

## MELANOMA EN ESTADIOS AVANZADOS. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON MUTACIONES DEL GEN BRAF

KATHERYNE KOURY L, YIHAD KHALEK MÉNDEZ, DANIEL LÓPEZ, JONATHAN RODRÍGUEZ  
SERVICIO ONCOLÓGICO HOSPITALARIO DEL IVSS

### RESUMEN

La mitad de los pacientes con melanoma avanzado o metastásico involucran mutaciones del gen BRAF. Esta mutación puntual es referida generalmente como BRAF V600. El objetivo es definir los patrones de mutación del BRAF de los pacientes con melanoma de nuestra población. **MÉTODO:** Investigación de casos, descriptiva y transversal. La muestra fue no probabilística de 20 pacientes, evaluados en el período de mayo de 2013-2014. **RESULTADOS:** La edad fue  $52 \pm 15$  DE años; con un Breslow de 7 mm con DE 4 mm, la sobrevida fue de  $5 \pm 4$  meses; el 55 % sexo masculino. La variedad histológica más frecuente fue la nodular (45 %). El 55 % de los casos tuvo ulceración. Los estadios más frecuentes fueron IIIb (30 %) y IIIc (30 %), solo 3 pacientes (15 %) en estadio IV. La edad resultó estadísticamente significativa ( $P = 0,009$ ) evidenciando que el grupo de pacientes con la mutación tuvo  $44 \pm 12$  años; y los no mutados  $61 \pm 13$  años. El Breslow resultó menor en pacientes con la mutación. Las modalidades de tratamiento registradas fueron cirugía en el 90 % de los pacientes, un 60 % recibió interferón, 45 % ipilimumab y 15 % vemurafenib. No hubo seguimiento del cumplimiento del tratamiento. **CONCLUSIÓN:** La mutación BRAF fue de 50 %. Los datos son similares a los publicados a nivel mundial, incluyendo las características clínicas e inclusive las histológicas inherentes al tumor.

**PALABRAS CLAVE:** Melanoma, avanzado, metastásico, mutación BRAF, terapia target.

### SUMMARY

The half of patients with advanced or metastatic melanoma has mutations of the BRAF gene. This mutation is referred to as the BRAF V600. The aim is to define the BRAF mutation patterns of the patients with melanoma of our population. **METHOD:** Case study, descriptive and cross sectional. The sample was non probabilistic of 20 patients, evaluated in the period of May 2013 to 2014. **RESULTS:** The age was  $52 \pm 15$  years; with a Breslow of 7 mm with SD of 4 mm, the survival was  $5 \pm 4$  months; 55 % were male. The most frequent histological variety was the nodular (45 %). The 55 % of cases had ulceration. The most frequent stages were the IIIb (30 %) and the IIIc (30 %), only 3 patients (15 %) in stage IV. The age was statistically significant ( $P = 0.009$ ), showing that the group of patients with the mutation had  $44 \pm 12$  years; and those not mutated  $61 \pm 13$  years. The Breslow was lower in patients with the mutation. The treatment modalities registered were surgery in 90 % of the patients, 60 % received interferon, 45 % ipilimumab and 15 % vemurafenib. There was no follow-up of compliance with the treatment. **CONCLUSIONS:** BRAF mutation was 50 %. The data are similar to those published worldwide, including the clinical and even the histological characteristics inherent to the tumor.

**KEY WORDS:** Melanoma, advanced, metastatic, BRAF mutation, target therapies.

---

Recibido: 18/04/2017 Revisado: 15/06/2017

Aceptado para publicación: 22/05/2017

Correspondencia: Dra. Katheryne Koury. Av. Alejandro Calvo Laird, El Cementerio. Los Rosales. Caracas, Venezuela. Tel: E-mail:kathkoury@gmail.com

---

## INTRODUCCIÓN

**E**l melanoma en estadios avanzados tiene un pronóstico sombrío y puede ser casi completamente resistente a las modalidades de tratamiento disponibles de quimioterapia. El descubrimiento en 2002 de las mutaciones activadoras del BRAF serina/ treonina kinasa (oncogén homólogo v-raf murino de sarcoma viral B1) en aproximadamente 50 % de los melanomas, dio inicio a una secuencia de eventos en trabajos experimentales con terapias *target*, lo cual llevó, luego de 10 años, al reconocimiento y aprobación de la FDA para uso de ciertas drogas como el vemurafenib <sup>(1)</sup>.

En melanoma, la prevalencia estimada de mutación del BRAF oscila entre 30 % a 70 %. El ensayo clínico reportado con mayor número de pacientes con mutaciones del BRAF V600E contempló un 50 %. Es importante destacar, que las mutaciones del BRAF son más notorias en un subgrupo de pacientes con melanoma, cáncer de tiroides y colon. Existe una fuerte correlación inversamente proporcional entre la edad y la probabilidad de mutaciones del BRAF en melanoma, mientras que es directamente proporcional en el cáncer de tiroides. En pacientes con melanoma, las mutaciones del BRAF son de lesiones con exposición intermedia a los rayos solares, como las de tronco y extremidades, por el contrario, los melanomas de piel crónicamente expuesta al sol o los de áreas sin exposición solar, tienen una baja incidencia de mutaciones <sup>(2)</sup>.

El estudio de las mutaciones puntuales, en este caso del BRAF, permiten conocer de forma indirecta, la posibilidad de tratamiento de un grupo de pacientes con diagnóstico de melanoma en estadios avanzados, y a su vez pueden funcionar como factor pronóstico. El BRAF se considera actualmente un blanco o diana importante en el tratamiento del cáncer, en parte porque está presente en el 7 % de los pacientes afectados y

también porque representa la primera molécula de señalización intracelular activada por mutaciones puntuales para las cuales la terapia con agente único pareciera tener eficacia <sup>(1)</sup>. El tratamiento para el melanoma ha tenido una progresión lenta en las últimas tres décadas, aunque en otros cánceres han habido avances importantes en cuanto a terapias citotóxicas y *target*. Sin embargo, en melanoma, la quimioterapia citotóxica tiene severas limitaciones, no mejora de forma convincente la historia natural de la enfermedad metastásica, y no tiene rol definido en el escenario del tratamiento sistémico <sup>(3)</sup>. El tratamiento con citoquinas tiene un nicho en ambos ámbitos, pero solo confiere un beneficio modesto a un grupo seleccionado de pacientes y bajo un costo elevado de toxicidad. Todo esto, aunado al creciente entendimiento de las rutas de señalización y de cómo su red puede adaptarse a la inhibición del BRAF o de la actividad mitogénica dependiente de proteína quinasa, será el punto de investigación de regímenes basados en combinaciones racionales <sup>(2,3)</sup>.

En 2010 se llevaron a cabo tres ensayos clínicos: el primero, de fase I, para tumores sólidos, incluyendo cáncer colorrectal <sup>(4)</sup>, un segundo ensayo de fase II para melanoma metastásico <sup>(5)</sup>; y un tercer estudio de fase III (BRIM3), comparando vemurafenib con dacarbazina en pacientes con melanoma metastásico sin tratar <sup>(6,7)</sup> que arrojó resultados iniciales positivos, confirmados en 2012 con más datos <sup>(8)</sup>.

En décadas pasadas, las mutaciones de varios oncogenes tales como el BRAF, NRAS, KIT, GNAQ y QNAC 11, ente otros, se han identificado en pacientes con melanoma. De todas estas, definitivamente la mutación del BRAF ha sido la más frecuente <sup>(9)</sup>. Aproximadamente la mitad de los pacientes con melanoma avanzado o metastásico involucran mutaciones del mismo. La gran mayoría de las alteraciones del BRAF presentan cambios o sustitución en la posición

600 de la valina. Esta mutación puntual es referida generalmente como BRAF V600<sup>(10)</sup>. BRAF codifica para una proteína quinasa de serina/treonina del receptor del factor de crecimiento epidérmico, y de la familia RAS de las proteínas G<sup>(11)</sup> los cambios del aminoácido V600 lleva a un cambio conformacional resultando en una actividad constitutiva de quinasa y la fosforilación de objetivos cascada abajo. Aproximadamente 85 %-90 % de las mutaciones del BRAF V600 resultan de la sustitución de valina por ácido glutámico (BRAF V600E)<sup>(12)</sup>.

Con el advenimiento de las terapias *target* se ha incrementado el interés en el potencial terapéutico sobre alteraciones genéticas específicas entre los distintos tipos subclínicos de melanoma. Los cuatro subtipos descritos recientemente son: melanomas no expuestos crónicamente al sol; melanomas en piel sin daño crónico foto inducido, melanomas en piel con daño crónico foto inducido (traducido por la presencia de elastosis marcada); acral: palmar, plantar, lecho ungueal, y melanoma mucoso<sup>(13)</sup>.

## MÉTODO

El estudio es una investigación de casos, descriptiva y transversal. La población estuvo comprendida por los pacientes con diagnóstico de melanoma que ingresaron al servicio. La muestra fue no probabilística y de selección intencional de 20 pacientes de cualquier género, en estadios de la enfermedad III, IV o en estadios precoces que hayan presentado progresión de la enfermedad una vez que fueron tratados inicialmente; y evaluados en el período de mayo de 2013 a mayo de 2014.

## CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes con melanoma en estadios precoces que hayan progresado ya sea bajo tratamiento o

en observación.

Pacientes con melanoma en estadios III y IV.

Pacientes que hayan recibido cualquier línea de tratamiento.

## CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes con melanoma sin tratamiento o tratados en otra institución.

## PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

Una vez seleccionados los pacientes cumplidos los criterios de inclusión y aceptado el consentimiento informado de la investigación, se procedió a evaluar las muestras de tejido disponibles para biopsia, precisando si se trataba del tumor primario o de una lesión metastásica. Una vez cumplido esto, se confirmó la calidad de la muestra y se envió en conjunto con la lámina portaobjetos, el consentimiento informado y el informe de la biopsia coloreada por hematoxilina/eosina e inmunohistoquímica realizados, directamente al laboratorio de biología molecular, el cual, cuenta con la autorización de la FDA para aplicación de la tecnología COBAS.

## TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se calculó el promedio y la desviación estándar de las variables continuas; en el caso de las variables nominales, se calculó sus frecuencias y porcentajes.

Los contrastes de las variables continuas entre grupos se realizaron con la prueba t de Student para muestras independientes; en el caso de las variables nominales, se aplicó la prueba Chi-cuadrado de Pearson.

Los datos fueron procesados con JMP-SAS 11, se consideró un valor estadísticamente significativo si  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran las variables recogidas

**Cuadro 1.** Características de la muestra de los pacientes con diagnóstico de melanoma

Variables	Estadísticos	%
N	20	
Edad (años)	52 ± 15	
Breslow (mm)	7 ± 3	
Sobrevida (meses)	5 ± 4	
Sexo		
Masculino	11	55,0
Femenino	9	45,0
Tipo histológico		
Acral	8	40,0
Extensión superficial	2	10,0
Nodular	9	45,0
No especificado	1	5,0
Ulceración		
Ulcerado	11	55,0
No ulcerado	9	45,0
Región anatómica		
Antebrazo	1	5,0
Área pectoral	1	5,0
Cuello	2	10,0
Cuero cabelludo	2	10,0
Muslo	1	5,0
Pared costal	1	5,0
Primer dedo de la mano	1	5,0
Primer dedo del pie	2	10,0
Región lumbar	1	5,0
Región poplítea	1	5,0
Región pre-esternal	1	5,0
Surco mamario	1	5,0
Talón	2	10,0
Tercer dedo de la mano	1	5,0
Tercer dedo del pie	2	10,0
Estadio		
IIa	1	5,0
IIb	4	20,0
IIIb	6	30,0
IIIc	6	30,0
IV	3	15,0

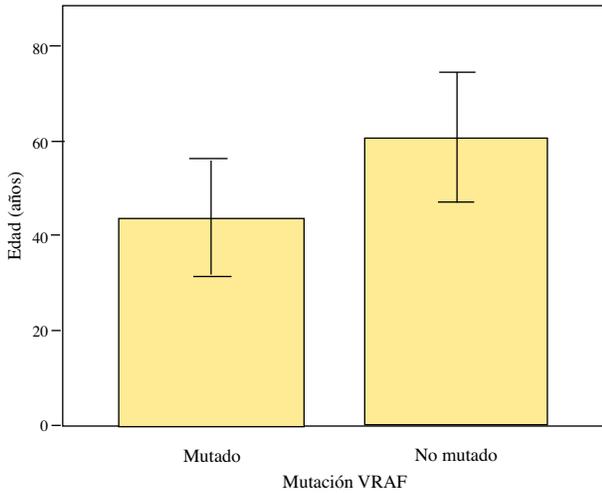
En el Cuadro 2 se muestra la relación de la mutación BRAF respecto a las variables del estudio.

**Cuadro 2.** Relación de la mutación BRAF y las variables del estudio

Variables	Mutación	BRAF %	%	P
n	Si (10)	No (10)		
Edad (años)	44 ± 12	61 ± 13	0,009	
Breslow (mm)	6 ± 2	8 ± 4	0,285	
Sexo				
1,000				
Masculino	6	60,0	5	50,0
Femenino	4	40,0	5	50,0
Tipo histológico				
0,475				
Acral	5	50,0	3	30,0
Extensión superficial	1	10,0	1	10,0
Nodular	3	30,0	6	60,0
No especificado	1	10,0	0	0,0
Estadio				
0,675				
IIa	0	0,0	1	10,0
IIb	3	30,0	1	10,0
IIIb	3	30,0	3	30,0
IIIc	3	30,0	3	30,0
IV	1	10,0	2	20,0

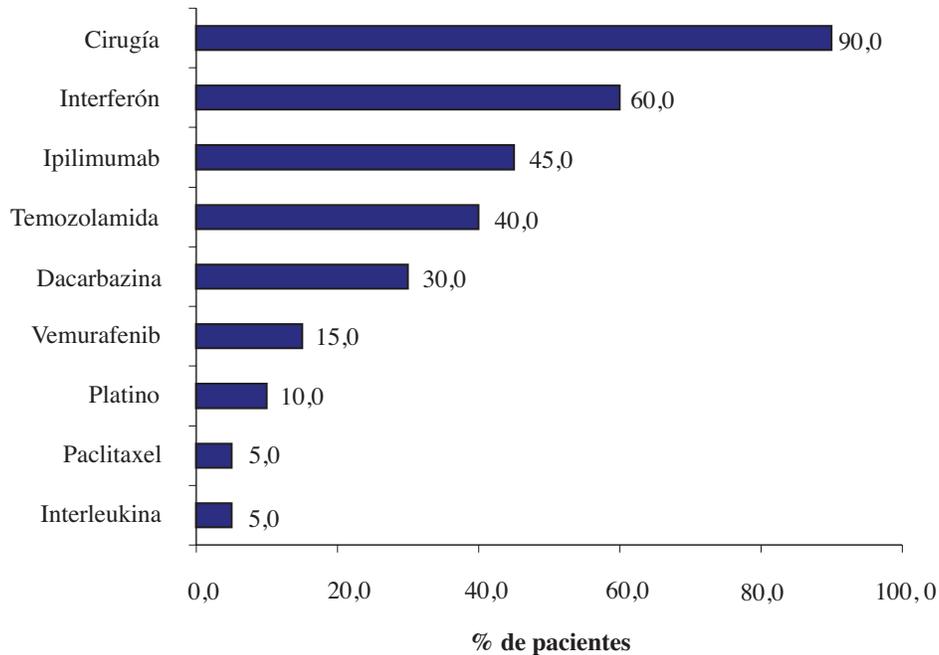
La edad resultó estadísticamente significativa ( $P = 0,009$ ) evidenciando que el grupo de pacientes con la mutación tuvo un rango de edad comprendido entre 44 más o menos 12 años; mientras que los no mutados (*wild type*) mostraron una edad promedio de 61 más o menos 13 años, esto puede evidenciarse en la Figura 1.

En cuanto al sexo, 6 varones y 4 pacientes del sexo femenino presentaron la mutación; mientras que en los no mutados; hubo un 50 % de hombres y un 50 % para el sexo femenino; No se evidenció diferencias entre sexo ( $P = 1,000$ ). El Breslow resultó menor en pacientes con la mutación, oscilando entre 6 mm ± 2 mm de espesor, mientras que los no mutados midieron 8 mm ± 4 mm; pero no fue significativo



**Figura 1.** Relación entre la edad de los pacientes y la mutación del gen BRAF.

estadísticamente ( $P=0,285$ ). El tipo histológico que se repitió con mayor frecuencia fue el acral en 5 pacientes (50 %) y el nodular en 3 pacientes (30 %), pero no se relacionó tampoco con la presencia de la mutación ( $P = 0,475$ ). Los estadios de la enfermedad que presentaron relación con el BRAF mutado fueron el IIB, IIIB y IIIC (30 % cada uno), y el IV con 10 %, no tuvo significancia estadística ( $P = 0,675$ ). Las modalidades de tratamiento registradas fueron cirugía en el 90 % de los pacientes, a pesar de tratarse de casos de enfermedad avanzada, inclusive metastásico, debido a que en algunos casos hubo necesidad de reducir el tumor primario por ulceración y sangrado anemizantes del mismo (2 casos de estadio IV). Las otras modalidades de tratamiento incluyeron la administración de bio-quimioterapia y terapias *target*, un 60 % recibió interferón, 45 % ipilimumab y 15 % vemurafenib (Figura 2).



**Figura 2.** Distribución de los pacientes con diagnóstico de melanoma en estadios avanzados según tipo de tratamiento.

No hubo seguimiento del cumplimiento del tratamiento. La presencia de la mutación BRAF tuvo igual distribución (50 %) que su tipo no mutado en la población estudiada.

## DISCUSIÓN

La prevalencia de mutaciones en el codón 600 de BRAF en pacientes con melanoma va de entre 40 % y 60 %. En nuestra investigación, encontramos un 50 % (n=10) de pacientes portadores de la mutación, coincidiendo en la cifra con otros autores<sup>(2)</sup>. Las mutaciones más prevalentes en melanoma son *BRAF* V600E (sobre el 80 %) y *BRAF* V600K (5 %-30 %); otras mutaciones son raras, aun cuando se han identificado más de veinte. En el ensayo de fase 2 de vemurafenib, 8 % de los pacientes tenía melanoma BRAF V600K. La habilidad de detectar la mutación BRAF V600K también difiere de acuerdo a los métodos usados para probar la mutación. La prueba de mutación COBAS 4800 BRAF V600 (prueba cobas) a pesar de ser específicamente diseñada para detectar la mutación BRAF V600E, detecta 70 % de las mutaciones BRAF V600K y está aprobada por la FDA. A diferencia de BRAF V600E, la frecuencia de BRAF V600K parece incrementarse con la edad<sup>(14)</sup>.

A diferencia de los trabajos publicados a nivel mundial, en los cuales se compara la eficacia del uso de una droga vs., otra, nuestra investigación se centró en describir las características de los pacientes portadores de la mutación, tanto clínicas como demográficas. Por lo tanto, definir qué evidenciamos a un grupo etario portador de la mutación que oscila entre 44 años a diferencia del grupo de los no mutados con 61 años, tuvo significancia estadística (P=0,009); infiriendo que los pacientes más jóvenes son más propensos a ser portadores de la mutación; coincidiendo con la literatura, en la cual existe una fuerte

correlación inversamente proporcional entre la edad y la probabilidad de mutaciones del BRAF en melanoma; no así para los pacientes con cáncer de tiroides, en la cual la correlación se cumple en forma directa<sup>(2)</sup>.

Publicaciones mundiales refieren que en general ha habido un repunte de casos importante en la población menor de 50 años, la cual constituye hasta el 28 % de la población afectada<sup>(15)</sup>.

Con respecto al sexo, no evidenciamos diferencias significativas en cuanto a su presentación (P=1,000). Sin embargo, el 55 % (n=11) fueron del sexo masculino. En el trabajo publicado por Ponti y col., de una muestra de 23 pacientes con la mutación BRAF, el 56 % fueron del sexo masculino<sup>(16)</sup>.

En cuanto a la prevalencia anatómica de aparición del tumor primario, no conseguimos reportes en la literatura, sin embargo, existe una fuerte tendencia a aseverar que la mutación aparece en las zonas del cuerpo sin exposición crónica al sol como el tórax y abdomen<sup>(16)</sup>. En nuestra investigación las localizaciones fueron muy variables, con 14 casos en áreas que pueden considerarse de menor exposición solar crónica (pared costal, surco mamario, región poplítea, región lumbar) a diferencia de 6 localizaciones en áreas foto expuestas como los dedos de las manos y antebrazos; y cabeza y cuello; sin presentar significancia estadística. Como se mencionó previamente, la tendencia revisada en la literatura es que las mutaciones del BRAF en la población caucásica y asiática son de en áreas del cuerpo con exposición solar intermedia<sup>(4,7,9,17)</sup>.

En la muestra se evidenciaron características histológicas como el Breslow promedio de 7 mm (con n=13; 65 % menor de 7 mm), compatible patológicamente con un espesor tumoral extenso, aunado a la ulceración, en un 55 % de los casos. En los análisis cruzados, pareciera existir relación entre los tumores con nivel de Breslow menor y la presencia de la mutación. Con respecto a

esto, no existe reporte en la literatura.

Otro hallazgo de la investigación, fue la sobrevida global de los pacientes, en este caso, se tomó el tiempo promedio desde el momento del diagnóstico de melanoma hasta que fallecieron, observando que fue de 5 meses con una desviación estándar de 4 meses. No fue objetivo registrar sobrevida libre de progresión, pero es pertinente mencionar lo trascendental del ensayo BRIM-3.

BRIM-3 fue un ensayo de fase 3 aleatorizado que comparó el vemurafenib con dacarbazina en pacientes con melanoma inoperable, no tratados previamente de estadio IIIc o IV que eran positivos para la mutación BRAF V600. En los análisis iniciales, pre-especificados para los criterios de valoración co-primarios para la supervivencia general y la supervivencia libre de progresión (30 de diciembre de 2010), el vemurafenib se asoció con reducciones significativas en el riesgo de muerte y ya sea para la muerte o la progresión de la enfermedad, en comparación a dacarbazina. El beneficio con vemurafenib en comparación con dacarbazina se observó a través de los subgrupos de pacientes, incluyendo aquellos con la enfermedad en estadio IIIc y estadio IV, e independientemente de las concentraciones de lactato dehidrogenasa (LDH) <sup>(14)</sup>.

De nuestra investigación podemos concluir que existe una fuerte correlación entre el porcentaje de pacientes en nuestro país, portadores de melanoma, con la mutación del BRAF, en relación con los datos publicados a nivel mundial, siendo las características clínicas e inclusive las histológicas inherentes al tumor, similares a la data publicada previamente, de tal forma que los pacientes en nuestro país son susceptibles a recibir las nuevas líneas de tratamiento, aprobadas para este grupo de pacientes. Existe una diferencia en cuanto a la sobrevida de los pacientes que se tratan con la bio quimioterapia estándar vs., los que reciben terapia dirigida a blancos específicos,

como es el caso de los BRAF mutados, por lo que vale la pena incluirlos en los protocolos de tratamiento. En todo caso, es pertinente ampliar la investigación hacia datos concretos de la respuesta de los pacientes al tratamiento con la terapéutica utilizada previamente y con los regímenes establecidos recientemente por las guías de tratamiento internacional; y registrar los datos nacionales para fundamentar las estrategias de manejo multidisciplinario de nuestros pacientes.

## REFERENCIAS

1. Yazdi AS, Palmedo G, Flaig MJ, Puchta U, Reckwerth A, Rütten A, et al. Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol.* 2003;121:1160-1162.
2. R, Robert C, Chapman PB, Sosman M Middleton L Bastholt, et al. AZD6244 (ARRY-142886) vs. temozolomide (TMZ) in patients with advanced melanoma: An open-label, randomized, multicenter, phase II study. *J Clin Oncol.* 2008;26(15 Suppl):S9033.
3. Thyel A, Moza M, Kytola S, Orpana A, Jahkola T, Hernberg M, Virolainen S, et al. Prospective immunohistochemistry analysis of BRAF mutation in melanoma. *Hum Pathol.* 2015;46:169-175.
4. Sosman JA, Schuchter K, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.* 2012;366(8):707-714.
5. Haass NK, Sproesser K, Nguyen TK, Contractor R, Medina CA, Nathanson KL, et al. The mitogen-activated protein/extracellular signal regulated kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. *Clin Cancer Res.* 2008;14:230-239.
6. Smalley KS, Contractor R, Haass NK, Lee JT, Nathanson KL, Medina CA, et al. Ki67 expression levels are a better marker of reduced melanoma growth following MEK inhibitor treatment than phospho-ERK levels. *Br J Cancer.* 2007;96:445-449.
7. Gopal YN, Deng W, Woodman SE, Komurov K, Ram P, Smith PD, et al. Basal and treatment-induced activation of AKT mediates resistance to cell death by AZD6244

- (ARRY-142886) in Braf-mutant human cutaneous melanoma cells. *Cancer Res.* 2010;70:8736-8747.
8. Smalley KS, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:1136-1144.
  9. Flaherty, Mc Arthur. BRAF a target in melanoma. Implications for solid tumor drug development. *Cancer.* 2010;116(21):4902-4913.
  10. Mandala M, Voit V. Targeting BRAF in melanoma: Biological and clinical challenges. *Crit Rev Oncol Hemat.* 2013;87(3):239-255.
  11. Arkenau HT, Kefford R, Long GV. Targeting BRAF for patients with melanoma. *Br J Cancer.* 2011;104:392-398.
  12. Fischer L, Larkin J. Vemurafenib: A new treatment for BRAF V600E mutated advanced melanoma. *Cancer Manag Res.* 2012;4:243-252.
  13. Curtin LA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:4340-4346.
  14. Chapman P, Hauschild A, Robert C, Haanen J, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2507-2516.
  15. Sakaizawa K, Ashida A, Uchiyama A, Ito T, Fujisawa Y, Ogata D, et al. Clinical characteristics associated with BRAF, NRAS and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci.* 2015;80:33-37.
  16. Ponti G, Tomasi A, Pellacani G. Overwhelming response to Dabrafenib in a patient with double BRAF mutation (V600E y V600M) metastatic malignant Melanoma. *J Hematol Oncol.* 2012;5:60. doi:10.1186/1756-8722-5-60.
  17. Kudchadkar R, Paraiso KH, Smalley KS. Targeting mutant BRAF in melanoma: Current status and future development of combination therapy strategies. *Cancer J.* 2012;18(2):124-131.