

## MECANISMOS DE MODULACION DE LA SENSIBILIDAD A GLUCOCORTICOIDES POR LAS CITOQUINAS

MONICA A. COSTAS, DAMIAN KOVALOVSKY, EDUARDO ARZT

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina; Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*

**Resumen** Hemos demostrado previamente que el TNF- $\alpha$  y la IL-1 aumentan la actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides (GR) inducida por glucocorticoides (GC) en distintas líneas celulares transfectadas con un plásmido reporter llevando elementos respondedores a GC (GRE). En células blanco de TNF- $\alpha$  y GC determinamos: 1) TNF- $\alpha$  aumentó el N° de GR en células L-929 y 2) por transfección de las mismas con un plásmido reporter llevando el promotor de GR que este efecto es a nivel transcripcional, 3) por ensayos de movilidad electroforética utilizando extractos nucleares de células L-929 estimuladas con TNF- $\alpha$  0,02 ng/ml, DEX 10 nM o TNF- $\alpha$  + DEX, que las citoquinas aumentan la unión de GR a GRE (45 min, 1,8 x), mientras que la expresión del factor NF- $\kappa$ B inducido por TNF- $\alpha$  no fue afectada por GC, 4) como correlato biológico de estos mecanismos, un priming de TNF- $\alpha$  (no citotóxico) aumentó la sensibilidad a la protección por GC de la apoptosis inducida por esta citoquina ( $p < 0.001$ ). El organismo se protege de una respuesta inmune exacerbada, no sólo por un aumento de GC por citoquinas, sino también, aumentando la sensibilidad a los mismos: vía un aumento en el N° de GR, en el binding a GRE y de la transcripción de sus genes blanco (ej. genes protectores de la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ ). Estos mecanismos contribuyen a aumentar la actividad antiinflamatoria e inmunosupresora de GC para mantener la homeostasis.

**Palabras clave:** citoquinas, TNF- $\alpha$ -receptor de glucocorticoides, apoptosis

En respuesta a una infección o inflamación, el sistema inmune responde con la producción de citoquinas, cuya función inmunomoduladora resulta crucial para una adecuada respuesta inmune. Entre las citoquinas producidas, se encuentran las llamadas citoquinas inflamatorias, como interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), cuya sobreproducción, tiene efectos tan nocivos como el patógeno responsable de su inducción<sup>1</sup>. El organismo se protege de esto a través de la activación por las propias citoquinas, del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) y la liberación de

glucocorticoides (GC), los que, por su acción antiinflamatoria e inmunosupresora, impiden una respuesta inmune exacerbada<sup>2</sup>.

### Abreviaturas

AP1: factor de transcripción activado por ésteres de forbol.  
 $B_{max}$ : unión máxima.  
 CAT: cloranfenicol transacetilasa.  
 DB-cAMP: dibutilil adenosina monofosfato cíclico.  
 DEX: dexametasona.  
 EMSA: ensayo de cambio de movilidad electroforética.  
 GC: glucocorticoides.  
 GR: receptor de glucocorticoides.  
 GRE: elementos respondedores a glucocorticoides.  
 HPA: eje hipotálamo hipófisis adrenal.  
 IL: interleuquina.  
 LUC: luciferasa.  
 MTV: virus de tumor mamario de ratón.  
 NF- $\kappa$ B: factor de transcripción que activa la cadena kappa de inmunoglobulinas.  
 poli (dl-dC): ácido poli-deoxinosínico-deoxicidílico.  
 TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa.

Recibido: 27-XI-1996

Aceptado: 4-XII-1996

**Dirección postal:** Dr. Eduardo Arzt, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina

Entre los mecanismos por los cuales los GC ejercen estos efectos se encuentran la inhibición de la producción de citoquinas y de su acción biológica, como por ejemplo, la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ , según hemos demostrado previamente<sup>3</sup>.

De acuerdo con este modelo fisiológico de interacción entre citoquinas y GC, se planteó como hipótesis de trabajo que a nivel de las células blanco de citoquinas y GC podrían existir mecanismos moleculares de interacción entre las señales emitidas por ambos factores a través de las cuales las citoquinas podrían estar modulando la sensibilidad a GC. En esta línea de pensamiento, utilizando las células L-929 (fibroblastos de ratón), que son un blanco de acción citotóxica para TNF- $\alpha$ , hemos demostrado previamente que esta citoquina, en una dosis no citotóxica, puede aumentar la actividad de GR sobre sus elementos respondedores en el DNA (GRE), presentes en genes blanco de GC<sup>4</sup>. En células transfectadas con un plásmido llevando un gen reporter, como el de la cloranfenicol transacetilasa (CAT) o el de la luciferasa (LUC), bajo el control de un promotor viral (MTV) que contiene GRE, aumenta la actividad de GR en respuesta a TNF- $\alpha$  + dexametasona (DEX) respecto de DEX. Este incremento en la transcripción vía GRE por TNF- $\alpha$ , no fue exclusivo de esta línea celular ni de esta citoquina, sino que pudo observarse en otros tipos celulares como las células epiteliales de hepatoma humano HeLa, células hipofisarias de ratón AtT20 y de glioblastoma humano U373, así como en respuesta a IL-1. Al estudiar el efecto de TNF- $\alpha$  sobre la transcripción vía GRE en dos líneas celulares que no expresan GR, como las células de riñón de mono CV1 y de neuroblastoma humano SK-N-MC, pero que según comprobamos por Northern blot, sí expresan el mRNA para el receptor de TNF- $\alpha$ , no se observó una inducción de la actividad transcripcional vía GRE en respuesta a GC ni GC + TNF- $\alpha$ . Sin embargo, cuando estas células fueron cotransfectadas con un vector de expresión constitutiva para GR, que según determinamos, su expresión no fue modulada por TNF- $\alpha$ , el agregado de esta citoquina + GC produjo un aumento significativo de la transcripción vía GRE, respecto de la estimulación con GC, similar a la observada en las células L-929, aun en presencia de un número constante de GR. Estos

resultados plantearon la existencia de dos posibles mecanismos por los cuales las citoquinas podrían estar modulando la actividad de GC: uno es el aumento en el número de GR, responsable en parte del aumento en la actividad transcripcional vía GRE y otro es el aumento en la actividad transcripcional de GR, por una acción directa de las citoquinas, independiente del aumento en el número de GR.

El presente trabajo tiene como objetivo dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales las citoquinas aumentan la sensibilidad celular a la acción contrarregulatoria de los GC. Para ello realizamos todos los estudios en las células L-929, en las mismas dosis no citotóxicas de TNF- $\alpha$  que inducen un aumento en la actividad antiapoptótica de los GC, de forma de correlacionar las evidencias moleculares con la evidencia fisiológica.

Para determinar si TNF- $\alpha$  podía estar induciendo un aumento en la actividad de GR sobre GRE, las células L-929 fueron preincubadas durante 12 hs con la dosis no citotóxica de TNF- $\alpha$  (0,02 ng/ml) y posteriormente se determinó el número de GR por Scatchard. Se observó que el tratamiento con esta citoquina produjo un aumento significativo en el número de sitios, sin cambios de afinidad, respecto de células sin tratamiento ( $B_{max}$ : 1.611 vs 2.173 fmol/mg) (no mostrado).

Para determinar el efecto de esta citoquina sobre la transcripción del gen codificante para GR, las células L-929 fueron transfectadas con un plásmido llevando el gen reporter CAT bajo el control del promotor del gen codificante para GR<sup>5</sup> y se midió la actividad CAT en respuesta a TNF- $\alpha$  (0,02 ng/ml) (Research and Diagnostic Systems, USA), utilizando dibutilil AMP cíclico (DB-cAMP) (Sigma, USA) como un control positivo de estimulación o DEX como control negativo<sup>5</sup>. Como puede observarse en la Fig. 1, la citoquina produjo un aumento similar a DB-cAMP en la transcripción vía el promotor de GR. Estos resultados indican que TNF- $\alpha$  induce a nivel transcripcional la expresión del gen de GR.

Con el objeto de determinar la posible inducción por TNF- $\alpha$  de alguna nueva proteína o factor con la capacidad de interaccionar con GR, aumentando su afinidad por GRE, o bien que interaccione con GRE, se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)<sup>6</sup>. En

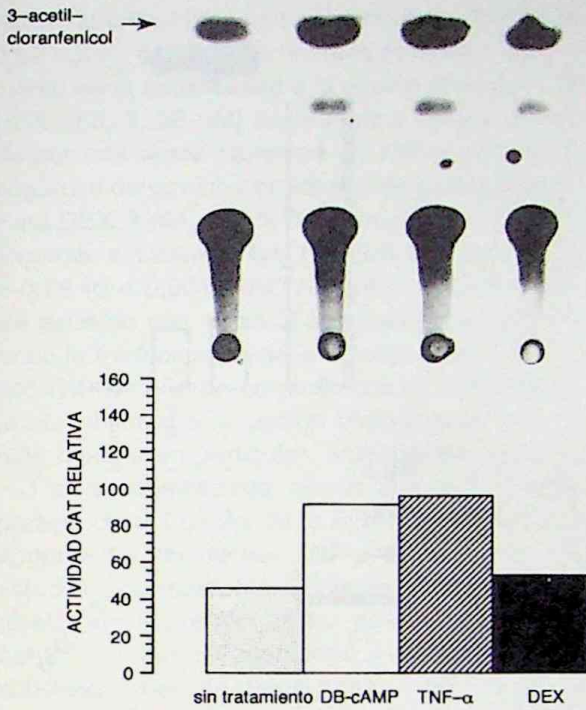


Fig. 1.— Efecto de TNF- $\alpha$  sobre el promotor del receptor de glucocorticoides en las células L-929.

Las células fueron transfectadas con el plásmido HGRP-CAT y estimuladas con TNF- $\alpha$  0,02 ng/ml, o DEX 10 nM o DB-cAMP 0,5 mM durante 24 hs. El diagrama de barras corresponde a las unidades densitométricas relativas (a la actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenida por cotransfección con un vector de expresión constitutiva para esta enzima) para cada calle de la autorradiografía del ensayo CAT. Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes.

estos experimentos, las células L-929 fueron estimuladas con DEX 10 nM o con DEX + TNF- $\alpha$  0,02 ng/ml, durante 15, 45 ó 60 minutos. Masas iguales de los extractos nucleares, conteniendo los factores de transcripción inducidos en ambas condiciones, fueron incubados con un oligonucleótido de 30 pb, llevando la secuencia GRE, marcado con  $^{32}\text{P}$ . Las muestras fueron corridas en gel de poliacrilamida y los complejos DNA-proteína fueron determinados por autorradiografía. Según se observó por tratamiento de 45 minutos, extractos provenientes de células tratadas con la citoquina + DEX mostraron un aumento en la unión de GR a GRE respecto de los extractos provenientes de las células tratadas con DEX solamente (Fig. 2A). No se observó un desplazamiento de la banda correspondiente a los complejos GR/GRE y tampoco se observó la aparición de

nuevas bandas por tratamiento con TNF- $\alpha$ , lo cual indica que no hubo inducción de una nueva proteína capaz de interactuar con los complejos GR/GRE o con GRE. La especificidad de los complejos observados pudo confirmarse en ensayos de competición, en los cuales, un exceso de oligonucleótido frío (50-100 x, respecto del oligonucleótido marcado) fue incluido en la mezcla de reacción. Un exceso del oligonucleótido específico produjo un desplazamiento total de la señal, mientras que, un exceso de un oligonucleótido no relacionado a GRE, correspondiente al promotor del gen de la fibronectina humana (gentilmente cedido por el Dr. A. Kornblihtt), llevando otra secuencia para la unión de otros factores de transcripción, no produjo desplazamiento (Fig. 2A). Como un control de que las masas de extractos nucleares que se utilizaron en ambas condiciones (DEX o DEX + TNF- $\alpha$ ) eran las mismas, los mismos extractos utilizados en la Fig. 2A, fueron incubados con un oligonucleótido no relacionado a GRE (y que por lo tanto une otros factores de transcripción), marcado con  $^{32}\text{P}$ . No se observaron diferencias en la intensidad de las bandas correspondientes a los complejos DNA-proteína (no mostrado). Los mismos resultados fueron obtenidos con extractos provenientes de células estimuladas por 45 ó bien 15 minutos, donde no hay síntesis de nuevo GR<sup>7</sup>. Por lo tanto, de acuerdo con estas observaciones, TNF- $\alpha$  aumenta la actividad transcripcional de GR, vía un aumento en la unión de GR a GRE. La interacción entre factores de transcripción inducidos por distintas señales, puede llevar a la transactivación o transrepresión génica a través de distintos mecanismos que incluyen el acoplamiento físico entre factores, aumentando, o bloqueando su afinidad por las secuencias específicas en el DNA<sup>8</sup>. Entre los factores inducidos por las citoquinas, se encuentran AP1 y NF $\kappa$ B. La interacción entre estos factores y GR es compleja, en general conduce a la represión de los genes que codifican para citoquinas y de los genes blanco de citoquinas y constituye la base molecular de la acción inmunosupresora de los GC<sup>9</sup>. Por otro lado, también existen evidencias de que estas interacciones llevarían a la represión de la expresión de los genes blanco de GC<sup>9</sup>. Con el objeto de determinar la posible disminución en los niveles de NF $\kappa$ B inducido por TNF- $\alpha$ , por tratamiento con GC (debido al posible acoplamiento entre NF $\kappa$ B y GR),

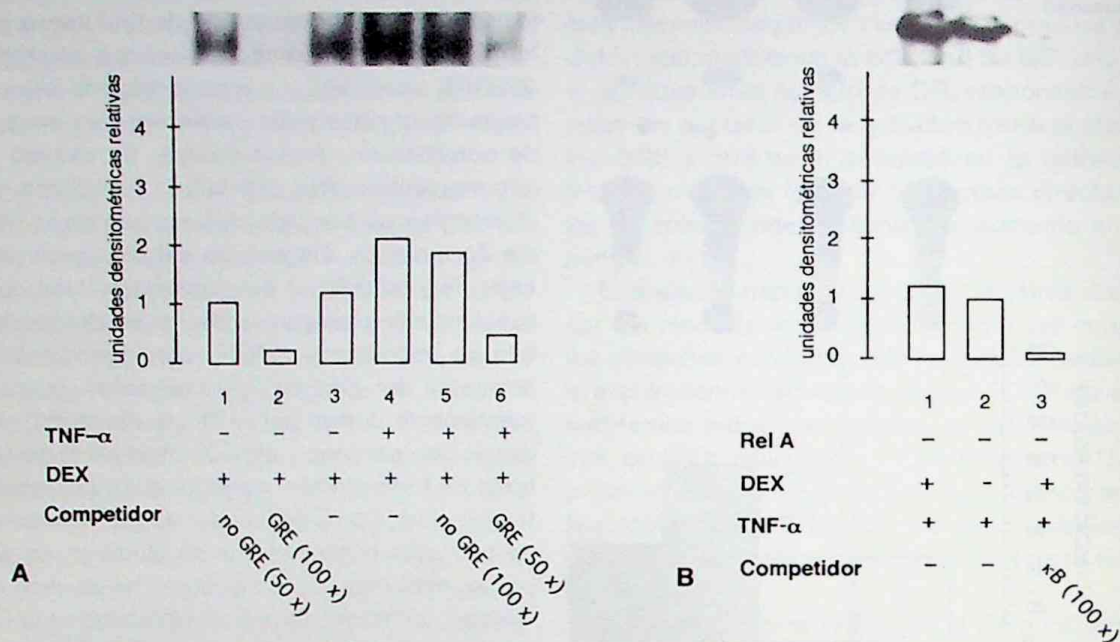


Fig. 2.— Efectos de TNF- $\alpha$  y GC sobre la unión de GR y NF $\kappa$ B a sus elementos respondedores en el DNA.

A. El EMSA y las reacciones de competición fueron realizadas utilizando el oligonucleótido GRE marcado y 16  $\mu$ g de los extractos nucleares de las células L-929<sup>1-6</sup>, las cuales fueron estimuladas por 60 minutos con DEX 10 nM<sup>1-3</sup> o DEX + TNF- $\alpha$  0,02 ng/ml<sup>4-6</sup>. Para los ensayos de competición, en la mezcla de reacción se incluyó un exceso de GRE frío (2 y 6) o de un oligonucleótido competidor no específico<sup>1 y 5</sup>. En el buffer de reacción, se utilizó 1  $\mu$ g de poli (dl-dC). TNF- $\alpha$  solo no tuvo efecto. El diagrama de barras corresponde a las unidades densitométricas estandarizadas con las unidades obtenidas con la misma cantidad de extracto nuclear en ensayos de EMSA con un oligonucleótido no específico marcado. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes en los cuales los extractos nucleares fueron obtenidos luego de 15, 45 ó 120 minutos de estimulación.

B. El EMSA y los ensayos de competición fueron realizados utilizando un oligonucleótido específico para la unión de NF $\kappa$ B marcado y 16  $\mu$ g de extractos nucleares provenientes de las células L-929<sup>1-3</sup>, las cuales fueron estimuladas por 60 minutos con 0,02 ng/ml de TNF- $\alpha$  + DEX 10 nM<sup>1 y 3</sup> o TNF- $\alpha$ <sup>2</sup>. En las reacciones de competición, un exceso de oligonucleótido frío, específico para la unión de NF $\kappa$ B fue incluido en la mezcla de reacción<sup>3</sup>. El ensayo fue realizado utilizando 1  $\mu$ g de poly (dl-dC) en el buffer de reacción. Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes, en los cuales los extractos fueron obtenidos a 15, 45 y 120 minutos.

se realizaron experimentos de EMSA utilizando extractos nucleares de células L-929 estimuladas con TNF- $\alpha$  (0,02 ng/ml) o con TNF- $\alpha$  + DEX 10 nM por distintos tiempos y el oligo-nucleótido llevando la secuencia específica para el reconocimiento de NF $\kappa$ B, marcado con <sup>32</sup>P. No se observaron diferencias en los niveles de NF $\kappa$ B por tratamiento con GC a los 45 minutos (Fig 2 B). Los mismos resultados fueron obtenidos con extractos provenientes de células tratadas por 15, 45 ó 120 minutos. Estos resultados indicarían que a los tiempos estudiados, en los cuales puede observarse un aumento en la unión de GR a GRE

por tratamiento con TNF- $\alpha$  + DEX, la posible formación de complejos NF $\kappa$ B/GR, no sería suficiente para bloquear la unión de estos factores a sus respectivas secuencias en el DNA, ni para contrarrestar la acción estimuladora de las citoquinas sobre la transcripción de los genes blanco de GC. Nuestros resultados demuestran que en células blanco de GC y TNF- $\alpha$ , esta citoquina aumenta la expresión de GR y su unión a los GRE. Estos resultados explican el aumento de la sensibilidad a la actividad antiapoptótica de GC, cuya evidencia funcional se pone de manifiesto en experimentos en los cuales las células L-929 fueron pretra-

tadas durante 12 hs con un priming de TNF- $\alpha$  de 0,02 ng/ml. Estos experimentos mostraron un aumento en la sensibilidad a la acción protectora de DEX (0,3, 3, 30 nM) de la muerte celular inducida por una dosis citotóxica de TNF- $\alpha$  (60 ng/ml) según se determinó por ensayo de citotoxicidad<sup>10</sup>. Para DEX 3 nM, el  $\Delta\%$  de aumento en la supervivencia, sin priming fue  $15 \pm 0,8$ , con priming  $34 \pm 0,78$  ( $p < 0,001$ , ANOVA con test de Scheffe). De acuerdo con estas observaciones, el aumento en la transcripción de los genes blanco de GC por TNF- $\alpha$  tiene un correlato con un aumento en la sensibilidad a la acción biológica de GC, en este modelo en particular, anti-apoptótica.

Ha sido demostrado, que un aumento en la expresión de los genes de la familia bcl-2 inhibe la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ . De acuerdo con estudios recientes, los GC pueden aumentar los niveles de expresión de los genes de la familia bcl-2, y como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de estos genes inhibe la apoptosis, por lo cual, este podría ser uno de los mecanismos responsables del aumento en la sensibilidad al efecto inhibitorio de GC en la inducción de apoptosis por TNF- $\alpha$  en las células L-929: el pretratamiento de las células con una dosis no citotóxica de TNF- $\alpha$ , induciendo un aumento en el número de GR y de su actividad transcripcional podría conducir a una sobreproducción de bcl-2, aumentando de este modo la protección de apoptosis por GC.

De acuerdo con observaciones clínicas, se sabe que la ausencia de GC endógenos, agrava el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, pero, sin embargo, la administración de GC exógenos no mejora la supervivencia. Esta paradoja, puede ser explicada, si se acepta que el grado de supervivencia en respuesta a esta patología, o cualquier otra que involucre una producción de citoquinas, depende, más bien del grado de resistencia o sensibilidad a los efectos de GC, que a sus niveles hormonales. En este sentido, resulta importante destacar que en numerosas patologías inflamatorias como la artritis reumatoidea y otras enfermedades autoinmunes, asma esteroide-resistente o la osteoartritis degenerativa, se manifiesta, como síntoma común una resistencia de los tejidos blanco a la acción de GC<sup>11</sup>. Por otro lado, es sabido que el tratamiento con GC lleva a una reducción en la expresión de

GR. De acuerdo con esto, los resultados obtenidos en este trabajo podrían tener importantes implicancias terapéuticas, pues se ha demostrado que las citoquinas pueden aumentar la sensibilidad a GC, vía un aumento de la actividad transcripcional de GR y un aumento en el número de GR. En este sentido, existen evidencias de que IL-1 $\beta$  puede aumentar el efecto inhibitorio de los GC sobre la producción de enzimas degradativas en fibroblastos sinoviales de conejo<sup>12</sup>, constituyendo un buen ejemplo de las posibles aplicaciones terapéuticas de esta citoquina en el tratamiento de la artritis reumatoidea.

En base a estos resultados puede concluirse, que el organismo se protege de una respuesta inmune exacerbada, no solo vía la inducción del eje HPA y un aumento de GC por citoquinas, sino también, aumentando la sensibilidad a los mismos: vía un aumento en el número de GR, en el binding de GR a GRE y de la transcripción de los genes blanco de GC (por ej. genes protectores de la apoptosis inducida por TNF- $\gamma$ ). Estos mecanismos contribuyen a aumentar la actividad antiinflamatoria e inmunosupresora de los GC y para restaurar la homeostasis en situaciones patológicas con aumento de citoquinas.

## Summary

### *Mechanisms of glucocorticoid sensitivity modulation by cytokines*

We have previously shown that TNF- $\alpha$  and IL-1 may enhance the glucocorticoid (GC)-induced transcriptional activity of glucocorticoid receptor (GR) in different cell lines transfected with a reporter plasmid carrying GC response elements (GRE). In TNF- $\alpha$  and GC target cell lines, it was found that: 1) TNF- $\alpha$  enhanced GR number in L-929 cells, and 2) by transfection of these cells with a reporter plasmid carrying the GR promoter, that TNF- $\alpha$ -induced increase in GR is at the transcriptional level, 3) by electrophoretic mobility shift assay, using nuclear extracts of TNF- $\alpha$  (0.02 ng/ml) or TNF- $\alpha$  plus DEX (10 nM) stimulated L-929 cells, that cytokines can increase the binding of GR to GRE (45 min, 1.8 x), while the TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B factor expression was not affected by GC. 4) As a biological correlate of this mechanism, priming of L-929 cells with TNF- $\alpha$  significantly increased ( $p < 0.001$ ) the sensitivity to GC inhibition of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. The organism

protects itself from an immune overreaction, not only via the HPA axis induction and an increase in GC by cytokines, but also enhancing the sensitivity to GC: by an increase in GR number, the binding to GRE and the transcription of GC target genes (e.g. TNF- $\alpha$ -induced apoptosis inhibitory genes). These mechanisms contribute to enhance the immunosuppressive and antiinflammatory GC activity, in order to maintain homeostasis.

## Bibliografía

- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234: 470-4.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 1984; 5: 25-44.
- Costas M, Sauer J, Nahmod VE, Arzt E. La apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  en células L929 es inhibida por glucocorticoides. *Medicina (Buenos Aires)* 1994; 54: 541.
- Costas M, Trapp T, Páez Pereda M, et al. Las citoquinas aumentan la sensibilidad a la acción reguladora de glucocorticoides. *Medicina (Buenos Aires)* 1995; 55: 550-1.
- Zong J, Ashraf J, Thompson EB. The promoter and first, untranslated exon of the human glucocorticoid receptor gene are GC rich but lack consensus glucocorticoid receptor element sites. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5580-5.
- Trapp T, Rupperecht R, Castrén M, Reul JM, Holsboer F. Heterodimerization between mineralo-corticoid and glucocorticoid receptor: A new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron*. 1994; 13: 1457-62.
- Cidlowski JA, Cidlowski NB. Glucocorticoid receptors and the cell cycle: Evidence that the accumulation of glucocorticoid receptors during the S phase of the cycle is dependent on ribonucleic acid and protein synthesis. *Endocrinology*. 1982; 110: 1653-62.
- Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK, Yamamoto KR. Transcription factor interactions: Selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 1990; 249: 1266-72.
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin Jr AS. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- $\kappa$ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 943-53.
- Costas M, Mella D, Criscuolo M, et al. Superinduction of mitogen-stimulated interferon- $\gamma$  production and other lymphokines by Sendai virus. *J Interferon Res* 1993; 13: 407-12.
- Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *New Engl J Med* 1995; 332: 1351-62.
- Hoshino J, Beckmann G, Huser J, Kröger H. Interleukin 1 $\beta$  enhances the response of rabbit synovial fibroblasts in vitro to dexamethasone injury: implication for the role of increased nuclear hypersensitive sites and the number of dexamethasone receptors. *J Rheumatol* 1994; 21: 616-22.

- - -

*I have long maintained that this globe of ours is inhabited by two distinct species of humans, the developed and the developing, the rich and the poor. What distinguishes one type of human from the other is the ambition, the power, the elan which basically stem from their differing mastery and utilization of present-day science and technology.*

Hace mucho que sostengo que en este globo nuestro viven dos especies diferentes de seres humanos, los desarrollados y no desarrollados, los ricos y los pobres. Lo que distingue un tipo de ser humano del otro es la ambición, el poder, el impulso que surge básicamente de su diferente dominio y aprovechamiento de la ciencia y la tecnología de hoy.

Abdus Salam (1926-1996)