

Premio Estímulo - Primer premio

Clonación y multiplicación del genoma espermático aplicado en reconstrucción de embriones

Gabriel Vichera,¹ Ramiro Olivera,¹ Pablo Sipowicz,² Martín Radrizzani,² Daniel Salamone¹

¹ Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

² Laboratorio de Neuro y Citogenética Molecular, Universidad de San Martín. Buenos Aires, Argentina.

Versión completa de éste trabajo publicada en la revista *Reproduction Fertility and Development* (Volumen 23 Issue 6, 2011).

Reproducción 2011;26:11-17

Resumen

La producción de embriones androgenéticos haploides permite obtener múltiples copias idénticas de un único genoma espermático a partir de sus sucesivas divisiones celulares. En este trabajo comparamos la capacidad de desarrollo de embriones androgenéticos haploides bovinos, construidos por diferentes métodos, incluyendo fertilización in-vitro (FIV) previa y posteriormente a la enucleación, e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) previa y posteriormente a la enucleación. En todos los tratamientos utilizamos espermatozoides previamente incubados, o no, con un gen reportero (pCX-EGFP) que nos permitió verificar la expresión del genoma espermático. Las tasas de clivaje de los embriones androgenéticos generados por ICSI previa o posterior a la enucleación fueron 80.0% y 53.1% respectivamente. Las tasas de clivaje de los embriones androgenéticos generados por FIV previa o posterior a la enucleación fueron 55.2% y 55.7% respectivamente; ($P < 0.05$). Una vez obtenidos los embriones haploides androgenéticos, sus blastómeras fueron utilizadas como donantes de genoma masculino para reconstruir embriones biparentales mediante la fusión con ovocitos maduros. La haploidía de las blastómeras androgenéticas fue confirmada mediante el análisis de su cariotipo. Con el fin de verificar la contribución citoplasmática de las blastómeras androgenéticas haploides en los embriones reconstruidos, blastómeras androgenéticas que expresaron

la proteína fluorescente EGFP fueron fusionadas con ovocitos maduros. Las tasas de desarrollo de los embriones reconstruidos alcanzaron 85.1% de clivaje, 9% de blastocistos ($n=84$) y todos los embriones expresaron el gen reportero durante el desarrollo in-vitro (100%, 57/57). Para confirmar la incorporación del genoma espermático replicado, fueron utilizadas blastómeras haploides androgenéticas de embriones generados con espermatozoides sexados "Y" para reconstruir embriones biparentales. La incorporación del cromosoma "Y" fue confirmada por análisis de PCR y de hibridación fluorescente in situ (FISH). Adicionalmente, se realizó un análisis de inmunohistoquímica para determinar el patrón de expresión de Oct-4 (gen marcador de pluripotencialidad celular) en los embriones reconstruidos con núcleos espermáticos replicados. En conclusión, hemos demostrado que es posible replicar genomas espermáticos haploides a partir de un único espermatozoide y que estas réplicas pueden ser utilizadas para generar embriones biparentales con una nueva combinación de características genéticas, a partir de ambos progenitores, y de forma similar a una fertilización normal. La clonación del genoma espermático posee un enorme potencial para la producción agropecuaria debido a que permite determinar el sexo de los núcleos espermáticos replicados y ciertos atributos favorables, previamente a ser utilizados en la reconstrucción de embriones biparentales. Por otro lado la posibilidad de obtener múltiples copias idénticas del genoma de un espermatozoide podría, en un futuro, proporcionar una alternativa para obtener un mayor número de embri-

Correspondencia: Gabriel Vichera
E-mail: igvichera@gmail.com

nes, aumentando de esta forma las posibilidades de concebir en parejas con patologías como la oligospermia severa. En resumen, nuestros resultados demuestran que es posible multiplicar genomas espermáticos haploides a partir de un único espermatozoide y que estas réplicas pueden ser utilizadas para generar embriones biparentales con capacidad de desarrollo.

Palabras claves. *clonación, genoma espermático, reconstrucción de embriones.*

Introducción

Los embriones androgenéticos y partenogénéticos son modelos eficientes para el estudio del *imprinting genómico*.¹⁻³ En particular, los embriones androgenéticos son muy útiles para estudiar la contribución del genoma paterno en el desarrollo embrionario temprano. Diferentes métodos han sido utilizados para la producción de embriones androgenéticos incluyendo: 1) remoción del pronúcleo femenino de cigotos.⁴⁻⁹ 2) fertilización de ovocitos enucleados⁴⁻⁹ e 3) inyección de espermatozoides dentro de ovocitos, seguida de remoción de cromosomas maternos.³ Estos métodos han sido exitosamente aplicados en el ratón y escasamente estudiados en animales de granja.¹⁰⁻¹²

La generación de embriones haploides androgenéticos permite obtener múltiples blastómeras idénticas a partir de un único genoma espermático.¹³ Algunas de estas blastómeras haploides pueden ser evaluadas mediante análisis genético, y las remanentes pueden ser utilizadas para la reconstrucción de embriones biparentales capaces de desarrollar a término. Nosotros proponemos la replicación del genoma espermático para ser utilizado en producción agropecuaria debido a que permite, mediante la utilización de marcadores moleculares, la selección de ciertos atributos favorables previamente a ser utilizados en la reconstrucción de embriones biparentales.

En este trabajo, comparamos la capacidad de desarrollo de embriones androgenéticos bovinos construidos por diferentes métodos, incluyendo FIV previa y posteriormente a la enucleación de los ovocitos e ICSI previa y posteriormente a la enucleación de los ovocitos. Para todos los tratamientos, utilizamos tanto espermatozoides previamente incubados, como no, con un gen repor-

tero (pCX-EGFP) que nos permitió verificar la expresión del genoma espermático. Una vez obtenidos estos embriones androgenéticos haploides, sus blastómeras fueron disgregadas e utilizadas como donantes de genoma masculino para reconstruir embriones biparentales por fusión con ovocitos maduros (MII). Previamente a la reconstrucción embrionaria, se determinó el sexo de los núcleos espermáticos replicados estableciendo así una nueva y ventajosa forma de seleccionar el sexo de los embriones resultantes.

Diseño experimental

En el primer y segundo experimento comparamos la capacidad de desarrollo y el patrón de expresión de la proteína reportera EGFP de los embriones bovinos androgenéticos haploides, producidos por FIV (Tabla 1) e ICSI (Tabla 2) en forma previa y posterior a la enucleación. Para todos los tratamientos se utilizaron espermatozoides previamente incubados, o no, con el plásmido pCX-EGFP (gen reportero que nos permitió verificar la expresión del genoma espermático). Con el objetivo de verificar la ploidía de los embriones androgenéticos generados, se realizaron análisis de cariotipos. En el tercer experimento, las blastómeras de estos embriones androgenéticos haploides (2-16 células) fueron utilizadas como donantes de genoma masculino para reconstruir embriones biparentales, al ser fusionadas con ovocitos en MII libres de zona pelucida (Tabla 3). Por otra parte, se ensayó un método alternativo zona pelucida-incluida que consistió en la fusión de blastómeras androgenéticas haploides previamente inyectadas en el espacio perivitelino de ovocitos en MII (Figura 1). Con el fin de verificar la contribución citoplasmática de las blastómeras androgenéticas haploides en los embriones reconstruidos, blastómeras androgenéticas que expresaron la proteína fluorescente EGFP fueron fusionadas con ovocitos maduros. Para confirmar la incorporación del genoma espermático replicado, fueron utilizadas blastómeras haploides androgenéticas de embriones generados con espermatozoides sexados "Y" para reconstruir embriones biparentales. La incorporación del cromosoma "Y" fue confirmada por análisis de PCR y de hibrida-

ción fluorescente *in situ* (FISH). Adicionalmente, se realizó un análisis de inmunohistoquímica para determinar el patrón de expresión de Oct-

4 (gen marcador de pluripotencialidad celular) en los embriones reconstruidos con núcleos espermáticos replicados.

Resultados

Tabla 1. Desarrollo de embriones androgenéticos haploides y expresión del gen reportero, luego de FIV con espermatozoides expuestos o no al plásmido pCX-EGFP en bovinos.

Producción de embriones androgenéticos haploides	Repeticiones	Espermatozoides expuestos a pCX-EGFP	n	Clivados (%)	Morulas (%)	Blastocistos (%)	Embriones +EGFP 4-16 cell (%)
FIV previo a la enucleación	3	+	67	22 (32.8) ^a	8 (11.9) ^{ab}	1 (1.5) ^a	0 (0)
	4	-	105	58 (55.2) ^b	23 (21.9) ^{ab}	7 (6.6) ^{ab}	NA
FIV posterior a la enucleación	3	+	61	26 (42.6) ^{ab}	7 (11.5) ^a	2 (3.3) ^{ab}	0 (0)
	4	-	106	59 (55.7) ^b	19 (17.9) ^{ab}	8 (7.5) ^{ab}	NA
FIV biparental control	4	+	280	230 (82.1) ^c	58 (20.7) ^{ab}	17 (6.1) ^a	0 (0)
	4	-	114	86 (75.4) ^c	28 (24.6) ^b	15 (13.1) ^b	NA

(a,b,c,d) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de Fisher). NA, no aplicable. +, positivo; -, negativo; EGFP, proteína verde fluorescente.

Tabla 2. Desarrollo de embriones androgenéticos haploides y expresión del gen reportero, luego de ICSI con espermatozoides expuestos o no al plásmido pCX-EGFP.

Producción de embriones androgenéticos haploides	Repeticiones	Espermatozoides expuestos a pCX-EGFP	n	Clivados (%)	Morulas (%)	Blastocistos (%)	Embriones +EGFP 2-16 cell (%)	Todas las células embrionarias +EGFP (%)
ICSI previa a la enucleación	4	+	116	71 (61.2) ^b	3 (2.6) ^a	0 (0) ^a	30 (25.8) ^b	3/30 (10.0)
	3	-	35	28 (80.0) ^c	5 (14.3) ^{bcd}	1 (2.8) ^{ab}	NA	NA
ICSI posterior a la enucleación	4	+	97	34 (35.0) ^a	1 (1.0) ^a	0 (0) ^a	4 (11.8) ^a	0/4 (0.0)
	3	-	32	17 (53.1) ^{ab}	0 (0) ^{ab}	0 (0) ^a	NA	NA
Control ICSI biparental	4	+	82	42 (51.2) ^b	9 (10.9) ^{bc}	8 (9.7) ^{bc}	18 (21.9) ^{ab}	1/18 (5.6)
	3	-	81	62 (76.6)	12 (14.8)	9 (11.1)	NA	NA

(a,b,c,d) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de Fisher). NA, no aplicable. +, positivo; -, negativo; EGFP, proteína verde fluorescente.

Tabla 3. Desarrollo *in-vitro* y expresión del gen reportero (+*egfp*) de embriones reconstituidos por fusión de blastómeras androgenéticas haploides y ovocitos en MII libres de zona pelúcida.

Método de producción	Repeticiones	Blastómeras androgenéticas +EGFP	n	Fusionados	Clivados (%)	Blastocistos (%)	Embriones +EGFP 2-16 cell (%)	Todas las células embrionarias +EGFP (%)
Embrión biparental reconstituido	3	+	84	67 (79.8) ^a	57 (85.1) ^a	6 (9.0) ^a	57 (100) ^a	52/57 (91.2)
	3	-	34	27 (79.4) ^a	24 (88.9) ^a	2 (5.9) ^a	NA	NA
FIV biparental control	3	-	124	NA	98 (79.0) ^a	37 (29.8) ^b	NA	NA

(a,b,c,d) Valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de Fisher). NA, no aplicable. +, positivo; -, negativo; EGFP, proteína verde fluorescente.

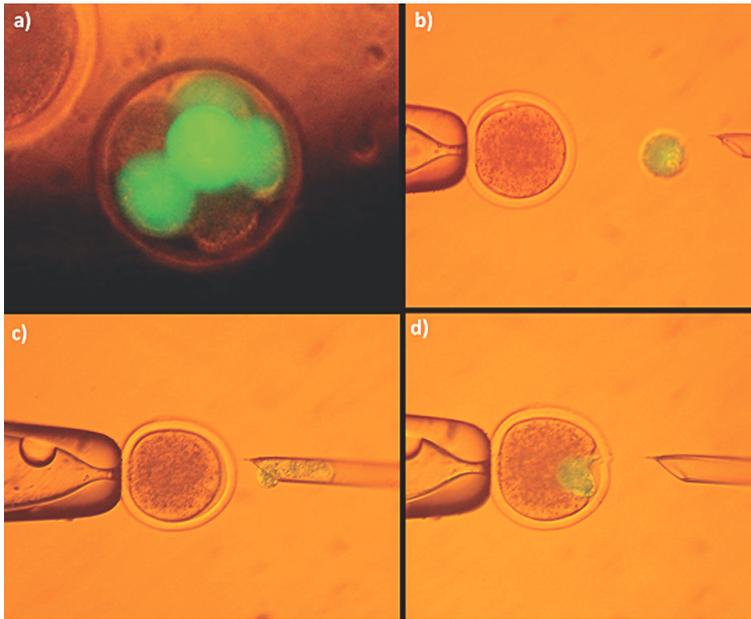


Figura 1. a) Embrión androgenético haploide bovino (día 3) obtenido por ICSI utilizando espermatozoides expuestos al plásmido pCX-EGFP (ICSI-Tr previa a la enucleación) y con algunas de sus blastómeras expresando el gen reportero. b y c) Blastómera androgenética haploide lista para ser inyectada en ovocito en MII. c) Blastómera androgenética haploide inyectada en el espacio perivitelino de un ovocito en MII listos para ser electrofusinados. (Magnificación original 200X).

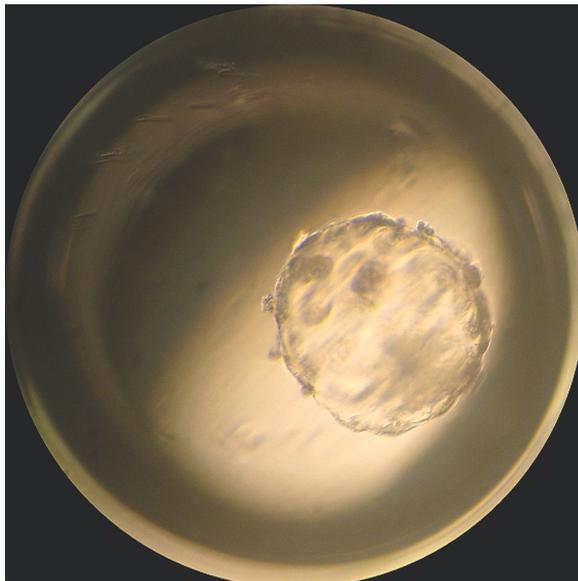


Figura 2. a) Blastocisto bovino biparental producidos por fusión de una blastómera androgenética haploide con un ovocito maduro libre de zona pelucida y cultivado en el sistema WOW. (Magnificación original 200X).



Figura 3. Amplificación de secuencias específicas del cromosoma "Y" y del cromosoma "X" por PCR de blastómeros androgenéticos (Y) y de embriones reconstruidos (XY).

Discusión

Inicialmente evaluamos dos métodos comúnmente utilizados para la generación de embriones androgenéticos por FIV, incluyendo enucleación de ovocitos fertilizados (FIV previa a la enucleación) y fertilización de ovocitos enucleados (FIV posterior a enucleación). Los embriones androgenéticos producidos por estos métodos clivaron exitosamente y no se registraron diferencias estadísticas en las tasas de mórulas y blastocistos comparadas con los controles de fertilización *in vitro*. Esta diferencia con respecto a reportes previos ha mostrado que la mayoría de los embriones androgenéticos haploides producidos por FIV, en el bovino y en el ratón son arrestados después de las primeras divisiones celulares y sólo algunos embriones desarrollan hasta estadio de mórula compacta y blastocisto.^{5,10,14}

Embriones androgenéticos generados por FIV, antes o después de la enucleación, con espermatozoides expuestos a pCX-EGFP, clivaron y desarrollaron hasta estadio de blastocisto, pero ninguno de ellos expresó EGFP (Tabla 1). Cuando el control de FIV fue realizado utilizando espermatozoides previamente incubados con pCX-EGFP, los ovocitos fueron exitosamente fertilizados y desarrollaron como el grupo control (sin coincubación con el gen reportero), pero ningún embrión expresó EGFP. Estos resultados coinciden con reportes previos.^{15,16} La ausencia de embriones FIV con expresión de EGFP podría deberse a la pérdida del plásmido por parte del espermatozoide antes o durante la penetración del ovocito, como una consecuencia de las débiles interacciones entre el espermatozoide y el ADN exógeno, como fue previamente informado.¹⁷

En el segundo experimento, evaluamos el desarrollo de embriones generados por ICSI previa o posteriormente a la enucleación de los ovocitos. En nuestro trabajo, cuando la ICSI fue realizada en forma previa a la enucleación, las tasas de clivaje embrionario fueron altas en comparación con el grupo en el cual la ICSI fue realizada después de la enucleación. Estos resultados coinciden con reportes previos publicados en ratón.³ Como era de esperarse, las tasas de desarrollo de embriones androgenéticos haploides hasta estadio de mórula y blastocisto fueron bajas para to-

dos los grupos, independientemente del momento en el cual se realizó la enucleación. El análisis del cariotipo de los embriones androgenéticos producidos por ambos métodos (ICSI previa y posteriormente a la enucleación), confirmó que la mayoría de ellos fueron efectivamente haploides.

En nuestro experimento, el procedimiento de ICSI permitió la producción de embriones que expresaron el gen reportero. Tanto los embriones androgenéticos haploides obtenidos utilizando espermatozoides expuestos a pCX-EGFP como los embriones biparentales control, mostraron expresión de EGFP (Tabla 2). Este fenómeno, en contraposición con los resultados de FIV, es debido a que la ICSI evita el procedimiento de fusión de gametas, y de esta forma las débiles interacciones entre los espermatozoides y el ADN exógeno no son un impedimento para la incorporación del gen reportero exógeno.

Por otro lado, en la reconstrucción de embriones biparentales, la participación de ambos genomas (paterno y materno) es esencial para lograr un desarrollo a término.^{5,6,18} Sin embargo, cuando los genomas materno y paterno evolucionan por separado como núcleos haploides durante varios ciclos, la desincronización de uno de ellos no afecta el desarrollo a término de los embriones reconstruidos con estos núcleos.¹⁴ Además, embriones diploides de ratón reconstruidos a partir de embriones partenogenéticos y androgenéticos haploides en estadio de 2 células, han resultado en la producción de crías normales.¹⁹ Esto demuestra que tanto los genomas masculino y femenino pueden activarse en forma separada y completar su desarrollo cuando se unen en un citoplasma sincronizado con estos núcleos.¹⁹ Nuestros experimentos mostraron que genomas masculinos obtenidos de embriones androgenéticos haploides hasta estadio de 16 células, pudieron generar embriones biparentales capaces de desarrollar hasta estadio de blastocisto (Tabla 3, Figura 2).

Cuando la reconstrucción de embriones biparentales fue realizada utilizando blastómeras haploides androgenéticas que expresaban EGFP, todos los embriones expresaron el gen reportero en todas sus blastómeras. Las tasas de desarrollo no fueron afectadas cuando los embriones fueron reconstruidos con blastómeras que expresaron

EGFP, sugiriendo que la expresión de EGFP no comprometió el desarrollo embrionario *in-vitro*. De esta forma pudimos verificar la contribución citoplasmática de las blastómeras haploides androgenéticas en los embriones reconstruidos. Para confirmar la incorporación del genoma espermático, generamos embriones haploides androgenéticos utilizando espermatozoides sexados "Y". Se utilizaron blastómeras haploides androgenéticas aisladas de estos embriones para la reconstrucción de embriones biparentales. La presencia del cromosoma "Y" en las blastómeras androgenéticas remanentes y en los embriones reconstruidos con ellos fue confirmada por análisis de PCR (Figura 3). La detección de secuencias específicas de ADN para cromosomas X e Y mediante el uso de PCR ha sido empleada frecuentemente como un método de determinación del sexo de embriones.^{20,21} Sin embargo decidimos realizar una confirmación adicional de la presencia del cromosoma "Y" utilizando análisis de FISH, el cual confirmó la presencia del genoma espermático replicado en las células de los blastocistos generados. La identificación del cromosoma "Y" fue también posible en espermatozoides sexados y embriones control de FIV generados con ellos. Como era de esperarse, los embriones partenogenéticos utilizados como control negativo no mostraron señal "Y" positiva. Por otro lado, se realizó un análisis de inmunohistoquímica para determinar el patrón de expresión de un gen marcador de pluripotencialidad celular (Oct-4) en los embriones reconstruidos.²² Se observó expresión positiva tanto en el macizo celular interno (MCI) como en el trofoblasto de todos los blastocistos analizados, y también en los embriones del grupo control FIV, indicando una eficiente reprogramación nuclear.

En conclusión, hemos demostrado que es posible replicar genomas espermáticos haploides a partir de un único espermatozoide y que estas réplicas pueden ser utilizadas para generar embriones biparentales con una nueva combinación de características genéticas a partir de ambos progenitores, y de forma similar a una fertilización normal.²³ Esta estrategia presenta un enorme potencial de utilización en producción ganadera, debido a que permite determinar el sexo de los núcleos espermáticos replicados antes de ser utiliza-

dos en la reconstrucción de embriones. Por esta razón, representa una nueva y ventajosa forma de generar crías de sexo predeterminado, con ventajas a los sistemas tradicionales. En el sexado embrionario, realizado por biopsias de blastómeros seguida de análisis por PCR o utilizando la técnica de FISH, el diagnóstico se realiza luego de la fertilización, lo que evita la no utilización del 50% de los embriones generados, por ser del sexo no deseado. Además, utilizando marcadores genéticos también podríamos seleccionar ciertos atributos favorables antes de la formación del embrión. Por otra parte, la posibilidad de obtener múltiples copias idénticas del genoma de un espermatozoide podría, en un futuro, ayudar a enfrentar algunos tipos de infertilidad masculina en los que el número de espermatozoides normales es muy bajo. Si en estos casos se seleccionara un solo espermatozoide normal se tendría, mediante este procedimiento, una fuente alternativa de células masculinas con capacidad reproductiva, proporcionando de esta forma una alternativa para la obtención de un mayor número de embriones aumentando así las posibilidades de concebir.

Referencias

1. Kaneko-Ishino T, Kohda T, Ishino F. The regulation and biological significance of genomic imprinting in mammals. *J Biochem* 2003;133:699-711.
2. Cruz NTD, Wilson KJ, Cooney MA, Tecirlioglu RT, Lagutina I, Galli C, Holland MK, French AJ. Putative imprinted gene expression in uniparental bovine embryo models. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:589-597.
3. Miki H, Hirose M, Ogonuki N, Inoue K, Kezuka F, Honda A, Mekada K, Hanaki KI, Iwafune H, Yoshiki A, et al. Efficient production of androgenetic embryos by round spermatid injection. *Genesis* 2009;47:155-160.
4. Barton SC, Surani MA, Norris ML. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 1984;311:374-376.
5. McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984;37:179-183.
6. Surani MAH, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature, Lond.* 1984;308:548-550.
7. Kaufman MN, Lee KKH, Speirs S. Post-implantation development and cytogenetic analysis of diandric heterozygous diploid mouse embryos. *Cytogenet Cell Genet* 1989;52:15-18.

8. Latham KE, Solter D. Effect of egg composition on the developmental capacity of androgenetic mouse embryos. *Development* 1991;113:561-568.
9. Hagemann LJ, First NL. Embryonic cytoplasmic extracts rescue murine androgenomes to the blastocyst stage. *Development* 1992;114:997-1001.
10. Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Galli C. Developmental potential of bovine androgenetic and parthenogenetic embryos: A comparative study. *Biol Reprod* 2004;70:400-405.
11. Matsukawa K, Turco MY, Scapolo PA, Reynolds L, Ptak G, Loi P. Development of sheep androgenetic embryos is boosted following transfer of male pronuclei into androgenetic hemizygotes. *Cloning Stem Cells* 2007;9:374-81.
12. Park CH, Kim HS, Lee SG, Lee CK. Methylation status of differentially methylated regions at *Igf2/H19* locus in porcine gametes and preimplantation Embryos. *Genomics* 2009;93:179-186.
13. Kuznyetsov V, Kuznyetsova I, Chmura M, Verlinsky Y. Duplication of the sperm genome by human androgenetic embryo production: towards testing the paternal genome prior to fertilization. *Reprod Biomed Online* 2007;14:504-14.
14. Surani MAH, Barton SC, Norris ML. Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell* 1986;45:127-136.
15. Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD. No simple solution for making transgenic mice. *Cell* 1989;59:239-41.
16. Yamauchi Y, Doe B, Ajduk A, Ward MA. Genomic DNA damage in mouse transgenesis. *Biol Reprod* 2007;77:803-812.
17. Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live rhesus monkey births. *Mol Hum Reprod* 2000;6:26-33.
18. Mann JR, Lovell-Badge RH. Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. *Nature* 1984;310:66-67.
19. Barra J, Renard JP. Diploid mouse embryos constructed at the late 2-cell stage from haploid parthenotes and androgenotes can develop to term. *Development* 1988;102:773-779.
20. Bradbury MW, Isola LM, Gordon JW. Enzymatic amplification of a Y chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4053-4057.
21. Ramalho MF, Garcia JM, Esper CR, Vantini R, Alves BC, Almeida-Junior IL, Hossepian de Lima VF, Moreira-Filho CA. Sexing of murine and bovine embryos by developmental arrest induced by high-titer H-Y antisera. *Theriogenology* 2004;62:1569-1576.
22. Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastasiadis K, Schöler H, Niemann H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* 2000;63:1698-1705.
23. Yanagimachi R. Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals. *Reprod Biomed Online* 2005;10:247-88.