

Avaliação da expressão dos antígenos Ki-67 e CD71 em células blásticas CD34 positivas nas leucemias agudas

Determination of Ki-67 and CD71 antigens expression on CD34-positive blastic cells in acute leukaemias

RIALA6/1449

Heliana Trindade MARINHO^{1*}, Elda Pereira NORONHA¹, Érika Bárbara Abreu Fonseca THOMAZ³, Geni Lourdes de Resende Ramos VERAS⁴, Raimundo Antônio Gomes OLIVEIRA^{1,2}

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Pesquisa Clínica do Maranhão, Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA), Rua Almirante Tamandaré, 01, Centro. CEP 65020-600, São Luís, MA, Brasil. E-mails: helianamarinho@yahoo.com.br.

²Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

³Departamento de Saúde Pública, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

⁴Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB).

Recebido: 21.04.2011 - Aceito para publicação: 15.02.2012

RESUMO

Foram avaliadas a expressão de marcadores Ki-67 e CD71 nas células imaturas CD34+ em pacientes com leucemias agudas (LA) e a associação entre esses marcadores. Foram selecionados 54 pacientes com LA atendidos no Centro Oncológico de Referência do estado do Maranhão, de dezembro/2008 a novembro/2009. A expressão de Ki-67 e CD71 foi determinada por citometria de fluxo, em células positivas para o marcador de células imaturas CD34. Dos 54 pacientes, 34 (63,0%) eram portadores de leucemias linfoides agudas (LLA), destes, 73,5% eram do tipo B (LLAB) e 26,5% do tipo T (LLAT). A maior expressão de Ki-67 em medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) foi detectada na LLAB; e, nas amostras de MO, o CD71 apresentou maior expressão na LLAT. Em SP, houve maior expressão do CD71 nas LMA. Houve associação entre o Ki-67 e o CD71 em MO na LMA e, em SP, na LLAB. A expressão do Ki-67 nas leucemias agudas não diferiu nas amostras estudadas; contudo, diferenças na expressão do CD71 foram maiores na LLAT em MO e em SP na LMA. Esses achados serão úteis no diagnóstico e no monitoramento de pacientes leucêmicos quanto à agressividade neoplásica pela detecção dos marcadores de proliferação celular.

Palavras-chaves. leucemia aguda, proliferação celular, Ki-67, CD71.

ABSTRACT

The expression of Ki-67 and CD71 was determined on the immature CD34+ cells from patients with acute leukaemias (AL) and the relationship between the markers was established. 54 patients with AL were selected from December 2008 to November 2009 at Oncology Reference Center, Maranhão, Brazil. Ki-67 and CD71 expression was determined by flow cytometry in cells positive for immaturity marker CD34. Of 54 patients, 34 (63.0%) had acute lymphoid leukaemias (ALL), and 73.5% of them were type B (ALL-B) and 26.5% type T (ALL-T). The highest Ki-67 expression in bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) was found in ALL-B than in ALL-T or acute myeloid leukaemia (AML). The highest CD71 expression was detected in BM samples from ALL-T and in PB samples from AML. An association between Ki-67 and CD71 in BM from AML and in PB from ALL-B was observed. The expression of Ki-67 in acute leukaemias did not differ in the analyzed samples; however, great differences in CD71 expression were observed in BM from ALL-T and in PB from AML. These findings will be useful for diagnosis purposes and for monitoring leukemic patients by detecting the neoplastic cell proliferation markers.

Keywords. acute leukemia, cell proliferation, Ki-67, CD71.

INTRODUÇÃO

As leucemias agudas são um grupo heterogêneo de neoplasias primárias da medula óssea caracterizadas pela substituição dos elementos medulares e sanguíneos normais por células imaturas denominadas blastos, bem como pelo acúmulo dessas células em outros tecidos. Uma das bases importantes da patogênese da leucemia é a proliferação celular desordenada^{1,2}.

A proliferação celular é definida como o aumento do número de células, resultante da complementação do ciclo celular. Este ciclo engloba uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma sequência lógica e a divisão desses componentes em duas células-filhas³. A citometria de fluxo vem sendo muito utilizada para quantificar a taxa de proliferação celular, além de detectar e diferenciar leucemias⁴.

A expressão da proteína humana Ki-67 é estreitamente associada com a proliferação celular. O fato de estar presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e não estar nas células em repouso (G0) faz do Ki-67 excelente marcador para determinar a fração do crescimento de uma população celular⁵.

O receptor de transferrina (CD71) é uma proteína expressa na membrana que desempenha um papel central no metabolismo do ferro. Seu ligante, a transferrina, se liga ao ferro férrico e o entrega às células⁶. O CD71 desempenha um papel significativo na proliferação celular, sendo expresso na maioria das células em divisão e com expressão regulada positivamente mediante ativação celular⁷.

Considerando-se que a proliferação celular está intimamente ligada à agressividade neoplásica e a maioria dos estudos de proliferação celular em leucemias utiliza a imunocitoquímica, esta pesquisa tem por objetivos quantificar a expressão dos antígenos Ki-67 e CD71 por citometria de fluxo e associar os dois marcadores entre si, nas células imaturas (blastos), positivas para CD34+ em pacientes com leucemias agudas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram diagnosticados com leucemia aguda 60 pacientes, divididos em faixa etária infanto-juvenil (< 19 anos) e faixa etária adulta (\geq 19 anos)⁸, no Centro Oncológico de Referência do estado do Maranhão (no

Nordeste brasileiro) entre dezembro de 2008 e novembro de 2009 (doze meses). Foram excluídos dos estudos de proliferação celular 4 pacientes que perderam a expressão do CD34, o que impossibilitaria a análise da proliferação apenas nas células neoplásicas, e 2 pacientes diagnosticados com leucemia bifenotípica aguda, pois constitui uma população muito pequena para avaliação estatística. Isso possibilitou a análise da proliferação celular em um total de 54 pacientes.

O diagnóstico das leucemias agudas foi baseado no aspecto citomorfológico e imunofenotípico dos blastos em medula óssea ou sangue periférico. A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, San José, Califórnia, Estados Unidos) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e proteína piridina de clorofila (PerCP), direcionados contra antígenos de células precursoras e antígenos da linhagem B, T ou mieloide. As LMA foram classificadas de acordo com os critérios da classificação franco-americana-britânica (FAB)^{9,10} e do Grupo Europeu para Caracterização Imunológica das Leucemias (EGIL)¹¹. A classificação das LLA foi feita com base nos conceitos do grupo EGIL¹².

Esta pesquisa integra um projeto submetido à apreciação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e aprovado (parecer consubstanciado 115/2008) em 11 de março de 2008, conforme as diretrizes descritas na Resolução n. 196/96.

Estudos de Proliferação Celular

A determinação dos antígenos Ki-67 e CD71 foi estudada nos blastos CD34 positivos do sangue periférico e na medula óssea dos pacientes portadores de LLA (B e T) e LMA.

A determinação da expressão do antígeno Ki-67 nas células blásticas CD34 positivas por citometria de fluxo foi realizada usando-se o anticorpo monoclonal anti-Ki-67 conjugado com FITC (Becton Dickinson) e o anticorpo anti-CD34, marcador de células precursoras, conjugado com PE (Becton Dickinson).

Resumidamente, a suspensão celular foi ajustada para uma concentração de 1×10^6 células por tubo. Primeiramente, foi realizada marcação em membrana através do anticorpo monoclonal CD34 PE, seguida de incubação em câmara escura. Foi então adicionada solução de lise (Becton Dickinson, FACS Lysing Solution)

diluída 1:10 em água destilada, com posterior incubação à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada e o sedimento ressuspensionado em PBS 1%, seguido de nova centrifugação. Para marcação em citoplasma, após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensionadas em solução de tampão permeabilizante (BD FACS[®] Permeabilizing Solution), incubadas e, posteriormente, centrifugadas, seguido pelo descarte do sobrenadante. Ao sedimento, foi adicionado o anticorpo anti-Ki-67 FITC de acordo com recomendações técnicas do fabricante, e ao tubo controle, foi adicionado o controle isotípico. Os tubos foram incubados em câmara escura à temperatura ambiente. Após incubação, realizou-se a lavagem com

PBS 1% e centrifugação, descartando-se o sobrenadante. Ao sedimento, foi adicionado paraformaldeído 1% (Paraformaldehyde, Sigma-Aldrich), preservando-o à temperatura de 4 °C, ao abrigo da luz.

A determinação do CD71 seguiu o mesmo protocolo técnico utilizado para o Ki67, com exceção de que, para o CD71, usaram-se os anticorpos anti-CD71 FITC e anti-CD34 PE, com marcação apenas em membrana.

Após a marcação dos anticorpos monoclonais, foram realizadas leituras e análises em citômetro de fluxo (FACSCalibur, da Becton Dickinson), utilizando-se o Cell Quest software, versão 3.1 (Cell Quest[™] Software,

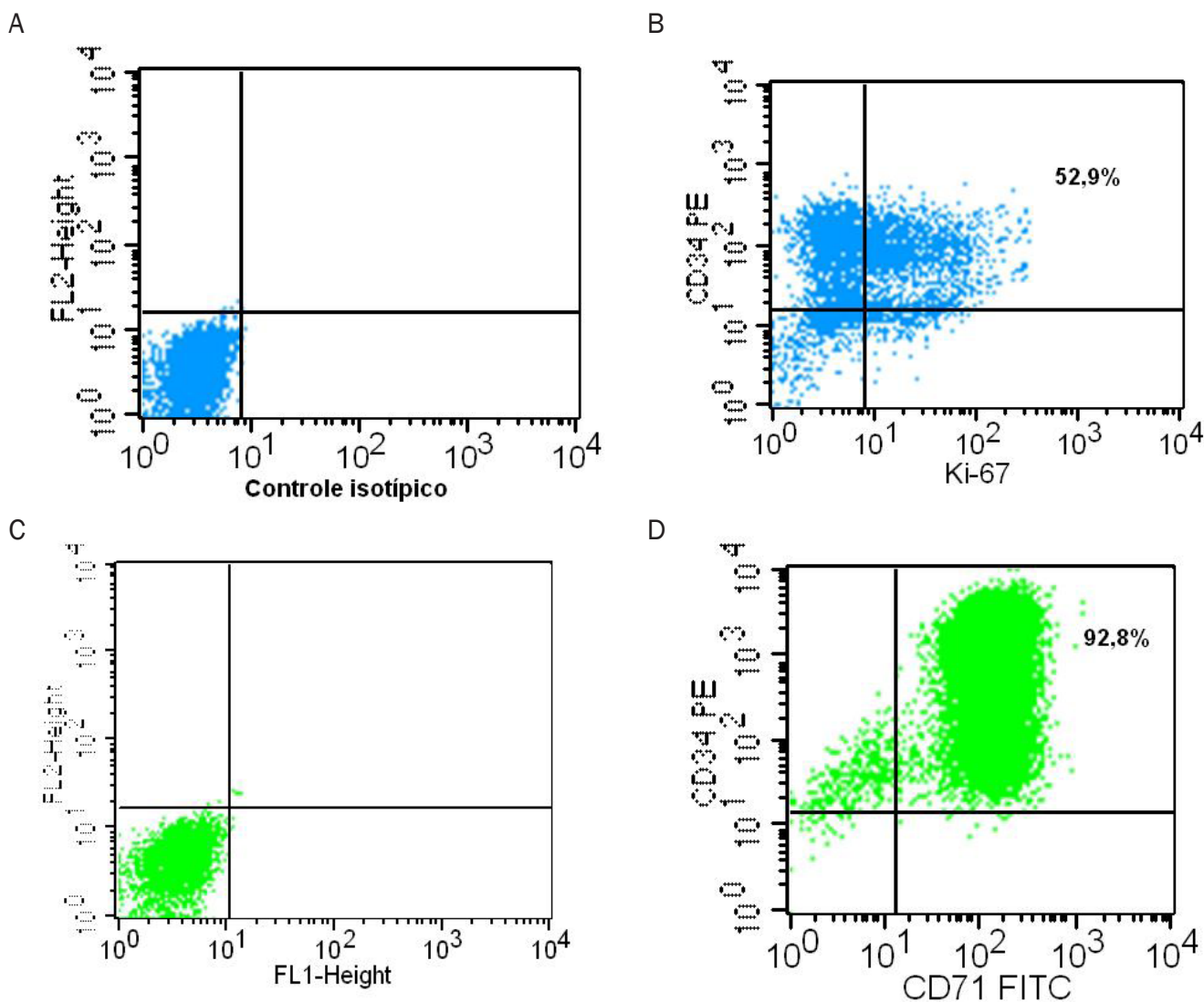


Figura 1. Análise do marcador Ki-67 e CD71 por citometria de fluxo: a) *Dot plot* do controle isotípico do Ki-67. (b) *Dot plot* da dupla marcação do anticorpo anti-Ki-67 versus anticorpo anti-CD34. (c) *Dot plot* do controle do anticorpo anti-CD71. (d) *Dot plot* da dupla marcação do anticorpo anti-CD71 versus anticorpo anti-CD34

Becton Dickinson Immunocytometry Systems), com aquisição de 10.000 eventos no *gate* de células blásticas. A partir da janela de análise estabelecida para os parâmetros de dispersão luminosa para o tamanho (FSC – *forward scatter*) e a complexidade interna celular (SSC – *side scatter*), foram obtidos gráficos do tipo *dot plot* nos canais de fluorescência para FL1 (FITC) e para FL2 (PE). Os resultados foram fornecidos na forma de percentagem de células blásticas positivas para os anticorpos monoclonais estudados.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar normalidade na distribuição dos dados. Para variáveis com distribuição assimétrica, utilizaram-se testes não paramétricos.

Na avaliação de diferenças na expressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 e CD71 em sangue periférico e medula óssea segundo os tipos de leucemias agudas, empregaram-se os testes Mann-Whitney (dois grupos) e Kruskal-Wallis (mais de dois grupos).

A associação entre as variáveis de proliferação celular foi avaliada por regressão linear. Em todas as análises, adotou-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Dos 54 pacientes avaliados, 34 (63,0%) eram portadores de LLA e 20 (37,0%) de LMA. Do total de casos com LLA, 73,5% (25/34) foram tipo B e 26,5% (9/34) tipo T.

A Figura 1 representa um *dot plot* dos marcadores de proliferação criado após a análise por citometria de fluxo e mostra as células duplo-positivas para os marcadores de proliferação na medula óssea de um paciente com LLA.

No total de pacientes, não houve diferença significativa ($p = 0,1318$) para a mediana da expressão do Ki-67 em medula óssea entre a LLA B (25,8%) em relação a LLAT (10,8%) e LMA (9,9%), nem em sangue periférico ($p = 0,1513$) entre a LLAB (44,2%), a LLAT (30,9%) e a LMA (4,2%).

Do mesmo modo, não houve diferença significativa ($p = 0,6198$) para a mediana da expressão do CD71 em medula óssea entre as LLAT (38,0%), LLAB (17,5%) e as LMA (32,3%), nem em sangue periférico ($p = 0,4926$) entre as LMA (64,5%), LLA-B (9,7%) e as LLAT (9,6%) das LLA-T.

Houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0129$) quando foram comparados os valores do Ki-67

em sangue periférico e Ki-67 em medula óssea nas LMAs e também quando foram comparados os valores de CD71 em sangue e medula ($p = 0,0289$) (Tabela 1). Quando analisadas as expressões dos marcadores de proliferação por faixa etária (infanto-juvenil e adulta), não houve significância estatística ($p = 0,2981$).

Observou-se associação positiva entre a expressão do antígeno Ki-67 e o CD71 na LMA ($p = 0,012$) em medula óssea, sendo que o Ki-67 aumenta 28 pontos percentuais a mais em relação ao CD71. Na LLAT e LLAB, não foram observadas associações entre as variáveis de proliferação. Em sangue periférico, houve associação entre a expressão do antígeno Ki-67 e o CD71 na LLAB ($p = 0,012$), sendo que o Ki-67 aumenta 202,2 pontos percentuais em relação ao CD71. Na LLAT e LMA, não foi observada associação entre Ki-67 e CD71 em sangue periférico (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Dos 54 pacientes submetidos ao estudo de proliferação celular, a maioria foi diagnosticada com LLA (63%), e as LMA constituíram 37% do total de leucemias agudas. Dados epidemiológicos da literatura refletem percentuais de LLA que variam de 67% a 85% dos casos¹⁰. A exclusão em nosso trabalho de 4 casos que perderam a expressão do antígeno CD34 (todos LLA) refletiria um valor real de 65,5% de LLA.

A expressão dos marcadores de proliferação celular utilizados nesta pesquisa foi feita separadamente em medula óssea e em sangue periférico, pois há relatos na literatura que apontam diferenças entre os parâmetros cinéticos nos blastos nessas duas amostras biológicas¹³.

Quando comparamos a expressão do Ki-67 em medula óssea com a expressão do Ki-67 em sangue periférico, houve diferença estatística ($p = 0,0129$) apenas na LMA entre os tipos de amostras biológicas (MO e SP). Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores que também encontraram diferenças na expressão da variável estudada no sangue periférico e na medula óssea¹⁴.

De modo semelhante ao Ki-67, o CD71 também apresentou expressões diversas nos diferentes tipos de amostra. Na medula óssea, houve maior expressão na LLAT, e no sangue periférico, maior expressão na LMA. Na literatura, são encontrados dados em que a porcentagem de células que expressam o CD71 é maior na LLAT em medula óssea, confirmando nossos

Tabela 1. Expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 (sangue periférico e medula óssea) por tipo de leucemia aguda em pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA, no período de novembro de 2008 e novembro de 2009 (12 meses)

Tipo de Leucemia	Ki-67									CD71									
	MO				SP				p*	MO				SP				p*	p**
	N	\bar{X}	Dp	Med	N	\bar{X}	Dp	Med		N	\bar{X}	Dp	Med	N	\bar{X}	Dp	Med		
LLAB	18	26,2	18,3	25,8	6	37,8	26,0	44,2	0,3399	18	26,1	24,4	17,5	6	13,0	11,7	9,7	0,1433	0,2115
LLAT	5	12,9	15,0	10,8	4	27,7	24,4	30,9	0,1416	5	40,6	33,3	38,0	4	25,3	33,2	9,6	0,2207	0,4112
LMA	15	16,5	13,3	9,9	5	26,0	3,6	4,2	0,0129**	15	36,1	30,0	32,3	5	49,6	41,5	64,5	0,6312	0,0289**

\bar{X} = média; dp = desvio-padrão; Med = mediana; MO = medula óssea; SP = sangue periférico; p* = p valor para Mann-Whitney; p** = p valor para Kruskal-Wallis; p** = valor estatisticamente significativo (p < 0,05)

Tabela 2. Associação entre os marcadores Ki-67 e CD71 em medula óssea e sangue periférico por tipo de leucemia aguda em pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA, no período de novembro de 2008 e novembro de 2009 (12 meses)

Tipo de leucemia	Ki-67 versus CD71					
	MO			SP		
	Coef.	Dp	p*	Coef.	dp	p*
LLAB	-0,154	0,178	0,399	2,022	0,467	0,012**
LLAT	0,161	0,297	0,641	0,470	0,325	0,244
LMA	0,280	0,095	0,012**	0,010	0,049	0,851

Coef. = coeficiente de regressão linear; dp = desvio-padrão; MO = medula óssea; SP = sangue periférico; p* = p valor para regressão linear; ** = valor estatisticamente significativo (p < 0,05).

resultados. Neste estudo, também foi possível observar maior expressão da LMA em sangue periférico, quando relacionado a LLA B, que apresentou a menor expressão desse marcador, sugerindo que os blastos linfóides B em sangue periférico apresentam menor expressão do antígeno CD71 que outros tipos de leucemias agudas¹⁵.

Sugere-se que CD71 é seletivamente expresso em precursores eritroides em todos os estágios de maturação, principalmente em medula óssea, pois requer grande quantidade de ferro para suportar a produção de hemoglobina^{6,16}, o que pode afetar e explicar resultados diferenciais de quantificação desse marcador em medula óssea e sangue periférico. Entretanto, como em nosso protocolo de análise as células avaliadas foram apenas aquelas CD34 positivas (células mais imaturas), eliminou-se o risco de estarmos avaliando os eritroblastos (precursores eritroides) simultaneamente e falsear os resultados.

Nossos resultados apontam que o aparecimento de maiores taxas de CD71 nos blastos em sangue periférico nas LLAT está associado a uma maior agressividade neoplásica desses subtipos de neoplasias em relação aos índices proliferativos encontrados nas LLAB, o que pode ser valorizado em uma análise individualizada

dos diferentes tipos de leucemias agudas na rotina de diagnóstico.

Não foi observada diferença estatística nas expressões dos marcadores de proliferação por faixa etária (infanto-juvenil e adulta), sugerindo que a idade, nesta pesquisa, não interfere na expressão do Ki-67 e CD71, apesar de alguns estudos indicarem que o CD71 diminui com a idade nas LLA¹⁷.

A avaliação comparativa entre a atividade proliferativa das células nos diferentes tipos de leucemias agudas em nosso estudo demonstrou que, na medula óssea, os resultados apresentaram associação na LMA, com o Ki-67 aumentando à medida que o CD71 também aumenta. No sangue periférico, apenas LLAB apresentou associação, justificando que o Ki-67 aumenta juntamente com o CD71. Esta significativa associação pode estar relacionada a uma maior agressividade da doença, muito embora um maior número de pacientes mereça ser avaliado clinicamente por maior período de tempo, para que assim se estabeleça o valor preditivo desses marcadores de proliferação celular com a evolução e o prognóstico nas leucemias agudas.

CONCLUSÃO

A expressão antigênica do Ki-67 nas leucemias agudas não diferiu nas amostras biológicas estudadas. Por outro lado, foram observadas diferenças na expressão do CD71, sendo maior na LLAT em medula óssea e na LMA em sangue periférico.

As maiores taxas de CD71 nos blastos em sangue periférico nas LLAT sugere maior agressividade neoplásica desses subtipos de neoplasias em relação aos índices proliferativos encontrados nas LLAB.

Não foi observada diferença nas expressões dos marcadores de proliferação por faixa etária (infanto-juvenil e adulta).

Foi observada associação entre o Ki-67 e o CD71 em medula óssea na LMA e em sangue periférico na LLAB. Apesar de ser observada neste estudo associação entre ambos os marcadores de proliferação celular, é necessário um estudo de evolução clínica a médio e longo prazo para avaliação da proliferação celular no prognóstico e na sobrevida de pacientes com leucemias agudas.

Estes resultados poderão ser utilizados associados ao diagnóstico, podendo contribuir para monitorar os pacientes leucêmicos quanto à agressividade neoplásica por meio da detecção dos marcadores de proliferação celular.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos à Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (Fapema), processo 357/08; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), que forneceu bolsa de estudo para realização da pesquisa; ao Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (Cepec-HUUFMA), que colaborou nos fornecendo a infraestrutura e os equipamentos necessários; e ao Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB), que contribuiu propiciando a coleta de espécimes clínicas e a análise de prontuário. Heliana Trindade Marinho e Elda Pereira Noronha foram beneficiárias de bolsas de estudo do Capes.

REFERÊNCIAS

1. Teixeira RAP, Bruniera P, Cusato MP, Borsato ML. Câncer infantil. In: Baracat FF, Fernandes HJJ, Silva MJ. *Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar*. São Paulo: Rocca; 2000. p. 426-51.

- Zhang L, Liu J, Lin H, Hu Q, Liu A, Hu Y. Expression of Survivin, CDK4, Ki-67 and clinical significance in pediatric acute leukemia. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2006;26(5):552-4.
- Komberg IJ, Villaret D, Popp M, Lui L, McLaren R, Brown H, et al. Gene expression profiling in squamous cell carcinoma of the oral cavity shows abnormalities in several signaling pathways. *Laryngoscope*. 2005;115(4):690-8.
- Weiss DJ. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Vet Clin Pathol*. 2002;31(2):72-82.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: from the known and the unknown. *Cell Physiol*. 2000;182:311-22.
- Ned R M, Swat W, Andrews NC. Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development. *Blood*. 2003;102:3711-8.
- Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers BD, Davis SJ, Somoza C, et al. *The leucocyte antigen facts book*. Londres: Academic Press; 1993. p. 258-9.
- Instituto Nacional de Câncer (Brasil). *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2009. [acesso 2010 jan 10]. Disponível em: [http://www.inca.gov.br].
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. *Br J Haematol*. 1976;33:451-8.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML M0). *Br J Haematol*. 1991;78:325-9.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposal for the immunological classification of acute leukaemias: European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL). *Leukemia*. 1995;9:1783-6.
- Coebergh JW, Capocaccia R, Gatta G, Magnani C, Stiller CA. Childhood cancer survival in Europe, 1978-1992: the UROCARE Study. *Eur J Cancer*. 2011;37(6):671-2.
- Ucci G, Riccardi A, Dörmer P, Danova M. Rate and time of DNA synthesis of human leukemic blasts in bone marrow and peripheral blood. *Cell Tissue Kinet*. 1986;19:429-35.
- Drach J, Gatringer C, Glassl H, Schwarting R, Stein H, Huber H. Simultaneous flow cytometric analysis of surface markers and nuclear Ki-67 antigen in leukemia and lymphoma. *Cytometry*. 1989;10:743-9.
- Beitler M B. *Estudo da proliferação celular nas leucemias agudas*. [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1997.
- Dong HY, Wilkes S, Yang H. CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A. *Am J Surg Pathol*. 2003;102:35:723-32.
- Thorstensen K, Romslo I. The transferrin receptor: its diagnostic value and its potential as therapeutic target. *Scand J Clin Lab Invest*. 1993;53(Suppl):113-20.