

**MESA REDONDA:
MARCADORES DE LA INFLAMACIÓN**
(Moderadora: M.T. Giner)

Marcadores de inflamación en la enfermedad alérgica

María T. Montero Vega

Servicio de Bioquímica-Investigación. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

RESUMEN

La enfermedad alérgica se considera actualmente el resultado de un desequilibrio entre la activación por un alergeno de los linfocitos T reguladores y la respuesta efectora de los linfocitos T2 colaboradores en individuos susceptibles, un proceso en el que las células dendríticas desempeñan un papel fundamental. La falta de regulación de la respuesta inmunitaria origina un estado inflamatorio continuo, constituido por diferentes procesos inmunitarios que se suceden unos a otros y se acumulan en el tiempo. Cada paciente presenta una susceptibilidad genética y ambiental para activar estas respuestas, las cuales a su vez están influenciadas por las dosis y las propiedades químicas del alergeno así como por la vía de contacto. Todo esto produce una gran variabilidad de la respuesta inmunitaria predominante en el proceso inflamatorio pudiendo cursar, la enfermedad, con diversas manifestaciones clínicas. El conocimiento de las principales moléculas que dirigen la inflamación en cada uno de los procesos implicados en la inflamación alérgica facilita el diagnóstico clínico de la enfermedad, el diseño del tratamiento y el control de su evolución. El estudio de los marcadores de la inflamación es una herramienta útil para conocer el tipo de respuesta inmunitaria que predomina en el órgano afectado y controlar la eficacia del tratamiento.

Palabras clave: Inflamación. Alergia. IgE. Linfocitos Th1-Th2. Células dendríticas.

INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD ALÉRGICA

La enfermedad alérgica se ha definido recientemente como “una reacción de hipersensibilidad ini-

ciada por mecanismos inmunes específicos”^{1,2}. En este tipo de patología, el sistema inmune de los individuos enfermos responde de forma aberrante cuando se expone a una dosis de un estímulo definido que no produce daño en las personas sanas. Esta respuesta inmune alterada da lugar a un proceso inflamatorio patológico, reproducible, que provoca síntomas variables en función del órgano afectado y de la cronicidad de la enfermedad y que incluyen rinitis, conjuntivitis, asma, alteraciones en la piel, alteraciones gastrointestinales, y anafilaxia

En la inflamación alérgica podemos distinguir tres fases en las que participan diferentes células y mediadores de inflamación: la fase de sensibilización, la fase efectora, que comprende una fase aguda y una fase tardía facultativa, y finalmente una fase crónica.

SENSIBILIZACIÓN ALÉRGICA, UNA PÉRDIDA DE TOLERANCIA INMUNE

El primer evento patológico que se produce en la enfermedad alérgica es la inducción de una respuesta inmune específica contra un antígeno inocuo del entorno (sensibilización alérgica). En los últimos quince años numerosos trabajos han puesto de manifiesto que en la enfermedad alérgica se produce una respuesta inmune aberrante de tipo Th2, sin embargo los factores que determinan su aparición han empezado a conocerse muy recientemente.

El sistema inmune se encuentra altamente regulado de manera que se produzca una respuesta protectora y equilibrada contra patógenos y se evite una respuesta inadecuada contra antígenos propios o substancias inocuas del entorno. Esta regulación se ejerce a través de mecanismos de tolerancia inmune que impiden la formación de linfocitos T es-

pecíficos potencialmente dañinos, mediante la inducción apoptosis, de anergia, o por ignorancia del antígeno³⁻⁵, o impiden su activación a través de la acción de células T reguladoras (Treg)⁶. Diferentes trabajos publicados recientemente muestran evidencias de que la sensibilización alérgica es consecuencia de un desequilibrio entre tolerancia e inmunidad atribuible a un déficit de células Treg que permite la diferenciación y proliferación de células T colaboradoras de tipo 2, específicas contra alergenos⁷⁻¹⁰.

La capacidad de las células Treg para suprimir una respuesta específica, sin afectar a otros procesos inmunes, tiene un alto potencial terapéutico en la alergia. Existe por tanto un alto interés científico por conocer los mecanismos que regulan la formación de estas células, un proceso activo regulado por las células dendríticas a través de mecanismos complejos y todavía mal conocidos.

LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS: INDUCCIÓN DE UN FENOTIPO TH2 PREFERENTE EN LA ALERGIA

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno profesionales que continuamente fagocitan y analizan antígenos en los tejidos y migran a los nódulos linfáticos donde interactúan con numerosos linfocitos. En ausencia de inflamación, las células dendríticas son inmaduras, e inductoras de anergia y delección, mientras que en un entorno inflamatorio las células dendríticas reciben diferentes señales que inducen su maduración para promover la formación de células T efectoras y T reguladoras^{11,12}. Tres subpoblaciones de células dendríticas maduras: DC1, DC2 y DC se encuentran implicadas en el desarrollo de una respuesta Th1, Th2 o Treg respectivamente¹³⁻¹⁵. Entre los mediadores que condicionan la maduración funcional de dichas células dendríticas, la linfopoietina tímica estromal (TSLP), se describe como un potente inductor y activador de células dendríticas de tipo DC2¹⁶⁻¹⁹ y altos niveles de esta citocina se asocian con la enfermedad alérgica^{20,21}, mientras que IL-10, triptófano y sus metabolitos o vitamina D determinan células dendríticas inductoras de células Treg.

Las células dendríticas son por tanto componentes celulares claves en la inducción de tolerancia o inmunidad²². La alta plasticidad funcional que presentan estas células ante factores del entorno podría permitir su modulación terapéutica para cambiar su función de proinflamatoria a tolerante y abre nuevas expectativas en el diseño de terapias curativas de la alergia²³.

ALTERACIONES EN LA SÍNTESIS DE IgE Y ALERGIA

En la fase de sensibilización el linfocito Th2 generado activa a los linfocitos B del entorno que le presentan el alergeno, induciendo el cambio de clase y su transformación en células plasmáticas, secretoras de IgE específica. Un alto porcentaje de enfermos alérgicos presentan, asociado a su sintomatología, niveles de IgE totales y específica muy elevados en sangre, con clara predisposición genética y/o personal, mientras que otros enfermos desarrollan IgE monoespecífica inductora de síntomas con valores de IgE total en suero normales. En los primeros la alta producción ha sido asociada a polymorfismos genéticos de diversos factores que regulan la síntesis de IgE^{24,25}. Recientemente se ha identificado a la IL-21 como una molécula inhibidora del cambio de clase a IgE, sin afectar la producción de otras inmunoglobulinas²⁶, lo que la convierte en una molécula de posible valor diagnóstico y en objetivo terapéutico.

Un tercer grupo de enfermos alérgicos presentan sintomatología con niveles de IgE en sangre normales y ausencia de IgE específica. Varios trabajos han demostrado que se puede producir un cambio de clase local, tanto en la piel como en la mucosa intestinal y respiratoria²⁷⁻²⁹, que explicaría la existencia de patología, con pruebas cutáneas negativas o niveles sanguíneos de IgE específica bajos. La valoración de IgE específica en secreciones y en heces puede por tanto tener un valor diagnóstico en las alergias con pruebas cutáneas y RAST negativos.

RESPUESTA EFECTORA: FASE AGUDA

Una vez producida, la IgE específica se une a los receptores de alta afinidad expresados sobre los mastocitos y basófilos. Tras una nueva exposición al alergeno se produce el entrecruzamiento de receptores y las células se activan liberando con gran rapidez una serie de mediadores de inflamación, induciendo en el órgano afectado un aumento en la permeabilidad vascular, una vasodilatación y la contracción de la musculatura lisa. Una gran parte de los síndromes alérgicos son consecuencia de esta reacción de hipersensibilidad inmediata, mediada por IgE, que se manifiestan a los pocos minutos del contacto con el alergeno (fase aguda de la alergia), un proceso altamente estudiado y bien conocido.

Además los mastocitos y basófilos activados, liberan diferentes interleucinas de tipo Th2 que promueven la diferenciación de nuevos linfocitos Th2 y la producción, infiltración y activación de monocitos,

neutrófilos y de eosinófilos en el tejido inflamado. Este infiltrado celular es responsable de la respuesta inflamatoria tardía que se produce en las 24-36 horas posteriores a la exposición al alergeno y contribuye a la cronificación de la patología tras contactos repetidos con el alergeno. Además de los efectos inmediatos que los diferentes mediadores ejercen sobre el órgano afectado, ampliamente descritos, algunos de ellos también ejercen una acción inmuno-moduladora, no asociada con manifestaciones clínicas inmediatas pero que contribuye en la evolución de la enfermedad alérgica^{30,31}.

A su vez la IgE, a través de su unión a los receptores de alta y baja afinidad de diferentes células activa otros procesos que contribuyen en el mantenimiento y evolución de la enfermedad alérgica³²⁻³⁴. Además, las células dendríticas capturan el antígeno a través de la IgE unida a su superficie y migran a un nódulo linfático donde inducen nuevas sensibilizaciones que amplifican la respuesta inmune, aumentando el espectro de epítopos reconocidos por esta inmunoglobulina. En el caso de que la célula dendrítica se encuentre en un entorno de mediadores muy distinto al inicial se formaran linfocitos T colaboradores con características efectoras diferentes de los primeros, contribuyendo a la aparición de nuevos síntomas en la enfermedad.

RESPUESTA EFECTORA: FASE CRÓNICA

Los linfocitos Th2, primados para un alergeno determinado, pueden ser extravasados al lugar anatómico en el que se encuentra el alergeno, donde son activados por los macrófagos y células dendríticas, iniciando una reacción de hipersensibilidad retardada, en la que la célula efectora es el eosinófilo. Este tipo de respuesta celular subyace en la mayoría de las manifestaciones crónicas de la alergia. En la mayoría de los procesos crónicos se asocia una respuesta fibrotica que complica la patología.

Es importante destacar que en la activación de una respuesta inmediata se requiere la presencia de la molécula de alergeno entera, mientras que la activación del linfocito T solo requiere la presencia de determinados péptidos³⁵, que no necesariamente contienen epítopos reconocidos por la IgE específica. De esta manera se pueden inducir un síndrome alérgico por mecanismos inmunes no dependientes de IgE. En este sentido se ha observado que durante el proceso digestivo se generan péptidos que no contienen epítopos para IgE pero conservan los epítopos reconocidos por células T³⁶ y se propone que estos péptidos podrían ser capaces de inducir una respuesta inflamatoria tanto lo-

cal como sistémica mediada exclusivamente por la activación linfocitos T colaboradores, en ausencia de IgE³⁵.

Aunque los linfocitos T específicos para un alergeno presentan sobre su superficie moléculas de adhesión que permiten su extravasación selectiva al órgano donde se produjo la sensibilización, se han detectado linfocitos T, específicos para proteínas de la dieta, que expresan moléculas de adhesión que permiten su extravasación a otros tejidos no digestivos^{37,38}. Este hecho justifica que tras la ingesta de un alimento alergénico algunos enfermos presenten síntomas inflamatorios en otros órganos.

Recientemente se ha identificado una nueva interleucina, la IL-17E (también llamada IL-25), que es producida principalmente por linfocitos Th2 capaz de inducir por si sola la patología asociada con la producción de interleucinas Th2³⁹ por lo que debe ser considerada de interés diagnóstico en la alergia.

LINFOCITOS TH1 EN LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA

La participación de células Th1 en la inducción de síndromes alérgicos es mas controvertida ya que conceptualmente la producción de interleucinas Th1 inhiben el desarrollo de la respuesta Th2⁴⁰. Sin embargo se ha observado que la expresión concurrente de interleucinas Th1 y Th2 agrava los síntomas de la enfermedad, principalmente en los procesos crónicos, lo que sugiere que si la producción de células Th1, ocurre una vez que se han primado células Th2, su papel regulador es mucho mas complejo. En la dermatitis atópica se ha observado que en la fase inicial de la enfermedad predominan en la sangre de los pacientes linfocitos Th2 específicos, mientras que en una segunda fase predominan los linfocitos Th1 que causan una lesión eczematosa crónica en la que esencialmente no participa la IgE⁴¹.

Pocas enfermedades inflamatorias han sido asociadas con una producción exclusiva de linfocitos Th1 contra antígenos externos. De entre ellas la enfermedad celiaca^{39,42}, el síndrome de Heiner⁴³, reacciones de hipersensibilidad retardada mediadas por fármacos⁴⁴. Alveolitis alérgicas mediadas por altos niveles de IgG específica¹.

CONTRIBUCIÓN DE LINFOCITOS T CD8+ EN LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA

Diferentes estudios han aportado evidencias de la contribución de los linfocitos T citotóxicos (Tc) en la inflamación alérgica, con una actividad citotóxica aso-

ciada con la intensidad de la patología, con especial importancia en la dermatitis alérgica⁴⁵⁻⁴⁷.

En el asma alérgico, los linfocitos Tc se acumulan en el pulmón tras la provocación con alergenos y durante los episodios agudos. En los casos de asma fatal se ha encontrado una infiltración en el tejido peribronquial. Otros autores dividen funcionalmente a los linfocitos Tc como células efectoras o de memoria y describen que las efectoras de tipo Tc2 contribuyen de manera importante en el asma a través de la producción de IL-13⁴⁸.

VALOR CLÍNICO DE LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN

En la enfermedad alérgica se produce una alteración de la tolerancia periférica, mediada por células Treg, frente antígenos inocuos del entorno. Esta falta de regulación del sistema inmune da lugar a un proceso inflamatorio en continua evolución, en el que se suceden en el tiempo y se suman diferentes respuestas inmunes. Cada paciente presenta una susceptibilidad genética y ambiental propia para activar dichas respuestas, a su vez condicionadas por la dosis y la vía de contacto con el alergeno. Esto da lugar a que la dominancia de las diferentes respuestas en la patología sea altamente variable y la enfermedad se presente con muy diferentes manifestaciones clínicas.

El conocimiento de las principales moléculas que dirigen la inflamación en cada uno de los mecanismos implicados en la inflamación alérgica es una información que facilita el diagnóstico clínico de la enfermedad, el control de su evolución, así como la adecuación de terapia. Por todo ello el estudio de marcadores de inflamación es una herramienta útil para conocer el tipo de respuesta inmune que predomina en el órgano inflamado y controlar la eficacia de la terapia aplicada.

BIBLIOGRAFÍA

- Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56:813-24.
- Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BO, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:832-6.
- Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. 1987;49:273-80.
- Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature*. 1988;335:730-3.
- Goodnow CC, Cyster JG, Hartley SB, Bell SE, Cooke MP, Healy JI, et al. Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv Immunol*. 1995;59:279-368.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
- Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol*. 2002;3:715-20.
- Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+ CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 2004;363:608-15.
- Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:271-83.
- Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:961-8; quiz 969.
- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001;194:769-79.
- Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001;193(2):F5-9.
- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:151-61.
- Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing Thelper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med*. 2003;197:101-9.
- Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2004;5:1124-33.
- Soumelis V, Liu YJ. Human thymic stromal lymphopoietin: a novel epithelial cell-derived cytokine and a potential key player in the induction of allergic inflammation. *Springer Semin Immunopathol*. 2004;25:325-33.
- Yoo J, Omori M, Gyarmati D, Zhou B, Aye T, Brewer A, et al. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J Exp Med*. 2005;202:541-9.
- Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med*. 2005;202:829-39.
- Zhou B, Comeau MR, De Smedt T, Liggitt HD, Dahl ME, Lewis DB, et al. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol*. 2005;6:1047-53.
- Matsuda H, Suda T, Hashizume H, Yokomura K, Asada K, Suzuki K, et al. Alteration of balance between myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1050-4.
- Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D, et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol*. 2005;174:8183-90.
- Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell interactions and cytokine production. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2006;(56):61-80.
- Kuipers H, Lambrecht BN. Modification of dendritic cell function as a tool to prevent and treat allergic asthma. *Vaccine*. 2005;23:4577-88.
- Ono SJ. Molecular genetics of allergic diseases. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:347-66.

25. Vercelli D. Genetics of IL-13 and functional relevance of IL-13 variants. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2002;2(5):389-93.
26. Suto A, Nakajima H, Hirose K, Suzuki K, Kagami S, Seto Y, et al. Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C (epsilon) transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood.* 2002;100(13):4565-73.
27. Durham SR, Gould HJ, Hamid QA. Local IgE production in nasal allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;113(1-3):128-30.
28. Lin XP, Magnusson J, Ahlstedt S, Dahlman-Hoglund A, Hansson LL, Magnusson O, et al. Local allergic reaction in food-hypersensitive adults despite a lack of systemic food-specific IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(5):879-87.
29. Smurthwaite L, Durham SR. Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2002;2(3):231-8.
30. Packard KA, Khan MM. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(7):909-20.
31. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:749-86.
32. von Bubnoff D, Novak N, Kraft S, Bieber T. The central role of Fc epsilon RI in allergy. *Clin Exp Dermatol.* 2003;28(2):184-7.
33. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, et al. The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:579-628.
34. Shi HZ. Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.* 2004;76(3):520-7.
35. Bohle B. T lymphocytes and food allergy. *Mol Nutr Food Res.* 2004;48(6):424-33.
36. Hong SJ, Michael JG, Fehringer A, Leung DY. Pepsin-digested peanut contains T-cell epitopes but no IgE epitopes. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(2 Pt 1):473-8.
37. Abernathy-Carver KJ, Sampson HA, Picker LJ, Leung DY. Milk-induced eczema is associated with the expansion of T cells expressing cutaneous lymphocyte antigen. *J Clin Invest.* 1995;95(2):913-8.
38. Beyer K, Castro R, Feidel C, Sampson HA. Milk-induced urticaria is associated with the expansion of T cells expressing cutaneous lymphocyte antigen. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(4):688-93.
39. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity.* 2001;15(6):985-95.
40. Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100 Suppl 1:137-44.
41. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, et al. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today.* 1998;19(8):359-61.
42. Gianfrani C, Auricchio S, Troncone R. Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunol Lett.* 2005;99(2):141-5.
43. Heiner DC, Sears JW, Kniker WT. Multiple precipitins to cow's milk in chronic respiratory disease. A syndrome including poor growth, gastrointestinal symptoms, evidence of allergy, iron deficiency anemia, and pulmonary hemosiderosis. *Am J Dis Child.* 1962;103:634-54.
44. Gerber BO, Pichler WJ. Cellular mechanisms of T cell mediated drug hypersensitivity. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(6):732-7.
45. Akdis M, Simon HU, Weigl L, Kreyden O, Blaser K, Akdis CA. Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD8 + T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *J Immunol.* 1999;163(1):466-75.
46. Sager N, Feldmann A, Schilling G, Kreitsch P, Neumann C. House dust mite-specific T cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: frequency and lymphokine profile in the allergen patch test. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;89(4):801-10.
47. Yawalkar N, Schmid S, Braathen LR, Pichler WJ. Perforin and granzyme B may contribute to skin inflammation in atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol.* 2001;144(6):1133-9.
48. Miyahara N, Swanson BJ, Takeda K, Taube C, Miyahara S, Kodama T, et al. Effector CD8 + T cells mediate inflammation and airway hyper-responsiveness. *Nat Med.* 2004;10(8):865-9.