

# Antropologia Portuguesa

16-17 · 1999-2000

Departamento de Antropologia | Universidade de Coimbra

# ***Genética populacional de três polimorfismos intragénicos do gene da doença de Machado-Joseph (MJD1) na Região Centro de Portugal e nos Açores***

**Licínio Manco, Ana Lúsa Oliveira, Augusto Abade**

Departamento de Antropologia

Universidade de Coimbra

3000-056 Coimbra, Portugal

lmanco@ci.uc.pt

## **Resumo**

Neste trabalho procedemos ao estudo de três polimorfismos intragénicos do gene da doença de Machado-Joseph (669A/G; 987C/G e 1118A/C) em duas amostras populacionais de indivíduos saudáveis não aparentados e não pertencentes a famílias MJD, das regiões Centro de Portugal e Açores. As frequências alélicas encontradas não diferem das publicadas para outras populações de origem Europeia. Foram encontrados os haplótipos comuns G-G-C e A-C-A, com frequências de 82% e 15,6%, respectivamente, na região Centro de Portugal e 80% e 18,9%, respectivamente, nos Açores, indicando serem estes os haplótipos originais do gene *MJD1*. Considerando estudos haplotípicos semelhantes em famílias MJD, os resultados sugerem uma origem antiga e única da mutação MJD no haplótipo original menos comum A-C-A, numa época provavelmente anterior à separação dos grupos étnicos asiático e europeu. A associação do haplótipo G-G-C à mutação MJD, comum em famílias Portuguesas, terá tido uma origem bem mais recente, possivelmente por um mecanismo de conversão génica ou recombinação entre dois genes homólogos, que transferiu a mutação original do haplótipo A-C-A para o haplótipo comum G-G-C.

## **Palavras-chave**

Doença de Machado-Joseph, MJD, gene *MJD1*, haplótipos, polimorfismos, Portugal

## **Abstract**

In this work we have studied three intragenic polymorphisms (669A/G; 987C/G and 1118A/C) in the Machado-Joseph disease gene in normal population samples

of unrelated individuals with no known relationships to MJD families, from Central Portugal and Azores Islands. The allele frequencies are similar to those found in other European populations. The haplotypic analysis showed two common haplotypes, G-G-C and A-C-A, with 82% and 15,6%, respectively, in Central Portugal and 80% and 18,9%, respectively, in Azores, demonstrating these to be the original haplotypes in the *MJD1* gene. Considering previous similar haplotypic studies with MJD families, the results suggest a single and old MJD mutation in the less common original haplotype A-C-A, that occurred probably before the separation of European and Asian ethnic groups. The linkage of the G-G-C haplotype to the MJD mutation, commonly present in the Portuguese population, cannot be very old and probably occurred as the result of a gene conversion or recombination event that transferred the original mutation from the A-C-A haplotype to the common G-G-C haplotype.

#### Key words

Machado-Joseph disease, MJD, *MJD1* gene, haplotype analysis, polymorphisms, Portugal

## Introdução

A doença de Machado-Joseph (MJD) é uma doença neurodegenerativa de início tardio, com transmissão autossómica dominante, e caracterizada clinicamente por ataxia cerebelosa, oftalmoplegia externa progressiva e sinais piramidais a que se podem adicionar outros sintomas (Coutinho e Andrade, 1978).

As primeiras descrições da MJD foram feitas em famílias originárias dos Açores (Nakano *et al.*, 1972; Woods e Schaumburg, 1972; Rosenberg *et al.*, 1976). A doença foi mais tarde identificada no continente Português (Lima e Coutinho, 1980) e noutras famílias de diferentes origens étnicas (Healton *et al.*, 1979; Sequeiros e Coutinho, 1993), sendo hoje considerada a ataxia dominante mais comum em todo o mundo (Silveira *et al.*, 1996).

A alteração génica responsável pela doença consiste numa expansão do triplete CAG na região codificante do gene *MJD1* (Kawaguchi *et al.*, 1994), localizado no cromossoma 14q32.1 (Takiyama *et al.*, 1993). Nos indivíduos normais, a sequência repetitiva apresenta 12 a 41 unidades CAG e nos cromossomas expandidos 61 a 86 repetições do triplete

(Kawaguchi *et al.*, 1994; Maciel *et al.*, 1995, 1999; Maruyama *et al.*, 1995). A proteína ataxina-3 é o produto génico responsável pelo processo de degenerescência neuronal, mas cuja função permanece desconhecida.

A prevalência da doença nos Açores continua a ser maior do que em qualquer outra parte do mundo, particularmente na ilha das Flores, onde 1 em cada 103 habitantes é doente, 1 em cada 34 é portador do gene mutado e 1 em cada 21 está em risco para a doença (Lima *et al.*, 1998).

A origem da mutação MJD nas diversas populações tem vindo a ser discutida nos anos mais recentes (Stevanin *et al.*, 1995, 1997; Gaspar *et al.*, 2001). Nos Açores, a doença distribui-se fundamentalmente por duas ilhas, Flores e S. Miguel, tendo sido sugerido que o gene mutante terá sido levado do continente para os Açores durante o seu período de povoamento (Sequeiros e Coutinho, 1993). A distribuição geográfica e reconstrução genealógica das famílias afectadas com MJD mostrou que houve a introdução de dois efeitos fundadores no arquipélago dos Açores, um nas Flores e outro em São Miguel (Lima *et al.*, 1998).

O estudo de haplótipos construídos com marcadores moleculares próximos do *locus* da MJD e com polimorfismos intragénicos do gene *MJD1*, demonstrou a presença em Portugal Continental de dois haplótipos em famílias afectadas com MJD e de apenas um haplótipo na maioria das famílias MJD de origem não Portuguesa distribuídas pelo mundo (Gaspar *et al.*, 2001). Nas famílias MJD Açorianas, os dois haplótipos encontram-se distribuídos especificamente pelas ilhas de S. Miguel e Flores (Gaspar *et al.*, 2001), vindo a confirmar a presença dos dois efeitos fundadores no arquipélago dos Açores como havia sido previamente sugerido pelos dados genealógicos (Lima *et al.*, 1998).

O estudos moleculares não permitiram todavia ainda esclarecer se ocorreram eventos mutacionais independentes em cada um dos países onde foram encontradas famílias com MJD ou se terá havido uma origem única da mutação, após o que se terão originado haplótipos diferentes a partir de um haplótipo original.

Neste trabalho procedemos ao estudo de três polimorfismos intragénicos descritos no gene *MJD1* [669A/G (212Met/Val) (Goto *et al.*, 1997); 987C/G (318Arg/Gly) (Kawaguchi *et al.*, 1994); e 1118A/C (Stop/Tyr) (Goto *et al.*, 1997; Stevanin *et al.*, 1997)], em duas amostras populacionais de indivíduos saudáveis não aparentados e não pertencentes a famílias MJD, das regiões Centro de Portugal e Açores, tendo em vista

contribuir para o esclarecimento da origem da mutação. Foram estimadas as frequências alélicas, feita a análise de haplótipos e comparados os resultados com os dados publicados para outras populações.

## Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de sangue total de indivíduos saudáveis não aparentados e não pertencentes a famílias MJD, naturais da região Centro de Portugal (N=85) e dos Açores (ilhas Terceira, São Jorge e Faial) (N=45). O DNA genómico foi extraído a partir dos leucócitos utilizando os métodos de extracção com fenol-clorofórmio (Sykes, 1983) ou *salting-out* (Miller *et al.*, 1988).

O polimorfismo 669A/G foi estudado por PCR, utilizando os *primers* MJDIVSR e MJD734R (Maciel *et al.*, 1999). Os fragmentos amplificados foram submetidos a análise por *Single Strand Conformational Polymorphism* (SSCP), num mini-gel vertical de poliacrilamida (7.2 x 10.2 cm) com 10% acrilamida-bisacrilamida (C=1.3%), 10% glicerol e 50 mM TBE, pH 8,3 e coloração por nitrato de prata segundo Bloom *et al.* (1987).

O marcador 987C/G foi estudado após amplificação por PCR com os *primers* MJD52 e MJD70 (Kawaguchi *et al.*, 1994). Os produtos amplificados foram digeridos com *MspA1* I e os fragmentos submetidos a electroforese horizontal em gel de poliacrilamida 10% (Luís e Caeiro, 1995) e coloração por nitrato de prata segundo Budowle *et al.* (1991).

A substituição nucleotídica 1118A/C foi estudada por PCR diferencial, utilizando o oligonucleótido directo MJD52 (Kawaguchi *et al.*, 1994) e os *primers* reversos MJD-TAA e MJD-TAC (Stevanin *et al.*, 1997) específicos para cada um dos alelos A e C, respectivamente. Os produtos de PCR foram submetidos a electroforese em agarose (2%) com brometo de etídio e analisados à luz ultravioleta.

A análise do desequilíbrio gamético entre pares de marcadores (polimorfismos 669A/G-987C/G; 669A/G-1118A/C e 987C/G-1118A/C) foi efectuada apenas com os genótipos em que foi possível determinar a fase. Os haplótipos entre os três polimorfismos (669A/G - 987C/G - 1118A/C) foram estabelecidos tendo em conta a existência de desequilíbrio gamético entre os pares de marcadores.

As frequências alélicas foram estimadas por contagem directa. O cálculo das frequências haplotípicas, do desequilíbrio gamético, dos valores esperados de heterozigotia, do equilíbrio de Hardy-Weinberg e outros valores estatísticos foi efectuado recorrendo ao *software Arlequin* versão 2.000 (Schneider *et al.*, 2000).

## Resultados e Discussão

### Frequências alélicas

Os valores das frequências alélicas para os três polimorfismos, nas populações da região Centro de Portugal e dos Açores são apresentados na tabela 1. Os valores observados em todos os marcadores estão de acordo com o formalismo de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 1.** Frequências alélicas e outros parâmetros estatísticos dos três polimorfismos intragénicos do gene *MJD1* estudados em amostras aleatórias de indivíduos saudáveis, não aparentados e não pertencentes a famílias MJD, da região Centro de Portugal e dos Açores.

Polimorfismos	Alelos	Frequências alélicas	
		Centro de Portugal	Açores
669A/G		N = 77	N = 45
	669A	0,201	0,178
	669G	0,799	0,822
		$P = 1,000$	$P = 0,3165$ (dp=0,001)
Heterozigotia		$0,3237 \pm 0,0387$	$0,2956 \pm 0,0521$
987C/G		N = 85	N = 45
	987C	0,159	0,189
	987G	0,842	0,811
		$P = 0,2085$ (dp=0,001)	$P = 1,000$
Heterozigotia		$0,2688 \pm 0,0383$	$0,3099 \pm 0,0516$
1118A/C		N = 85	N = 45
	1118A	0,181	0,200
	1118C	0,819	0,800
		$P = 0,2723$ (dp=0,001)	$P = 0,6645$ (dp=0,001)
Heterozigotia		$0,2987 \pm 0,0389$	$0,3236 \pm 0,0508$

Na população da região Centro de Portugal os marcadores polimórficos apresentam frequências de 80%, 85% e 82% para os alelos mais comuns 669G, 987G e 1118C, respectivamente. Nos Açores, a frequência obtida para os alelos mais comuns 669G, 987G e 1118C, foi de 82%, 81% e 80%, respectivamente.

O teste exacto baseado nas frequências alélicas, não mostrou diferenças significativas entre os dois grupos populacionais para nenhum dos marcadores estudados, pelo que podemos considerar ambas as populações como semelhantes em termos de distribuição alélica dos polimorfismos do gene *MJD1* ( $P = 0,58 \pm 0,01$  para o polimorfismo 669A/G;  $P = 0,38 \pm 0,02$  para o polimorfismo 987C/G;  $P = 0,56 \pm 0,01$  para o polimorfismo 1118A/C).

Os valores de frequências alélicas obtidos são semelhantes às frequências descritas por Maciel *et al.* (1999) para os polimorfismos 987C/G e 1118A/C numa população controlo Açoriana, mas significativamente diferentes ( $P = 0,047$ ) dos valores obtidos para o polimorfismo 669A/G, no qual o alelo G registou uma frequência de 92% (Maciel *et al.*, 1999). Os valores obtidos para os polimorfismos 987C/G e 1118A/C são também da mesma ordem de grandeza dos valores obtidos por diversos autores noutras populações Europeias (Igarashi *et al.*, 1996; Stevanin *et al.*, 1997).

### Análise de Haplótipos

As duas amostras populacionais foram testadas em conjunto para a existência de desequilíbrio gamético entre polimorfismos. Para todos os pares de marcadores foram registados valores de  $P$  abaixo do nível de significância ( $P < 0,05$ ) o que traduz a presença de desequilíbrio gamético entre alelos. Para o par de polimorfismos 669A/G e 987C/G, foram observados 3 haplótipos: o haplótipo mais comum 669G-987G com uma frequência de 95,1%, seguindo-se o haplótipo complementar 669A-987C (3,7%) e o haplótipo 669A-987G (1,2%) ( $\chi^2 = 42,48$ ;  $P = 0,000$ ; 1 g.l.). No par polimórfico 669A/G e 1118A/C foram observados os 4 haplótipos possíveis: o haplótipo mais comum 669G-1118C (92,1%), o seu complementar 669A-1118A (4,9%) e dois haplótipos novos 669G-1118A (0,6%) e 669A-1118C (2,4%) ( $\chi^2 = 42,43$ ;  $P = 0,000$ ; 1 g.l.). A análise do par polimórfico 987C/G e 1118A/C, registou o haplótipo comum 987G-

1118C (93,7%), o seu complementar 987C-1118A (5,7%) e o haplótipo novo 987G-1118A (0,6%) ( $\chi^2 = 70,08$ ;  $P = 0,000$ ; 1 g.l.).

Considerando os três polimorfismos em conjunto (669A/G - 987C/G - 1118A/C), foram encontrados 4 haplótipos diferentes na região Centro de Portugal e 3 nos Açores. O haplótipo mais comum 669G-987G-1118C (G-G-C) apresenta frequências de 82% e 80% na Região Centro e nos Açores, respectivamente. Segue-se o seu haplótipo complementar 669A-987C-1118A (A-C-A), com frequências de 15,6% e 18,9% na região Centro e nos Açores, respectivamente. Na região Centro, foram ainda encontrados os haplótipos 669A-987G-1118C (A-G-C) e 669G-987C-1118A (G-C-A) com frequências de 1,6% e 0,8%, respectivamente. Nos Açores foi também encontrado o haplótipo 669G-987G-1118A (G-G-A), com uma frequência de 1,1%.

Estes dados diferem de algum modo dos resultados obtidos por Gaspar *et al.* (2001) que encontrou numa população controlo de origem étnica diversa, os 8 haplótipos possíveis para os três locais polimórficos. Destes, o haplótipo G-G-C registou a maior frequência (38%), mas o seu haplótipo complementar A-C-A registou apenas uma frequência de 2%, inferior à frequência obtida para todos os restantes haplótipos raros (Gaspar *et al.*, 2001). Os nossos resultados apontam como haplótipos originais, os haplótipos comuns complementares G-G-C e A-C-A, a partir dos quais todos os outros haplótipos raros se deverão ter originado por recombinação.

Nas famílias com MJD distribuídas pelo mundo, de origem não Portuguesa ou naturais de países não ligados a Portugal, a mutação causadora da doença foi encontrada associada ao haplótipo A-C-A em 87,30% dos genes expandidos (Gaspar *et al.*, 2001). As exceções, mostraram ligações ao haplótipo G-G-C em 6,35% dos genes mutados no Japão e nos Estados Unidos, ao haplótipo A-G-A em 4,76% dos genes mutados nos Estados Unidos e Marrocos e ao haplótipo G-G-A em 1,59% dos genes mutados na Guiana Francesa (Gaspar *et al.*, 2001). Nas famílias com MJD de Portugal continental, os haplótipos A-C-A e G-G-C associados a genes mutados registam frequências de cerca de 50% cada (Gaspar *et al.*, 2001). Por outro lado, na população Açoriana com MJD foram encontrados os haplótipos A-C-A, exclusivo na ilha das Flores, e o haplótipo G-G-C, predominante em S. Miguel, o que sugere duas introduções da mutação no arquipélago, distribuindo-se os dois haplótipos por duas

regiões geograficamente distintas por acção de um efeito fundador (Gaspar *et al.*, 2001).

Esta associação da mutação MJD ao haplótipo original menos comum A-C-A em populações não Portuguesas espalhadas por diversos países da Europa, Ásia e América (Gaspar *et al.*, 2001), aponta para uma origem antiga e única da mutação neste haplótipo, provavelmente numa época anterior à separação dos grupos étnicos asiático e europeu. A associação do haplótipo G-G-C à mutação MJD, característica das famílias Portuguesas, terá uma origem bem mais recente, possivelmente por um mecanismo de recombinação ou conversão génica entre genes homólogos (Richard e Pâques, 2000), envolvendo um gene mutado A-C-A e um gene normal comum G-G-C. Os dois haplótipos associados à mutação terão sido introduzidos no arquipélago dos Açores e, por acção de um efeito fundador em ilhas diferentes, originaram a distribuição dos haplótipos associados à MJD que se verifica actualmente.

## Agradecimentos

Este trabalho foi em parte subsidiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, através do projecto PRAXIS/PSAU/C/SAU/25/96.

## Bibliografia

- Bloom, H.; Beier, H.; Gross, H. S. 1987. Improved silver-staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8:93-99.
- Budowle, B.; Chakraborty, R.; Giusti, A. M.; Eisenberg, A. J.; Allen, R. C. 1991. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *American Journal of Human Genetics*, 48:137-144.
- Coutinho, P.; Andrade, C. 1978. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* 28:703-709.
- Gaspar, C.; Lopes-Cendes, I.; Hayes, S.; Goto, J.; Arvidsson, K.; Dias, A.; Silveira, I.; Maciel, P.; Coutinho, P.; Lima, M. *et al.* 2001. Ancestral origins

- of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *American Journal of Human Genetics*, 68:523-528.
- Goto, J.; Watanabe, M.; Ichikawa, Y.; Yee, S. B.; Ihara, N.; Endo, K.; Igarashi, S.; Takiyama, Y.; Gaspar, C.; Maciel, P.; Tsuji, S.; Rouleau, G. A.; Kanazawa, I. 1997. Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neuroscience Research*, 28:373-377.
- Healton, E. B.; Brust, J. C. M.; Kerr, D. L.; Resor, S.; Penn, A. 1979. Familial cerebellar ataxia, dystonia and abnormal eye movements in a non-Portuguese family. *Neurology*, 29:559-560.
- Igarashi, S.; Takiyama, Y.; Cancel, G.; Rogaeva, E. A.; Sasaki, H.; Wakisaka, A.; Zhou, Y.X.; Takano, H.; Endo, K.; Sanpei, K. *et al.* 1996. Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Human Molecular Genetics*, 5:923-932.
- Kawaguchi, Y.; Okamoto, T.; Taniwaki, M.; Aizawa, M.; Inoue, M.; Katayama, S.; Kawakami, H.; Nakamura, S.; Nishimura, M.; Akiguchi, I. *et al.* 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genetics*, 8:221-228.
- Lima, L.; Coutinho, P. 1980. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. *Neurology*, 30:319-322.
- Lima, M.; Mayer, F.; Coutinho, P.; Abade, A. 1998. Origins of a mutation: Population genetics of Machado-Joseph Disease in the Azores (Portugal). *Human Biology*, 6:1011-1023.
- Luís, J.R.; Caeiro, B. 1995. Application of two STRs (VWA and TPO) to Human Population Profiling: Survey in Galicia. *Human Biology*, 67:789-795.
- Maciel, P.; Gaspar, C.; DeStefano, A. L.; Silveira, I.; Coutinho, P.; Radvany, J.; Dawson, D. M.; Sudarsky, L.; Guimarães, J.; Loureiro, J. E. *et al.* 1995. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *American Journal of Human Genetics*, 57:54-61.
- Maciel, P.; Gaspar, C.; Guimarães, L.; Goto, J.; Lopes-Cendes, I.; Hayes, S.; Arvidsson, K.; Dias, A.; Sequeiros, J.; Sousa, A.; Rouleau, G.A. 1999. Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)<sub>n</sub> tract. *European Journal of Human Genetics*, 7:147-156.
- Maruyama, H.; Nakamura, S.; Matsuyama, Z.; Sakai, T.; Doyu, M.; Sobue, G.; Seto, M.; Tsujihata, M.; Oh-i, T.; Nishio, T. *et al.* 1995. Molecular features

- of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Human Molecular Genetics*, 4:807-812.
- Miller, S. A.; Dykes, D. D.; Polesky, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16:1215.
- Nakano, K. K.; Dawson, D. M.; Spence, A. 1972. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22:49-55.
- Richard, G-F; Pâques, F. 2000. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Reports*, 1:122-126.
- Rosenberg, R. N.; Nyhan, W. L.; Bay, C.; Shore, P. 1976. Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology*, 26:703-714.
- Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. 2000. *Arlequin: A software for population genetics data analysis*. Ver 2.000. Genetics and Biometry Laboratory. Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Sequeiros, J.; Coutinho, P. 1993. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Advances in Neurology*, 61:139-153.
- Silveira, I.; Lopes-Cendes, I.; Kish, S.; Maciel, P.; Gaspar, C.; Coutinho, P.; Botez M. I.; Teive, H.; Arruda, W.; Steiner, C. E. *et al.* 1996. Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy, and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology*, 46:214-218.
- Sykes, B. C. 1983. DNA in heritable disease. *The Lancet*, 2:787-788.
- Stevanin, G.; Cancel, G.; Didierjean, O.; Durr, A.; Abbas, N.; Cassa, E.; Feingold, J.; Agid, Y.; Brice, A. 1995. Linkage disequilibrium at the Machado-Joseph disease/spinal cerebellar ataxia 3 locus: evidence for a common founder effect in French and Portuguese-Brazilian families as well as a second ancestral Portuguese-Azorean mutation. *American Journal of Human Genetics*, 57:1247-1250.
- Stevanin, G.; Lebre, A. S.; Mathieux, C.; Cancel, G.; Abbas, N.; Didierjean, O.; Durr, A.; Trottier, Y.; Agid, Y.; Brice, A. 1997. Linkage disequilibrium between the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease mutation and two intragenic polymorphisms, one of which, X359Y, affects the stop codon. *American Journal of Human Genetics*, 60:1548-1552.
- Takiyama, Y.; Nishizawa, M.; Tanaka, H.; Kawashima, S.; Sakamoto, H.; Karube, Y.; Shimazaki, H.; Soutome, M.; Endo, K.; Ohta, S. *et al.* 1993. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genetics*, 4:300-304.

Woods, B. T.; Schaumburg, H. H. 1972. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia: a unique and partially treatable clinico-pathological entity. *Journal of the Neurological Sciences*, 17:149-166.