

Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP
Programa de Iniciação Científica



**ASSOCIAÇÃO DA TRANSFUSÃO DE CONCENTRADO
DE HEMÁCIAS E ANEMIA COM A OCORRÊNCIA DE
ENTEROCOLITE NECROSANTE EM RECÉM-
NASCIDOS DE MUITO BAIXO PESO: UM ESTUDO
CASO CONTROLE.**

ASSOCIATION BETWEEN RED BLOOD CELLS TRANSFUSION AND
ANEMIA WITH THE OCCURRENCE OF NECROTIZING
ENTEROCOLITIS IN VERY LOW BIRTH WEIGHT INFANTS: A CASE
CONTROL STUDY.

Recife
2013

ASSOCIAÇÃO DA TRANSFUSÃO DE CONCENTRADO DE
HEMÁCIAS E ANEMIA COM A OCORRÊNCIA DE ENTEROCOLITE
NECROSANTE EM RECÉM-NASCIDOS DE MUITO BAIXO PESO:
UM ESTUDO CASO CONTROLE.

Projeto apresentado ao Programa de
Iniciação Científica do IMIP referente ao
processo seletivo do edital PIBIC IMIP/
CNPq 2013.

Autora: Dayana de Lima Mariano

Estudante de Graduação do 6º período do Curso de Medicina

Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS-IMIP)

Endereço: Rua Itaquicé, 287, Ipsep, Recife-PE, CEP: 51350-160

Telefone: 81 9780-2465

Email: dayana20lima@gmail.com

Coautora: Bruna de Aragão Soares Andrade Lima

Estudante de Graduação do 6º Período do Curso de Medicina

Faculdade Pernambucana de Saúde

Endereço: Est. de Aldeia Km 13 Cond. Torquato Castro, Sn, Casa 123, Aldeia dos
Camarás, Camaragibe-PE, CEP: 54783-010

Telefone: 81 97260150

Email: bruna.asal@hotmail.com

Coautora: Jéssica Rosado Maia Jales

Estudante de Graduação do 6º Período do Curso de Medicina

Faculdade Pernambucana de Saúde

Endereço: Av. Conselheiro Aguiar, 3384, apt 202, Boa Viagem, Recife-PE, CEP: 51020-021

Telefone: 81 96938648

Email: jessica_rosado_92@hotmail.com

Orientadora: Taciana Duque Braga

Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente

Coordenadora do Curso de Medicina da Faculdade Pernambucana de Saúde

Telefone: 81 99464149

Email: tacionaduque@fps.edu.br

Coorientadora: Caroline Freitas Timóteo de Lima

Mestranda IMIP

Rua Barão de Souza Leão, 626, apt 304, Boa Viagem, Recife-PE, CEP: 51030-300

Telefone: 81 96627554

E- mail: caroltimoteo@hotmail.com

RESUMO

Objetivo: Este estudo visa determinar a associação entre transfusão de hemoderivados e anemia com a ocorrência de enterocolite necrosante em RNMBP. **Método:** Estudo analítico observacional, do tipo caso-controle que foi realizado no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) no período de setembro de 2012 a julho de 2013. Para determinação da associação entre a variável dependente (ECN) e as variáveis independentes, foi utilizado o teste qui-quadrado de associação, ou o teste exato de Fisher, quando pertinente. Para avaliar a força da associação, foi calculada a Odds Ratio (OR) e o seu intervalo de confiança a 95% (IC 95%). Em todas as etapas da análise foi adotado o nível de significância de 5%. **Resultados:** Entre os recém-nascidos estudados, 21,6% (n=32) receberam hemotransfusão, com maior frequência entre os casos, porém sem diferença significativa. A anemia moderada aumentou chance de ocorrência de ECN em RNMBP (OR 3,48 IC(1,68-7,21)). **Conclusão:** A associação entre hemotransfusão e ECN não foi significativa, entretanto foi demonstrado que a anemia moderada aumentou a chance de ocorrência de ECN em RNMBP. Alguns estudos apontam que não se sabe ao certo se a anemia é causa ou consequência da ECN, pois considera-se que em 34% dos casos de enterocolite pode ocorrer uma anemia hemolítica. Mais estudos são necessários para , melhor definição da associação entre hemotransfusão, anemia e ECN.

Palavras chaves: Enterocolite necrosante (ECN); hemotransfusão; anemia; recém-nascido de muito baixo peso (RNMBP).

ABSTRACT

Objective: determine the linkage between blood transfusion and anemia with the occurrence of NEC in VLBW Infant. **Method:** Analytical observational; a case-control study was conducted at the Institute of Medicine Professor Fernando Figueira (IMIP), from September 2012 to July 2013. Aiming to determine the linkage between the dependent variable (NEC) and the independent variables the associational qui-square test or Fisher's exact test were used when appropriate. To assess the strength of the linkage the Odds Ratios (OR) and its confidence interval (CI 95%) were calculated. Along the analysis a significance level of 5% was adopted. **Results:** Among the newborns studied 21.6% (n = 32) received blood transfusions, however with no significant difference those were more frequent in the subject-cases. A moderate anemia increased the chance of occurrence of NEC in VLBWI (OR 3.48 CI (1.68 to 7.21)). **Conclusions:** The linkage between blood transfusion and NEC was not significant, nevertheless from the data collect can be said that moderate anemia increases the chance of occurrence of NEC in VLBW Infant. It is unclear if the anemia is the cause or the consequence of NEC because 34% of the enterocolitis cases can be followed by hemolytic anemia. More studies are therefore needed to better define the linkage between blood transfusion, anemia and NEC.

Keywords: Necrotizing enterocolitis (NEC), red blood cells transfusion, anemia, newborn very low birth weight (VLBW).

I - Introdução

A enterocolite necrosante (ECN) é uma doença de ocorrência pós-natal, de alta letalidade que acomete preferencialmente os recém-nascidos pré-termos (RNPT), principalmente aqueles com peso inferior a 1500g (recém-nascido de muito baixo peso), caracterizada por inflamação e necrose do trato gastrointestinal ¹.

Os sinais e sintomas da ECN variam desde um quadro de intolerância alimentar, seguido de distensão abdominal, eliminação de sangue nas fezes, e nos casos mais graves, evolução para perfuração intestinal, sinais e sintomas da resposta inflamatória sistêmica e choque. Apesar de quadro clínico semelhante, nas crianças a termo a ECN ocorre em idade mais precoce - dentro da primeira semana de vida - e está geralmente associada a eventos hipóxico-isquêmicos perinatais, cardiopatia congênita, anomalias intestinais e uso de drogas ilícitas pela mãe. No prematuro, a idade de início do quadro é inversamente proporcional à idade gestacional e tem na imaturidade funcional do intestino um dos fatores mais referidos como responsável pela sua patogenia¹⁻³.

A enterocolite necrosante tem uma prevalência média de 7% em RN de muito baixo peso e a letalidade varia entre 15% a 30% , sendo tanto mais elevada quanto menor o peso e a idade gestacional ao nascimento. Aproximadamente 27 a 40% das crianças afetadas necessitam de tratamento cirúrgico com maior risco de óbito e complicações. Recém-nascidos com ECN apresentam período de internação prolongado, variando de 22 a 60 dias, sendo esse tempo superior quando comparado ao de outros prematuros que não apresentam esse quadro. As complicações da ECN não são apenas relacionadas ao trato digestório, atraso no neurodesenvolvimento têm sido descritos em RN que foram acometidos de ECN, principalmente naqueles que

necessitaram de tratamento cirúrgico, traduzindo, provavelmente, repercussões sistêmicas de um padrão imaturo de resposta inflamatória ^{2,4}.

Apesar de a ECN ser uma doença predominantemente associada a fatores nutricionais, sabe-se que o prematuro de muito baixo peso é submetido a diversos procedimentos e intervenções, durante sua permanência na unidade neonatal, que podem torna-lo ainda mais susceptível a essa doença. Portanto, fatores não nutricionais também podem estar envolvidos na etiopatogenia da doença, como vem sido sugerido recentemente, enquanto outros poderiam atuar na sua prevenção. ⁵

Entre os fatores não nutricionais, a transfusão de concentrado de hemácias vem sendo associada com o aumento do risco de desenvolvimento de ECN precocemente em recém-nascidos prematuros. ⁶ Considera-se que a hemotransfusão pode alterar a resposta do fluxo da artéria mesentérica superior à dieta do prematuro, justificando o surgimento da doença ⁶. Por outro lado, alguns autores atribuem ao maior tempo de estocagem da bolsa de sangue, que acarretaria na redução da atividade do óxido nítrico presente no hemoderivado, diminuindo sua capacidade vasodilatadora. ^{7,8,9}

Sugere-se ainda que, a anemia, e não fatores relacionados à transfusão causariam hipóxia e lesão isquêmica da mucosa intestinal nesses recém-nascidos e, a utilização de concentrado de hemácias levaria a uma lesão de reperfusão em um intestino que sofreu hipóxia ¹⁰. O temor da ocorrência desse desfecho tem modificado algumas rotinas relacionadas ao manejo nutricional do RNMBP, como a suspensão da dieta diante da necessidade de uso de hemoderivados, mesmo sem evidências suficientes para justificá-las.

Verifica-se, portanto, que dentro da multicausalidade, a ocorrência de ECN pós hemotransfusão tem despertado o interesse de diversos pesquisadores sendo necessário ampliar o conhecimento sobre essa associação.

Esse estudo teve como objetivo geral determinar a associação de transfusão de concentrado de hemácias e de anemia com a ocorrência de enterocolite necrosante em recém-nascidos prematuros de muito baixo peso.

II. Método

Foi realizado um estudo analítico observacional, do tipo caso-controle no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), localizado em Recife-Pernambuco, que atende a uma clientela do SUS. Possui uma unidade neonatal de alto risco, a qual é referência para a região, com 18 leitos de cuidados intensivos e 32 leitos de cuidados semi-intensivos. A população do estudo foi composta pelos recém-nascidos que foram admitidos na unidade neonatal do IMIP, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2007, com peso de nascimento menor ou igual a 1500g, que integraram o banco de dados da tese de doutorado de Braga, TD¹¹. Foram definidas como casos os RNMBP que tiveram o diagnóstico de ECN até 30 dias de vida e para o grupo controle, aqueles com a mesma categoria de peso ao nascer, mas que não desenvolveram a doença no primeiro mês de vida. No Banco do estudo primário, foram excluídas as crianças que foram a óbito nas primeiras 24 horas de vida, com malformações congênitas graves, síndromes genéticas e/ou infecções congênitas diagnosticadas ao nascimento.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa Open Epi versão 2.3 (Atlanta, GA), tomando-se como base a ocorrência hemotransfusão. De acordo com estudo de Agwu e Narchi, 2005,¹² uma frequência de hemotransfusão até 72 horas antes do surgimento de enterocolite foi de 63% nos casos e 24,3% nos controle. Para um erro alfa de 5% e um poder de 80%, seriam necessários 19 casos e 37 controles. No entanto, como o banco de dados já dispõe de 55 casos de enterocolite, foram analisados os 55 casos e em uma proporção de 1: 2, 110 controles, com um total de 165 recém-nascidos.

A variável desfecho (ECN) foi definida pelo estágio maior ou igual a 2 pelo critério de Bell modificado por Wash e Kliegman¹³ e as variáveis independentes foram

o menor hematócrito (%) apresentado pelo RN e registrado no prontuário, recodificada para hematócrito menor que 35% ou maior ou igual a 35%, identificando-se os casos de anemia moderada conforme o College of American Pathologists Neonatal Red Blood Cell Transfusion Guidelines,¹⁴ e hemotransfusão 72 horas antes do primeiro sintoma apresentado pelo caso e registrado no prontuário. Nos controles, foi considerada a presença de qualquer hemotransfusão até o dia de vida de início dos sintomas do caso correspondente. Foram estudadas algumas variáveis de controles como peso de nascimento, idade gestacional, condições de nascimento e variáveis relacionadas à nutrição do recém-nascido durante o período de observação.

A coleta de dados foi realizada utilizando-se formulário estruturado. As informações foram preenchidas pelas pesquisadoras a partir de informações contidas no banco de dados preexistente e nos prontuários arquivados e através de informações colhidas na Unidade transfusional do hospital. A coleta das informações foi realizada apenas pelas pesquisadoras, que revisaram cuidadosamente cada formulário preenchido e conferindo-os em blocos de dez, recorrendo aos prontuários caso fossem verificadas inconsistências ou incorreções dos dados.

Os dados foram digitados em banco de dados específico criado no programa Epi. Info 3.5.3 (Atlanta, GA). Foi realizada dupla entrada de dados em épocas e por pessoas diferentes, visando a minimizar erros de digitação. Depois de completada a digitação dos bancos de dados, estes foram comparados e corrigidas eventuais inconsistências.

A análise de dados foi realizada no programa de domínio público Epi Info versão 3.5.2 (Atlanta, GA) e no programa MedCalc versão 11.7 (© 1993-2011 MedCalc Software bvba - Bélgica).

Para análise descritiva, foram calculadas medidas de tendência central e de dispersão para as variáveis numéricas e construídas tabelas de distribuição de frequência para as variáveis categóricas.

Para determinação da associação entre a variável dependente (ECN) e as variáveis independentes, foi utilizado o teste qui-quadrado de associação, ou o teste exato de Fisher, quando pertinente. Para avaliar a força da associação, foi calculada a Odds Ratio (OR) e o seu intervalo de confiança a 95% (IC 95%). Em todas as etapas da análise foi adotado o nível de significância de 5%.

Em seguida, foi realizada análise de regressão logística múltipla, selecionando-se inicialmente para o modelo todas as variáveis que tinham apresentado na análise univariada associação significativa com o desfecho (enterocolite) ao nível de significância de 20%. Em seguida, usando-se um modelo de regressão *stepwise* pelo método *backward* foram retiradas progressivamente do modelo as variáveis que não se mantinham associadas ao desfecho ao nível de significância de 5%, até que restaram apenas as variáveis significativamente associadas ao desfecho ao nível de 5%.

O protocolo de pesquisa do estudo original e do estudo atual foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa do IMIP sob os números 1420 e 3500, respectivamente.

III – Resultados

Foram estudados 51 RNMBP com ECN (casos) e selecionados 102 RNMBP sem a doença como controles para o estudo. Destes 102 controles, apenas 97 foram incluídos na pesquisa, pois cinco apresentaram algum critério de exclusão já descrito ou seus prontuários não foram localizados

Não foram observadas diferenças entre os casos e controles em relação à idade gestacional (respectivamente 30,1 (DP 2,0) X 30,7 (DP 1,9) semanas, $p=0,2$), peso de nascimento (1135,1(DP 150) X 1186,2 (DP 190) em gramas $p=0,13$), assim como na distribuição quanto ao sexo.

Na Tabela 1 estão apresentadas as variáveis relacionadas à dieta enteral e condições de nascimento, observando-se associação entre o APGAR abaixo de 7 e ocorrência de ECN. A quantidade de recém-nascidos que atingiu a dieta enteral plena foi menor entre os casos quando comparado aos controles. Não houve diferença em relação à velocidade de progressão da dieta.

Entre os recém-nascidos estudados, 21,6% ($n=32$) receberam hemotransfusão, com maior frequência entre os casos, porém sem diferença significativa ($OR=1,4$; $p=0,41$).

Avaliando-se os recém-nascidos com hemotransfusão prévia, não houve diferença entre os casos e controles quanto a presença ou não de dieta durante a hemotransfusão, ao volume de dieta oferecido no dia da hemotransfusão e ao número de hemotransfusões prévias (Tabela 2). Os RN com anemia apresentaram maior chance de desenvolver ECN e essa diferença foi a única que se manteve na análise multivariada (Tabela 3).

IV- Discussão

Foi demonstrado nesse estudo que a anemia moderada aumentou a chance de ocorrência de ECN em RNMBP. Rachana et al demonstrou que a queda de um ponto no Hematócrito esta associada ao aumento de 10% nas chances do RNMBP desenvolver ECN e que o uso de ferro terapêutico reduziria o risco de desenvolver a doença.¹⁰ A correlação dos baixos níveis de Hct com a ECN pode ser explicada pela diminuição da oferta de oxigênio para níveis menores do que os exigidos para crescimento tecidual adequado, ocasionando aumento do metabolismo anaeróbico e a consequente produção de subprodutos, como o ácido lático. O prejuízo que a anemia causa às alterações vasculares intestinais basais que marcam a transição do período fetal para a vida neonatal, são também considerados, e como consequência desses efeitos deletérios, a mucosa e o endotélio intestinal sofrem apoptose, caracterizando o surgimento da ECN.¹⁰

Não foi identificada associação, entre hemotransusão até 72 horas antes do início dos sintomas e ECN, apesar de alguns estudos mostrarem a existência desta associação.^{9,10,15,16} Especulamos que o reduzido número de hemotransfusões pode ter contribuído para não identificar essa associação ou de fato comprovar que ela não existe. Por outro lado, considera-se ser mais provável o desenvolvimento da doença nas primeiras 48h após a transfusão de concentrado de hemácias, havendo uma redução na incidência da doença após 96h do procedimento.^{9,10} Questionamos se a incidência da doença começaria a diminuir após as 72h da transfusão e não somente a partir de 96h dessa última. Apesar de alguns autores recomendarem a suspensão da dieta do RN que fará hemotransusão, nesse estudo não observou-se associação entre esses eventos.

Alguns estudos apontam que não se sabe ao certo se a anemia é causa ou consequência da ECN ⁹. Pois, considera-se que em 34% dos casos de enterocolite ocorre uma anemia hemolítica através da ativação de criptantígeno T presente nas hemácias, após exposição a fatores inflamatórios (neuraminidases), resultando em anemia, necessidade de hemotransfusão e pior prognóstico¹⁷.

Diante da multicasualidade da ECN, alguns fatores não relacionados à estratégia da dieta enteral precisam ser considerados, dentre eles a anemia e hemotransfusão. Esse estudo identificou uma associação entre anemia e a ocorrência de ECN, entretanto mais estudos são necessários para melhor compreensão dessa associação.

Tabela 1: Condições de nascimento e características da dieta enteral de RNMBP com e sem enterocolite necrosante.

Variável	Enterocolite Sim		Enterocolite Não		OR	IC 95%	P*
	n	%	n	%			
Apgar no 1º minuto							
<7	27	54	35	36,5	2,05	1,02-4,1	0,04
> ou = 7	23	46	61	63,5	1,00		
Apgar no 5º minuto							
<7	8	15,7	7	7,2	2,39	0,81-7,02	0,10
> ou = 7	43	84,3	90	92,8	1,00		
< ou = 2	35	71,4	75	77,3	1,00		
Idade de início da dieta (dias)							
>1	24	49,0	43	44,3	1,21	0,61-2,4	0,59
< ou =1	25	51,0	54	55,7	1,00		
Tipo de dieta							
Artificial	26	54,2	50	58,8	0,83	0,41-1,69	0,6
Natural	22	45,8	35	41,2	1,00		
Volume progressão da dieta (ml/Kg/dia)							
> 25	22	44,9	38	41,3	1,16	0,58-2,33	0,68
< ou = 25	27	55,1	54	58,7	1,0		
Dieta plena até idade avaliada							
Sim	18	36,0	53	54,6	0,47	0,23-0,94	0,03
Não	32	64,0	44	45,4	1,00		

*p<0,05 , OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança, n= número de recém nascidos (FONTE: Dados da pesquisa)

Tabela 2: Hemotransfusão e anemia moderada em RNMBP com e sem ECN.

Variável	Casos		Controles		OR	IC 95%	P*
	n	%	n	%			
Anemia							
Sim	31	64,6	32	34,4	3,48	1,68-7,20	0,001
Não	17	35,4	61	65,6	1,00		
Hemotransfusão prévia (30 casos)							
Até 72h nos casos (Sim)	13	25,5	19	19,6	1,4	0,63-3,14	0,41
(Não)	38	74,5	78	80,4	1,0		
Dieta na hemotransfusão							
Sim	11	91,7	15	78,9	2,93	0,29-30,01	0,62**
Não	1	8,3	4	21,1	1,0		
Hemotransfusões							
X ± DP	2,06	0,96	1,74	±0,8	0,7		
Mediana (IIQ)	1 (1-3)	2 (1-2)					

*p<0,05 , **Teste de Fisher, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança, n= número de recém nascidos, X= média, DP= desvio-padrão, IIQ= intervalo interquartil (FONTE: Dados da pesquisa)

Tabela 3: Análise multivariada. Fatores associados à enterocolite necrosante em RNMBP.

TERMO	Odds Ratio	IC 95%	Coeficiente	Erro padrão	P
Anemia	3,48	1,68-7,21	1,25	0,37	0,0008
CONSTANTE	*	*	-1,28	0,27	0,0000

p<0,05 , IC= intervalo de confiança

V- Referências bibliográficas

1. Neu, j.; Douglas-escobar, m. Necrotizing enterocolitis: pathogenesis, clinical care and prevention. In: NEU, J. Gastroenterology and Nutrition: Neonatology Questions and Controversies. Philadelphia: Saunders, 2008.
2. Lin, P. W.; Stoll, B. J. Necrotizing enterocolitis. *The Lancet*, v. 368, n. 9543, p. 1271-1283, Oct. 2006.
3. Lin, p. W.; nasr, t. R.; stoll, b. J. Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention. *Semin Perinatol*, v. 32, n. 2, p. 70-82, Apr. 2008.
4. Stoll, B. J. et al. Neurodevelopment and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA*, v. 292, n. 19, p. 2357-2365, Nov. 2004.
5. Gagliardi L, Bellu R, Cardilli V, *et al.* Necrotising Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants in Italy: Incidence and Nonnutritional Risk Factors. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2008;47:206–210.
6. Francesco Morini, MD, Pietro Bagolan, MD. Transfusion-related necrotizing enterocolitis. *J.jpeds*.2011.05.047.
7. Valieva OA, Strandjord TP, Mayock DE, Juul SE. Effects of transfusions in extremely low birth weight infants: a retrospective study. *J Pediatr*. 2009;155: 331-7.
8. Christensen RD, Lambert DK, *et al.* Is “transfusion-associated necrotizing enterocolitis” an authentic pathogenic entity? *Transfusion*. 2010;50: 1106-1112.
9. David A. Paul, MD, Amy Mackley, RN, Alexandra Novitsky, MD, Yong Zhao, MD, Alison Brooks, BS and Robert G. Locke, DO. Increased Odds of Necrotizing Enterocolitis After Transfusion of Red Blood Cells in Premature Infants. *Pediatrics* 2011;127;635
10. Rachana Singh, MD, MS, Paul F. Visintainer, PhD, Ivan D. Frantz III, MD, Bhavesh L. Shah, MD, Kathleen M. Meyer, MD, Sarah A. Favila, Meredith S.

- Thomas, and David M. Kent, MD. Association of necrotizing enterocolitis with anemia and packed red blood cell transfusions in preterm infants. *J Perinatol*. 2011 March ; 31(3): 176–182. doi:10.1038/jp.2010.145.
11. Braga TD. Enterocolite necrosante em recém nascidos de muito baixo peso: tendência, fatores associados e papel dos probióticos na prevenção [tese]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2010.
 12. Agwu JC, Narchi H. In preterm infant, does transfusion increase the risk of necrotizing enterocolitis? *Arch Dis Child*. 2005;90:102-3.
 13. WALSH, M. C.; KLIEGMAN, R. M. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. ***PediatrClin North Am.***, v. 33, n. 1, p. 179-201, Feb. 1986.
 14. College of American Pathologists Neonatal Red Blood Cell Transfusion Guidelines, 2a Edition Red Cross edit
 15. Ghirardello, S, MD, *et al.* Necrotizing enterocolitis and red blood cell transfusion. 10.1016/j.jpeds.2011.03.027
 16. Christensen, R. D, MD. Association between red blood cell transfusion and necrotizing enterocolitis. 10.1016/j.jpeds.2010.10.030
 17. Kling PJ, Hutter JJ. Hematologic Abnormalities in Severe Neonatal Necrotizing Enterocolitis: 25 Years Later. *Journal of Perinatology*. 2003; 23:523–530.