

Marcadores tumorales y oncogenes en cáncer de mama

S. Ramón y Cajal Agüeras

Tumor markers and oncogenes in breast cancer

SUMMARY

Breast cancer, like all malignant tumors, shows an important heterogeneity in phenotype and numerous genetic abnormalities. The accumulation of various oncogenic abnormalities is fundamental for the development of a malignant tumor. More than 50 oncogenes and suppressor genes are known whose activation and deactivation, respectively, may be involved in human-tumor pathology. In breast cancer, the study of oncogenes such as newlrb-B2 and bcl2, mutations in the p53 suppressor gene, and the analysis of tumor proliferative activity, oestrogen or progesterone receptors, and other factors may yield prognostic correlations. Likewise, it is important to note the large number of allele losses reported in various chromosomes in many breast tumors, where new suppressor genes that are important for the development of these tumors presumably may be located. Breast cancer also has a clear genetic component, familial predisposition existing in about 5-10%. Various genetic disorders have been identified, such as BRCA-1, BRCA-2, as well as associations of breast cancer with certain familial syndromes, such as Cowden syndrome, Li-Fraumeni, ataxia-telangiectasias.

Palabras clave

Mama, Oncogenes, Genes supresores.

Key words

Breast, Oncogenes, Suppressor genes.

Departamento de Patología.
Clínica Puerta de Hierro.
Madrid.

INTRODUCCION

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en las mujeres y supone alrededor del 18% de todos los cánceres de la mujer. En España la tasa de aparición de cáncer de mama estaría alrededor de 36 nuevos casos por cada 100.000 habitantes y año y por tanto significaría que cada año se pueden diagnosticar alrededor de 16.000 nuevos casos. Una de las características más importantes del cáncer de mama es su marcada heterogeneidad morfológica y pronóstica con una impredecible evolución clínica según los criterios diagnósticos actuales.

Desde hace 15 años se sabe que la transformación maligna celular tiene una base genética que radica en la activación de unos genes promotores del crecimiento, los protooncogenes y/o en la inactivación de unos genes que controlan la proliferación celular, los genes supresores. El descubrimiento de los oncógenes supuso un avance espectacular en el conocimiento del cáncer. En la actualidad se han descrito más de 40 oncogenes y más de 6 genes supresores en tumores humanos, cuya delección o mutación pueden ser de gran importancia en el desarrollo tumoral.^{1, 6, 19} Su número presumiblemente se elevará a más de 100 oncogenes y 25 genes supresores en los próximos años. Todos los protooncogenes y ge-

nes supresores descubiertos hasta la fecha se pueden englobar en la secuencia de transmisión de señales involucradas en la regulación de la proliferación, diferenciación, senescencia, apoptosis y desarrollo. El estudio de los oncógenes puede ayudar a racionalizar el estudio de los diferentes tipos de cáncer permitiendo tener una información molecular de los mismos y sentar las bases de un análisis más específico de cada tumor y de cada paciente, perfilando las características biológicas del tumor en función de los oncógenes activados. Dicha información reflejaría las características individuales de cada tumor y permitirá realizar un abordaje terapéutico más individualizado a cada paciente.^{12, 15}

Existen varias formas de alteraciones genéticas que predisponen a la adquisición tumoral: a) delección de regiones cromosómicas que conlleva la pérdida de genes importantes en la regulación negativa de la proliferación celular (caso de los genes supresores); b) un aumento de susceptibilidad a las mutaciones tanto espontáneas como inducidas, y c) un aumento de la probabilidad de amplificaciones génicas que conlleva a la sobreexpresión de genes específicos. Alternativamente se produce una ganancia y pérdida de cromosomas enteros que conlleva a la aneuploidía característica de la mayoría de células tumorales. Diferencias en la capacidad de reparación de algunas de las alteraciones reversibles producidas (errores en la lectura de la DNA polimerasa, depurinización, oxidación por radicales libres generados en el metabolismo celular y deaminación de la 5-metilcitosina) pueden explicar la diferente susceptibilidad de cada tipo celular. Es importante destacar que el orden de las lesiones no es relevante para el resultado final, siendo la acumulación de alteraciones lo que conlleva a la aparición de la célula tumoral.

Por último, es obligado mencionar que otros genes, no identificados como oncógenes o genes supresores, también cooperan de forma importante al desarrollo del cáncer de forma directa o aumentando su potencial metastásico. Es el caso de las moléculas de adhesión celular, NCAM o de actividad proteolítica de la procatepsina L, que favorecen la implantación y el crecimiento tumoral, de la HSP o *heat shock proteins* que se asocian a estrés celular y que pueden ser indicadores pronósticos.

Recientemente 3 nuevos mecanismos carcinogénicos se han descrito en la transformación maligna

de las células. Uno es el referente al control y a la regulación del ciclo celular. En dicho mecanismo es muy importante la regulación de la proteína p105 del gen de retinoblastoma y su fosforilación por diversas quinasas dependientes del ciclo celular, que a su vez son reguladas por varias proteínas, como la p16 y p21 Waf.^{2, 9}

Otro mecanismo descrito inicialmente por Perucho y el grupo de Vogelstein es la demostración de inestabilidad genética en un número significativo de tumores humanos. Estudios de Perucho utilizando primers inespecíficos para amplificación por PCR demostraron una alta frecuencia de delecciones y mutaciones genéticas en cáncer de colon y adenomas apuntando la posibilidad de una posible alteración en los sistemas de reparación del DNA que condicionaría las posteriores alteraciones genéticas. Posteriormente se identificó uno de los genes responsables en dicho cromosoma, el gen MSH-2, homólogo a un gen de levadura (MUT.S), que interviene en los mecanismos de reparación del DNA.

Por último, el estudio de la muerte celular programada o apoptosis es uno de los campos de investigación más prometedores en la actualidad. El control de la apoptosis se realiza por múltiples genes, como el bcl-2, bcl-x, bax, ced-9, p53, myc, ras... Alteraciones en la inducción de apoptosis puede condicionar el desarrollo de procesos neoplásicos y aumentar la resistencia celular a quimioterápicos y radioterapia.

En cáncer de mama es muy importante resaltar la predisposición familiar existente en más del 5% de los casos, que llega casi al 50% en las mujeres que desarrollan cáncer de mama antes de los 45 años. Recientemente se han identificado varios genes, cuya delección o inactivación se asocia a mayor probabilidad de desarrollar cáncer de mama y/o ovario. Los primeros que se han identificado son el BRCA-1 situado en el cromosoma 17q21 y el BRCA-2 en el cromosoma 13q12-13. Se supone que al menos otros 3 genes pueden estar relacionados con dicha predisposición familiar al cáncer de mama.

Otros marcadores de pronóstico muy utilizados en cáncer de mama son los receptores de estrógenos y de progesterona. Otros marcadores como la catepsina D, una proteasa lisosomal dependiente de estrógenos, también se correlaciona con el pronóstico de los tumores de mama. Expresión de receptores estrogénicos en adenocarcinoma *in situ* se ha detectado hasta en el 32% de los casos.

TABLA I
ALTERACIONES ONCOGENICAS
EN CANCER DE MAMA

Oncógenes

- Rara vez el ras.
- c-myc (8q) > 30%.
- int-2 (11q) FGF family.
- c-erb-2 (17q) 20-40%. Adca infiltrantes; 50-60% adca *in situ*.
- bcl-2. Se correlaciona con positividad para RE

Genes supresores

- p53: > 45%
- p105.
- DCC.
- nm23-H1 (17q). Adca *in situ* tipo no comedo.

Loh o pérdida de heteroziguidad

- 1p, 1q, 3p, 7, 11p, 13q rb1), 17p, 17q (p53), 18q (DCC).
-

**ALTERACIONES GENETICAS
EN EL CANCER**

En tumores de mama se han identificado una serie de alteraciones cromosómicas que involucran deleciones en los cromosomas 3p, 11p, 13q y 17p y también pérdida de heteroziguidad en los cromosomas 1p, 1q, 17q y 18q. Algunas de estas alteraciones ocasionan la pérdida de los denominados genes supresores, como el gen del retinoblastoma o el gen p53. Las alteraciones cromosómicas en el cáncer pueden también estar asociadas con la sobreexpresión de determinados productos génicos. Entre ellos destacan por su incidencia los factores de crecimiento y sus receptores y los que constituyen el grupo de factores de transcripción. Así se han estudiado fundamentalmente los oncogenes *erb-B* (análogo del receptor para EGF o epidermal growth factor), *neu/erb-B2/HER-2* (de la familia del receptor para EGF y de ligando desconocido) y la familia de genes *myc*. El mecanismo de activación del potencial oncogénico de estos genes se relaciona generalmente con una translocación cromosómica que genera un aumento de su expresión o la pérdida de su regulación. Se ha intentado relacionar el cáncer de mama con la sobreexpresión de determinados protooncógenes tales como *c-ras*, *neu/erb-B2/HER-2*, fundamentalmente, y en menor medida, *c-src*, *c-raf-1*, *c-fos* o *c-jun*.

**ACTIVACION DE PROTOONCOGENES
Y PERDIDA DE GENES SUPRESORES**

Existen varios mecanismos de activación del potencial oncogénico de los protooncógenes o genes normales y su conversión en genes malignos. Mutaciones puntuales que alteran la función del producto o la sobreexpresión del gen normal generalmente están asociados con una ganancia de función, quedando activado de forma constitutiva. Es el caso de los denominados oncogenes. Por el contrario, deleciones e incluso mutaciones puntuales inactivantes que conllevan a la pérdida de función constituyen el rasgo característico de los denominados genes supresores.

Como ejemplos más representativos del grupo de oncogenes se pueden citar los genes *ras* para el caso de mutaciones activadoras y de genes de la familia *erb-B* como exponentes de la activación por sobreexpresión del producto normal. Como ejemplo característico del grupo de genes supresores destacan el gen del retinoblastoma (Rb) y el gen p53, responsables de la regulación negativa de la proliferación celular y cuya desaparición conlleva el crecimiento incontrolado.

**ONCOGENES CODIFICANTES PARA
RECEPTORES DE FACTORES
DE CRECIMIENTO**

Los receptores de hormonas en general y factores de crecimiento en particular juegan un papel importantísimo en la transmisión de información al interior celular. Reconocen las señales codificadas en estos factores y gracias a su estructura transmembranal la decodifican al interior celular en forma de señales amplificadas que a su vez se convierten en forma de segundos mensajeros (calcio, diacilglicerol, cAMP, etcétera). El destino final de la señal, regulación de un determinado proceso enzimático o la variación de los niveles de transcripción génica, marcan el comportamiento de la célula que contienen estos receptores. Los más importantes desde el punto de vista de su posible participación en los procesos malignos son aquellos que presentan una estructura semejante a oncogenes ya identificados, y muy especialmente aquellos que se han podido identificar sus ligandos naturales.

TABLA II
PREDISPOSICION FAMILIAR

BRCA-1: 17q21. También cáncer de ovario.
BRCA-2: 13q12-13. No asocia cáncer de ovario.
Li-Fraumeni: mP53.
Ataxia-telangiectasia.
Síndrome de Cowden.
Otros genes: 17q.

El mecanismo de participación en el proceso de transformación maligna de receptores involucrados en la regulación de la proliferación celular consiste en una expresión inapropiada por sus niveles, superiores a los de células normales (sobre expresión), a la presencia errónea en células en las que no debería expresarse (expresión ectópica) o mutaciones activadoras que les hacen independientes del ligando que los activa de forma natural. Este es el caso del receptor para el factor de crecimiento epitelial (EGF-R), cuyo análogo *erb-B* constituye su versión oncogénica, el del factor estimulante de colonias en macrófagos-granulocitos (CSF-1-R) con su variante oncogénica *fms*, el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF-R), junto con su análogo oncogénico *met*, y el receptor para el factor hematopoyético SL (SLF-R), con su versión oncogénica *kit*. Otros oncogenes con homología con los anteriormente descritos, tales como *neu/erb-B2/HER-2*, *sea*, *ros*, *flg*, *erb-B3* o *bek*, etc., cuyos ligandos no han sido descritos todavía, son también objeto de estudio en relación a su posible cooperación en la formación de tumores humanos.

En el cáncer de mama el oncogén mejor estudiado corresponde al gen *neu/erb-B2/HER-2*. En cáncer de mama hay numerosos estudios que enfatizan la frecuencia de sobreexpresión de *neu* en dichos tumores, correlacionándose con el pronóstico especialmente en tumores con ganglios positivos. Se ha visto amplificación en un 20-40% de los cánceres de mama invasivos y en más del 50% de los adenocarcinomas *in situ*. Se detecta principalmente en tumores de grado nuclear 3. Asimismo se ha correlacionado el nivel sérico con la presencia de metástasis.⁸

ONCOGENES NUCLEARES: FACTORES DE TRANSCRIPCION

El grupo de oncogenes nucleares se caracteriza por constituir auténticos factores de transcripción. Su

papel consiste en regular la expresión de una batería de genes involucrados directamente en la regulación de la proliferación o diferenciación celular. Algunos de ellos fueron descubiertos como tales factores de transcripción antes de intuir su posible función en la transformación celular, como el factor AP-1, mientras que otros se han descubierto por su homología con oncogenes nucleares previamente descritos. Entre los más estudiados se encuentran la familia *myc* (*c-myc*, *L-myc* y *N-myc*), los componentes del factor AP-1 (*fos* y *jun*) y el receptor de hormonas tiroideas *erb-A*. El mecanismo fundamental de activación de su potencial oncogénico es su expresión incontrolada, llevando a una expresión de los genes que regulan de forma constitutiva (caso de *fos* y *jun*) o a su activación constitutiva mediante la pérdida de su respuesta a la hormona (caso del gen *erb-A*).

En tumores de mama se ha descrito amplificación del *c-myc* en más del 30% de los cánceres y se correlaciona con mayor actividad proliferativa tumoral.⁸ Otros oncogenes, como la ciclina D/PRAD1, se están empezando a estudiar.

ONCOGENES *ras*

La familia de genes *ras* codifica para proteínas de 21 kDa (*p21-ras*) con capacidad de unir e hidrolizar guanosina trifosfato (GTP). Existen 3 genes distintos, denominados Harvey, Kirsten y *N-ras*, con cerca del 90% de identidad en sus secuencias a nivel de proteínas. Las mutaciones activantes en genes *ras* afectan el equilibrio hacia la unión permanente de *p21-ras* con GTP, manteniéndose bloqueada en su conformación activa. También se han descrito casos en los que el mecanismo de activación no es cualitativo (mutaciones activantes), sino cuantitativo (aumento de la expresión del producto normal).

Los resultados de diversas series muestran que activación de los oncogenes *ras* es muy frecuente en tumores de páncreas y de aparato digestivo y en aproximadamente el 30% de adenocarcinomas de pulmón. Por el contrario, su incidencia es muy rara en tumores de mama, correlacionándose la activación *ras* con peor pronóstico, siendo un ejemplo de que determinadas alteraciones oncogénicas muestran una cierta especificidad tisular dependiendo posiblemente de determinados agentes carcinógenos.

GENES SUPRESORES

Los denominados genes supresores pertenecen a un grupo de genes cuyos productos están involucrados de forma diversa en la regulación negativa de la proliferación celular. Se han descrito como genes supresores análogos a moléculas de adhesión celular, como es el caso del gen deleccionado en cáncer de colon, DCC, genes codificantes para proteínas con actividad GTPasa sobre proteínas *ras*, como es el gen de la neurofibromatosis, NF-1, y factores de transcripción como p53, RB y *erb-B*. También se ha visto una estrecha relación funcional de estos genes supresores con factores de crecimiento, como es el TGF β . El descubrimiento de genes supresores ha estado ligado fundamentalmente al desarrollo de la tecnología de mapeo cromosómico de deleciones asociadas a neoplasias familiares. Aunque su mecanismo de acción todavía no se comprende en profundidad, en todos los casos se requiere la pérdida de la función en ambos alelos para la aparición de la enfermedad.

El gen supresor p53 es la alteración oncogénica más frecuente detectada en tumores humanos. El porcentaje de mutaciones de p53 y/o acumulación de proteína «inactiva» oscila entre el 46 y el 22% según las series. Se detecta mutaciones del p53 hasta en el 16% de los adenocarcinomas *in situ* de mama, indicando por tanto que puede ser una alteración oncogénica precoz en el desarrollo del cáncer de mama. En tumores «familiares» su incidencia llega hasta el 50%.¹⁶ Su positividad se correlaciona con tumores de alto grado y atipia celular.

COOPERACION ENTRE ONCOGENES

Existe abundante información que demuestra que el cáncer es un proceso con múltiples alteraciones genéticas. Se acepta generalmente que para que se manifieste el proceso tumoral se requiere al menos la participación de un oncogén y la inactivación de un gen supresor. Sin embargo, también pueden producirse alteraciones simultáneas de más de un gen pertenecientes a cada grupo. En cáncer de mama, además de la coparticipación de ambos grupos de genes, se han publicado casos de coexistencia de pérdida de función de genes supresores como RB y p53 en las mismas muestras tumorales, así como la

coparticipación de más de un oncogén activado, como es el caso de la familia *myc* entre sí o conjuntamente con *ras* o *c-raf*. Cooperación entre dichos oncógenes también se ha descrito en líneas celulares de tumores de mama. Asimismo se ha detectado aumento de proteína sérica de *erb-B2* y de *myc* hasta en el 75% de los adenocarcinomas *in situ* de mama, siendo un marcador tumoral que puede valorar la evolución de la enfermedad. Sin embargo, desgraciadamente, no se ha llevado a cabo un estudio sistémico de todos los oncógenes y genes supresores potencialmente involucrados en el desarrollo de tumores de forma paralela con la misma batería de muestras. Este estudio permitirá llevar a cabo su estudio comparativo y su proyección hacia una comprensión fenomenológica en la que poder identificar el estado de progresión tumoral con marcadores genéticos, desenmascarando ciertos rasgos característicos de tumores específicos. Esta información podría ser de gran valor terapéutico en determinados casos. Por ejemplo, se ha observado que células que tienen el oncogén *raf* activado presentan una mayor resistencia a la radiación.

ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CANCER DE MAMA *IN SITU*

El carcinoma ductal *in situ* de mama tiene una incidencia del 5% y alrededor del 25% evolucionan a carcinoma invasor. Histológicamente se pueden distinguir varios tipos y desde el punto de vista biológico y pronóstico se distinguen 2 variantes: el carcinoma *in situ* tipo comedocarcinoma y el no-comedo. El comedocarcinoma tiene mayor agresividad morfológica, atipia y pleomorfismo celular y peor pronóstico.

Los carcinomas *in situ* tipo no-comedo son positivos para receptores estrogénicos en >60% de los casos y en menor medida a los de progesterona. Por el contrario en los tipos comedo son generalmente negativos para los RE. Positividad para el *c-erb-2* a nivel de la membrana celular, se asocia al pleomorfismo celular y por tanto al tipo comedocarcinoma. En los carcinomas lobulillares *in situ*, por el contrario, no suele haber positividad de membrana y sí citoplásmica. Positividad para la proteína p53 también se asocia con el tipo comedocarcinoma y se relaciona con el grado de necrosis y la ausencia de receptores estrogénicos. Otras alteraciones genéticas descritas

han sido la positividad para la proteína nm23 (gen relacionado con las metástasis) en el tipo no comedocarcinoma.

RESUMEN

El cáncer de mama, como todos los tumores malignos, muestra una gran heterogeneidad fenotípica y múltiples alteraciones genéticas. La acumulación de varias alteraciones oncogénicas es fundamental para el desarrollo de un tumor maligno. Se conocen ya más de 50 oncógenes y genes supresores cuya activación e inactivación, respectivamente, pueden estar involucrados en patología tumoral humana. En el cáncer de mama es importante el estudio de oncógenes como el *neu/erb-B2*, *bcl2*, de las mutaciones del gen supresor *p53*, el análisis de la actividad proliferativa de los tumores, de receptores estrogénicos, de progesterona y otros factores que pueden tener correlación pronóstica. Asimismo es importante destacar el gran número de pérdidas alélicas descritas en diversos cromosomas, en gran número de tumores de mama, donde presumiblemente se puedan localizar nuevos genes supresores de importancia para el desarrollo de dichos tumores. El cáncer de mama tiene también un claro componente genético de predisposición familiar en alrededor del 5-10% de los casos. Ya se han identificado varias alteraciones genéticas como *BRCA-1*, *BRCA-2* y la asociación de cáncer de mama como algunos síndromes familiares, como el síndrome de Cowden, Li-Fraumeni, ataxia-telangectasia.

REFERENCIAS

- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-248.
- Bonetta L. Open questions on p16. *Nature* 1994; 370: 180.
- Callahan R, Cropp CS, Merlo GR, Liscia DS, Cappa APM, Lidereau R. Somatic mutations and human breast cancer. *Cancer* 1992; 69: 1582-1588.
- Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; 64: 282-302.
- Disis ML, Calenoff E, McLaughlin G, Murphy AE, Chen W, Groner B, Jeschke M, Lydon N, McGlynn E, Livingston RB et al. Existence of T-cell and antibody immunity to HER-2/ neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 16-20.
- Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991; 64: 249-270.
- Kandalafi PL, Chang KL, Ahn CW, Traweek ST, Mehta P, Battifora H. Prognostic significance of immunohistochemical analysis of cathepsin D in low-stage breast cancer. *Cancer* 1993; 71: 2756-2763.
- Kreipe H, Feist H, Fisher L, Felgner J, Heidorn K, Mettler L, Parwaresch R. Amplification of c-myc but not c-erbB-2 is associated with high proliferative capacity in breast cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 1956-1961.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *PNAS* 1992; 89: 7491-7495.
- Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and *in situ* cancer. *Br J Cancer* 1994; 69: 135-139.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer drugs. *Cell* 1993; 74: 957-967.
- Marchetti E, Romero J, Sánchez R, Vargas JA, Lacal JC, Ramón y Cajal S. Oncogenes and cellular sensitivity to radiotherapy. A study on murine keratinocytes transformed by v-H-ras, v-myc, neu adenovirus E1a and p53 mutant. *Int J of Oncology* 1994; 5: 611-618.
- Merlo GR, Hynes NE. Cooperation between mutant p53 and the ras, raf, erb-2 and fgf-3 oncogenes for transformation of mammary cells. *Int J of Oncology* 1994; 5: 1141-1150.
- Poller DN, Snead DR, Roberts EC, Galea M, Bell JA, Gilmour A, Elston CW, Blamey RW, Illis IO. Oestrogen receptor expression in ductal carcinoma *in situ* of the breast: Relationship to flow cytometric analysis of DNA and expression of the c-erbB-2 oncoprotein. *Br J Cancer* 1993; 68: 156-161.
- Sánchez-Prieto R, Vargas JA, Carnero A, Marchetti E, Romero J, Durantez A, Lacal JC, Ramón y Cajal S. Modulation of cellular chemoresistance in keratinocytes by activation of different oncogenes. *International Journal of Cancer* 1995; 60: 235-243.
- Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH, Smith HS. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: An independent marker of prognosis in breast cancers. *J of the Natl Cancer Inst* 1992; 84: 845-855.
- Vicioso L y Matilla A. Aspectos biológicos del carcinoma ductal *in situ* de mama. *Patología* 1994; 27: 209-214.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Has the breast cancer gene been found? *perCell* 1994; 79: 1-3.
- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991; 254: 1138-1146.
- Wilburg DC, Barrows GH. Estrogen and progesterone receptor and c-erb-2 oncoprotein analysis in pure *in situ* breast carcinoma: An immunohistochemical study. *Mod Pathol* 1993; 6: 114-120.