation. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004; 19(3):236-8.
20. Bernat M, Titos E, Clària J. Rapid identification of single nucleotide polymorphisms by fluorescence-based capillary electrophoresis. *Genet Mol Res* 2002; 1(1):72-8.
21. Relling MV, Giacomini KM. Pharmacogenetics. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (editors). *Goodman and Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics*; 11 ed McGraw Hill; 2006.

