

VALORES DE ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO POR RANGO ETARIO EN UN GRUPO POBLACIONAL DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA

Sueldo, Belkis Anabella^{1,2}; Casanave, Jéscica Diamela^{1,2}; Ghigo, Melisa Margarita¹; Zambonin, Roxana Beatriz¹; Bustos, Alicia de las Mercedes¹; Benítez, Diego Alejandro¹; López, Luis Edgardo¹; Diserio, Gustavo Pedro².

1. Laboratorio Central - Instituto Modelo de Cardiología Privado - Córdoba - Argentina.
2. Laboratorio LACE S.A. - Córdoba - Argentina.

Correspondencia: Belkis Sueldo. Lima 1566 - 6º Piso, Dpto D. Córdoba. Tel: 152466755 – basueldo@gmail.com

RESUMEN

Introducción. El cáncer de próstata (CaP) representa alrededor del 25 % de los cánceres diagnosticados en hombres, afectando con mayor frecuencia a ancianos. Debido a que en países desarrollados es mayor la proporción de estos pacientes, el 15% de los cánceres masculinos corresponden a carcinomas prostáticos en comparación con el 4% en países en vía de desarrollo. Además, el CaP ocurre más frecuentemente en hombres de raza negra o de descendencia afroamericana y en menor medida en asiáticos. Objetivos. Obtener valores de referencia aplicables a la población estudiada para compararlos con los valores informados por el fabricante del reactivo empleado y con poblaciones de diversas áreas geográficas. Materiales y Métodos. Se obtuvieron los valores de antígeno prostático específico (APE) de la base de datos del Laboratorio Central del Instituto Modelo de Cardiología durante un período de tres años. Fueron incluidos 1124 varones sanos distribuidos en 4 rangos etarios. Los resultados se analizaron mediante un software estadístico (SPSS para Windows 16.0). Resultados. percentiles 95: 1,63 para 40-49 años, 2,68 para 50-59 años, 3,42 para 60-69 años y 4,10 para 70 años o más. Las medianas fueron: 0,70 para 40-49 años, 0,91 para 50-59 años, 1,30 para 60-69 años y 1,75 para mayores de 70 años. Conclusiones. Los valores de referencia de este trabajo mostraron valores de percentil 95 menores que los informados por el fabricante. El aumento en la edad fue acompañado por un aumento en la concentración de APE. Al comparar los resultados de este estudio con los de otras poblaciones, se pudo concluir que, en general nuestra casuística muestra similitudes con los países del oriente asiático, mientras que en E.E.U.U. y el occidente asiático los valores de APE son mucho más elevados.

Palabras clave: cáncer de próstata, valores de referencia, antígeno prostático específico, sexo, edad, etnia.

INTRODUCCIÓN

Los cánceres de próstata, pulmón, colon y recto representan alrededor del 50% de todos los cánceres diagnosticados en hombres. El cáncer de próstata (CaP) constituye aproximadamente el 25% de esos casos (1). Afecta con mayor frecuencia a adultos de avanzada edad y supone un mayor problema de salud en los países desarrollados por contar con una mayor expectativa de vida (2). Así, alrededor del 15% de los cánceres en hombres en los países desarrollados son CaP, en comparación con el 4% en aquellos en vía de desarrollo (2,3).

Existen factores que incrementan el riesgo de CaP, como la edad, antecedentes familiares, origen étnico y cambios genéticos. Es poco común que el CaP afecte a menores de 40 años, pero el riesgo de padecer esta patología aumenta luego de los 50 años según la *American Cancer Society* (ACS) y a partir de los 55 años para la *American Urological Association* (AUA) y la *European Association of Urology* (EAU) (2,4,5). Cuando un familiar de primer grado presenta este carcinoma el riesgo se duplica, y cuando dos o más familiares de primer grado se encuentran afectados el riesgo aumenta entre 5 y 11 veces (6,7). Otro dato epidemiológico importante es que el CaP ocurre con mayor frecuencia en hombres de raza negra o de descendencia afroamericana y en menor medida en asiáticos (8). Ciertas variantes del genoma parecen aumentar el riesgo de padecer CaP. Los estudios de asociación de todo el genoma han identificado más de 70 *loci* de susceptibilidad asociados con modestos riesgos relativos de CaP que, en conjunto, explican aproximadamente el 30% del riesgo familiar de CaP (9). También se han identificado variantes genéticas más raras que confieren mayores riesgos de CaP, como las mutaciones en la línea germinal BRCA2 y BRCA1, que se encuentran presentes en 1,2% y 0,44% de los casos de CaP, respectivamente (10,11). Estas mutaciones confieren un fenotipo de CaP más agresivo con una mayor probabilidad de afectación ganglionar y metástasis a distancia (12).

Con el propósito de reducir la mortalidad por CaP se apuntó a desarrollar estrategias para su detección precoz. Para la detección temprana se utiliza la determinación en sangre del antígeno prostático específico (APE) y la confirmación diagnóstica se realiza mediante una biopsia de próstata. Este antígeno es producido casi en exclusividad por las células epiteliales de la próstata, es decir, tiene especificidad de órgano pero no de malignidad (2).

Hasta principios de este siglo se aceptaba de forma general un valor de APE de 4,0 ng/ml como punto de corte, independientemente de la edad. Sin embargo, por debajo de este valor se diagnosticaban hasta un 15,2% de casos de CaP, razón por la cual se comenzó a recomendar una evaluación más rigurosa del límite superior de referencia (13).

Además, se sabe que existe un aumento progresivo del valor de APE con la edad como consecuencia del aumento del tamaño de la próstata, sin que ello esté asociado a patología maligna alguna (14).

Osterling y col. introdujeron el criterio de valores de percentil según la edad, y establecieron que aquellos individuos con valores entre los percentiles 50 y 95, presentan un mayor riesgo de padecer CaP y, por lo tanto, se sugirió su evaluación y seguimiento por un servicio de Urología (14,15).

Debido a que tanto la edad como la zona geográfica son determinantes de los valores hallados de APE, nos propusimos obtener valores de referencia aplicables a nuestra población en estudio, estratificándolos por edad y, posteriormente comparándolos con los

valores informados por el fabricante del reactivo empleado en nuestro laboratorio y con otras poblaciones de diversos países.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional retrospectivo. Se registraron los valores de APE de 1169 pacientes incluidos en el Programa de Prevención Cardiovascular (PPCV) del Instituto Modelo de Cardiología Privado (IMC), en un período comprendido entre abril de 2012 y abril de 2015. Los sujetos seleccionados tenían más de 40 años, ausencia de patología prostática y sin antecedentes familiares de CaP. También se evaluaron los valores registrados de APE durante tres años previos al momento del examen y se corroboró que no fueran patológicos, a excepción de 71 pacientes menores de 50 años que no contaban con dosajes previos de APE. Además, el 56 % de los sujetos incluidos contaban con ecografía prostática y/o examen dígito-rectal normales. Aproximadamente un 40 % de aquellos pacientes que no contaban con ninguno de dichos estudios complementarios, correspondían al grupo etario de 40-49 años. En cuanto a la preparación pre-analítica, se indicó a los pacientes no tener relaciones sexuales, ni andar en bicicleta, a caballo o en moto dos días previos al examen y no someterse a masaje prostático, tacto rectal, ecografía rectal y/o colonoscopia en las 72 hs. previas.

Se excluyeron del análisis 45 individuos que al momento del examen, o previo al mismo, presentaban patología prostática -benigna o no- y a aquellos que no cumplían adecuadamente con la preparación previa o estuviesen cursando alguna otra patología capaz de afectar el valor del APE, como son la hiperplasia prostática benigna (HPB) y la prostatitis. Para analizar los datos se utilizó el programa SPSS 23.0 para Windows. Se obtuvieron las medias y medianas para cada rango etario con sus respectivos intervalos de confianza (IC) y percentiles de interés. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas.

La determinación de APE se llevó a cabo por electroquimioluminiscencia en un autoanalizador Cobas e411 y empleando el reactivo de Roche "total PSA Gen 2.1".

RESULTADOS

Fueron incluidos en el estudio 1124 varones sanos distribuidos en cuatro rangos etarios (RE). El RE de 40-49 años comprendió un 20% de los pacientes, el de 50-59 un 30%, el de 60-69 un 27% y el restante 23% fue mayor de 70 años. La edad promedio de la muestra general fue 59.9 ± 11.0 años.

Los valores de APE según edades y diferentes percentiles obtenidos se muestran en la Tabla 1. Los valores de referencia para cada rango etario se pueden observar en el percentil 95. Resultan además de especial interés los valores de APE comprendidos entre los percentiles 50 y 95, debido a que es donde se observa mayor riesgo de padecer CaP.

Tabla 1. Valores de APE para diferentes RE y percentiles.

Edad (años)	Nº de casos	P(05)	P(10)	P(25)	P(50)	P(75)	P(90)	P(95)
40-49	222	0,33	0,38	0,52	0,70	0,97	1,29	1,63
50-59	334	0,37	0,43	0,62	0,91	1,47	2,20	2,68
60-69	307	0,44	0,55	0,79	1,30	2,24	3,14	3,42
> 70	261	0,66	0,82	1,18	1,75	2,80	3,69	4,10

Para cada RE se obtuvo la media con su respectiva desviación estándar (DE), error estándar (EE) e intervalo de confianza (IC) del 95%. Asimismo, se calculó la mediana con su IC del 95% (Tabla 2).

Por otra parte comparamos los valores de medianas y percentiles 95 informados por el fabricante con los resultados obtenidos de nuestra población en estudio (Tabla 3), observándose diferencias entre los mismos. El percentil 95 calculado para nuestra casuística fue inferior al de ambos estudios para todos los rangos etarios. Además, se encontró una correlación positiva ($r=0,47$) estadísticamente significativa ($p<0,01$) entre APE y edad.

Por último, nos pareció relevante comparar los valores de APE de diferentes zonas geográficas con la población de este estudio (Tabla 4).

Tabla 2. Medias y medianas de cada RE con sus respectivos IC 95%

EDAD (años)	N	MEDIA (ng/ml)	DEM	EEM	IC (95%)	MEDIANA (ng/ml)	IC (95%)
40-49*	222	0,81	0,46	0,03	0,75-0,87	0,70	0,61-0,79
50-59*	334	1,15	0,73	0,04	1,07-1,23	0,91	0,79-1,03
60-69*	307	1,57	0,94	0,05	1,47-1,68	1,30	1,13-1,47
> 70*	261	2,04	1,07	0,07	1,91-2,17	1,75	1,54-1,95

DE: Desviación estándar de la media EE: error estándar de la media

* Existen diferencias estadísticamente significativas entre las medianas para cada RE ($p<0,0001$)

Tabla 3. Medianas y percentiles 95 de los valores de APE informados por el fabricante estratificados por rangos etarios (años).

		40-49	50-59	60-69	Mayores de 70
Mediana	Nuestra Casuística	0,70	0,91	1,30	1,75
	Estudio 1*	0,59	0,75	1,65	1,73
	Estudio 2**		0,81	0,95	1,11
Percentil 95	Nuestra Casuística	1,63	2,68	3,42	4,10
	Estudio 1*	2,00	3,10	4,10	4,40
	Estudio 2**		3,89	5,40	6,22

*Corresponde a una población de dos centros clínicos de Holanda y Alemania. (16)

** Corresponde a una población de EE.UU (16)

Tabla 4. Valores del Percentil 95 de APE según zonas geográficas. Modificada de Gelpi-Méndez y col. (2010)

Zona Geográfica	Rangos etarios (Años)			
	40-49	50-59	60-69	70-79 / >70
Irán^a	1,35	1,85	3,20	4,40
China I^b	1,23	2,35	3,20	3,39
China II^c	2,15	3,20	4,10	5,37
Argentina (Córdoba)^d	1,63	2,68	3,42	4,10
Corea I^e	1,92	2,37	3,56	5,19
Corea II^f	2,00	2,40	3,90	6,30
Japón I^g	2,10	2,90	4,00	5,20
Japón II^h	2,00	3,00	4,00	5,00
Paraguay^{xxi}	2,00	3,24	3,70	
España^j	1,70	3,30	5,18	
EE.UU. (blancos)^k	2,10	3,60	4,30	5,80
EE.UU. (asiático-americanos)^l	2,00	4,50	5,50	6,80
EE.UU. (afroamericanos)^m	2,40	6,50	11,30	12,50
Arabia Sauditaⁿ	2,85	3,99	5,41	6,29
Turquía^o	4,51	4,36	6,17	10,18

^a Mehrabi y col. (17)	ⁱ Lee y col. (21)	^k Morgan y col. (25)
^b He y col. (18)	^g Imai y col. (22)	^l De Antoni y col. (26)
^c Liu y col.(19)	^h Oesterling y col. (23)	^m Morgan y col. (25)
^d Nuestra casuística	ⁱ Blanes y col. (24)	ⁿ Kamal y col. (27)
^e Choi y col. (20)	^j Gelpi-Méndez y col. (14)	^o Müezzinoğlu y col. (28)

DISCUSIÓN

Se pudo demostrar en la población analizada en nuestro trabajo, que los valores de APE incrementan con el aumento de la edad. Harrison y col. (29) también hallaron una relación positiva, pero concluyeron que realizar ajuste en los niveles de APE por edad no mejora significativamente la discriminación de CaP. Por otra parte, para Partin y col. (30) el uso de rangos de referencia específicos por edad para hombres más jóvenes, detectaría un mayor número de tumores operables (30).

Cuando fueron comparadas las medianas y los percentiles 95 de APE de nuestra población con los del fabricante se observaron algunas diferencias. Las medianas varían mucho entre los 60 y 70 años, y el percentil 95 es notablemente más bajo para los pacientes de nuestro laboratorio en todas las edades. Posiblemente, esta discordancia esté basada en el hecho de haber utilizado diferentes poblaciones a la hora de obtener los valores de APE. Como se pudo observar en otros trabajos (25,26), los valores obtenidos para sujetos estadounidenses son en general mayores a los obtenidos en nuestra población. Esto permite destacar la importancia del empleo de valores de referencia propios.

La frecuencia de cánceres detectados en materiales de necropsia es aproximadamente la misma en diferentes partes del mundo (31). Esto contrasta claramente con la incidencia de CaP clínico, que difiere mucho entre distintas zonas geográficas, siendo elevada en hombres de raza negra o de descendencia afroamericana, Estados Unidos y el norte europeo y baja en el sureste asiático (32). Ross y col. (33) postulan que los rangos de referencia específicos de raza no deberían utilizarse dado su baja sensibilidad, pero la variación promedio de APE según la raza debe contextualizarse a la hora de evaluar a cada paciente de manera individual. Las causas de estas diferencias étnicas no están suficientemente aclaradas.

Un dato llamativo informado por Zaridze y col. (34), es que aquellos hombres japoneses que emigran de Japón a Hawai aumentan su riesgo de padecer la enfermedad y cuando emigran a California, su riesgo se incrementa aún más, aproximándose a los valores de los estadounidenses. Este último dato podría indicar la posible existencia de factores ambientales importantes a la hora de evaluar riesgo, como podrían ser el tipo de alimentación, el consumo de alcohol y el estilo de vida.

La variación entre los percentiles 95 obtenidos para distintas poblaciones del mundo, también puede deberse a la metodología empleada para efectuar la medición de APE. Un estudio irlandés llevado a cabo por Forde y col. (35) demostró que la falta de estandarización de los métodos de ensayo conduce a una variabilidad significativa en los valores de APE medidos para las mismas muestras de pacientes.

CONCLUSIONES

En este trabajo, los valores de referencia de APE estratificados por edad, mostraron percentiles 95 inferiores a los informados por el fabricante. Además, el aumento en la edad fue acompañado por un aumento en la concentración de APE. Al comparar los resultados con los de otras poblaciones, se observaron similitudes con los de países del oriente asiático como China, Corea y Japón, pero menores a los publicados en Estados Unidos y países de Asia occidental como Turquía y Arabia Saudita. Estas discrepancias tan marcadas, no sólo entre países de diferentes hemisferios sino también dentro de un mismo continente, sugieren que independientemente de las diferencias étnicas o metodológicas, son sumamente importantes los factores ambientales, como el estilo de vida, la alimentación, el tipo de trabajo, entre otros.

La etapa final del proceso de verificación de métodos es la verificación de los valores de referencia, como se detalla en la guía de la CLSI C28-A3. Esta es una etapa sumamente importante, debido a que de no lograr esa verificación recomendada, será necesario establecer valores de referencia propios. Así, los resultados podrán ser interpretados correctamente por el profesional a cargo, contextualizando a cada paciente en particular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., & Thun, M. J. Cancer statistics. *CA-Cancer J Clin* 2008; 58(2): 71-96.
2. Heidenreich, A., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M. D., Matveev, V., Mottet, N., & Schmid, H. P. Guía clínica sobre el cáncer de próstata. *Eur Assoc Urol* 2010; 1-196.
3. Parkin, D. M., Bray, F. I., & Devesa, S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cáncer* 2001; 37: 4-66.
4. Carter, H. B., Albertsen, P. C., Barry, M. J., Etzioni, R., Freedland, S. J., Greene, K. L., & Penson, D. F. Early detection of prostate cancer: AUA Guideline *J Urol* 2013; 190(2): 419-26.
5. Wolf, A., Wender, R. C., Etzioni, R. B., Thompson, I. M., D'Amico, A. V., Volk, R. J. & DeSantis, C. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update. *CA-Cancer J Clin* 2010; 60(2), 70-98.
6. Steinberg, G. D., Carter, B. S., Beaty, T. H., Childs, B., & Walsh, P. C. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990; 17(4): 337-47.
7. Grönberg, H., Damber, L., & Damber, J. E. Familial prostate cancer in Sweden: a nationwide register cohort study. *Cancer* 1996; 77(1): 138-43.
8. Siegel, Rebecca L.; Miller, Kimberly D.; Jemal, Ahmedin. Cancer statistics, 2016. *CA-Cancer J Clin* 2016; 66(1): 7-30.
9. Eeles, Rosalind A., et al. Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nat Genet* 2013; 45(4): 385-91.
10. Kote-Jarai, Z., et al. BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. *Brit J Cancer* 2011; 105(8): 1230-4.
11. Leongamornlert, D., Mahmud, N., Tymrakiewicz, M., Saunders, E., Dadaev, T., Castro, E., & Sawyer, E. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Brit J Cancer* 2012; 106(10): 1697-1701.
12. Castro, Elena, et al. Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31(14): 1748-57.
13. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level lower or equal to 4.0ng/ml. *New Engl J Med* 2004; 350:2239-46.
14. Gelpi-Méndez, J. A., Gómez-Fernández, E., Martín-Barallat, J., Cortés-Arcas, M. V., Monsonis-Artero, J. V., & Calvo-Mora, A. Valores de referencia del antígeno prostático específico (PSA) en 63.926 trabajadores sin síntomas prostáticos que participaron en el cribado de cáncer de próstata desarrollado por la Sociedad de Prevención de Ibermutuamur durante el año 2006. *Actas Urol Esp* 2010; 34(8): 669-76.
15. Oesterling, J. E., Jacobsen, S. J., Klee, G. G., Petterson, K., Piironen, T., Abrahamsson, P. A., & Lilja, H. Free, complexed and total serum prostate specific antigen: the establishment of appropriate reference ranges for their concentrations and ratios. *J Urol* 1995; 154(3): 1090-5.
16. Total PSA, Cobas. Valores teóricos de PSA. REF 04641655.

17. Mehrabi, S., Shirazi, H. G., Rasti, M., & Bayat, B. Analysis of serum prostate-specific antigen levels in men aged 40 years and older in Yasuj, Iran. *Urol J* 2009; 2(4): 189-92.
18. He, D., Wang, M., Chen, X., Gao, Z., He, H., Zhau, H. E. Nan, X. Ethnic differences in distribution of serum prostate-specific antigen: a study in a healthy Chinese male population. *Urology* 2004; 63(4): 722-6.
19. Liu, Z. Y., Sun, Y. H., Xu, C. L., Gao, X., Zhang, L. M., & Ren, S. C. Age-specific PSA reference ranges in Chinese men without prostate cancer. *Asian J Androl* 2009; 11(1): 100.
20. Choi, Y. D., Kang, D. R., Nam, C. M., Kim, Y. S., Cho, S. Y., Kim, S. J. & Ham, W. S. Age-specific prostate-specific antigen reference ranges in Korean men. *Urology* 2007; 70(6): 1113-6.
21. Lee, S. E., Kwak, C., Park, M. S., Lee, C. H., Kang, W., & Oh, S. J. Ethnic differences in the age-related distribution of serum prostate-specific antigen values: a study in a healthy Korean male population. *Urology* 2000; 56(6): 1007-10.
22. Imai, K., Ichinose, Y., Kubota, Y., Yamanaka, H., & Sato, J. Diagnostic significance of prostate specific antigen and the development of mass screening system for prostate cancer. *J. Urol.* 1995; 154(3): 1085-9.
23. Oesterling, J. E., Kumamoto, Y., Tsukamoto, T., Girman, C. J., Guess, H. A., Masumori, N., & Lieber, M. M. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy Japanese men: lower values than for similarly aged white men. *BJU Int* 1995; 75(3): 347-53.
24. Blanes, M., Velázquez, G., & Cabral, M. Valores de referencia del antígeno prostático específico. *Mem Inst Invest Cienc Salud* 2005; 3(1).
25. Morgan, T. O., Jacobsen, S. J., McCarthy, W. F., Jacobson, D. J., McLeod, D. G., & Moul, J. W. Age-specific reference ranges for serum prostate-specific antigen in black men. *New Engl J Med* 1996; 335(5): 304-10.
26. De Antoni, E. P., Crawford, E. D., Oesterling, J. E., Ross, C. A., Berger, E. R., McLeod, D. G., & Stone, N. N. Age-and race-specific reference ranges for prostate-specific antigen from a large community-based study. *Urology* 1996; 48(2): 234-9.
27. Kamal, B. A., Ali, G. A., & Taha, S. A. Prostate specific antigen reference ranges in Saudi men. *Saudi Med J* 2003; 24(6): 665-8.
28. Müezzinoğlu, T., Lekili, M., Eser, E., Uyanık, B. S., & Büyüksu, C. Population standards of prostate specific antigen values in men over 40: community based study in Turkey. *Int Urol Nephrol.* 2005; 37(2): 299-304.
29. Harrison, Sean, et al. Investigating the prostate specific antigen, body mass index and age relationship: is an age–BMI-adjusted PSA model clinically useful? *Cancer Cause Control* 2016; 27(12): 1465-74.
30. Partin, Alan W., et al. Standard versus age-specific prostate specific antigen reference ranges among men with clinically localized prostate cancer: a pathological analysis. *J Urol* 1996; 155(4): 1336-9.
31. Breslow, N., Chan, C. W., Dhom, G., Drury, R. A. B., Franks, L. M., Gellei, B., & Tulinius, H. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. Collaborative study organized by the International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Int J Cancer* 1977; 20(5): 680-8.

32. Quinn, M., & Babb, P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* 2002; 90(2): 162-73.
33. Ross T1, Ahmed K1, Raison N1, Challacombe B1, Dasgupta P. Clarifying the PSA grey zone: The management of patients with a borderline PSA. *Int J Clin Pract* 2016; 70(11): 950-9.
34. Zaridze DG, Boyle P, Smans M. International trends in prostatic cancer. *Int J Cancer* 1984; 33(2): 223-30.
35. Forde, James C., et al. Standardization of assay methods reduces variability of total PSA measurements: an Irish study. *BJU Int* 2012; 110(5): 644-50.