

NEFROLOGIA

OXIDO NITRICO
Y SU RELACION CON EL RIÑON

Sergio A. Herra Sánchez, M.B.A.

SUMMARY

We have reviewed about participation of nitric oxide in vasodilatation and vasoconstriction in the kidney. Also we analyzed his participation in some kidney pathologies, drug interactions, therapeutic options in some pathologies.

INTRODUCCION

Fue sugerido en 1987 que el derivado del endotelio, factor relajante era simplemente el óxido nítrico (38). Posteriormente Palmer mostró que el óxido nítrico (ON) es formado endógenamente en las células endoteliales como L-arginina como precursor (1,5,9,14,19,21,31,46). El óxido nítrico constitutivo (cNOS) se ha identificado en las células de la mácula densa y en el aparato yuxtaglomerular

del riñón (17,32,55). Su vía de excreción es a través del aire exhalado pulmonar, la mayor parte es metabolizado por los glóbulos rojos, donde es convertido a nitrato y metahemoglobinemia, el nitrato entra al plasma y eliminado por vía renal (56).

INHIBICION Y TOXICIDAD DE NOS

Se han desarrollado diversas formas de inhibidores de NOS, algunos de uso in vitro y otros en fase experimental. Los radicales libres destruyen el óxido nítrico. La mayor toxicidad del NO inhalado parece ser no por se sino por la formación de NO₂ y metahemoglobinemia (31). De acuerdo a las conclusiones del Instituto Nacional de Corazón, Pulmón y Sangre, el ON se debe administrar en tanques previamente calibrados, cuyas con-

centraciones no excedan 1000 ppm, los sistemas para respirar NO deben estar adecuadamente calibrados, se deben realizar mediciones continuas o intermitentes de metahemoglobina y NO₂ (57).

BIOQUIMICA DEL OXIDO NITRICO

Estudios recientes han revelado que el ON endógeno, es generado en varios tejidos en diversas isoformas de NO sintetasa (NOS), que cataliza la oxidación en el electrón 5 de la guanidino nitrógeno de la L-arginina a citrulina, vía N-hidroxil-L-arginina. El NOS puede ser dividido en dos categorías mayores:

1) NOS constitutivo (cNOS), que es regulado por Ca⁺⁺ y calmodulina, que puede ser estimulada por bradikina, acetilcolina, calcio ionoforo,

histamina, leucotrienos, factor activador de plaquetas y otros mediadores (11,17,37,41,47,55).

2) Una citokina inducible, Ca^{++} independiente, inducible NOS (iNOS) que no es conocida que sea regulada postranscripcionalmente (31, 41), aunque se han identificado estimuladores como citokinas y endotoxinas en las células mesangiales renales de ratas y túbulo proximales humanos (46,55). La producción de óxido nítrico es controlada por tres enzimas que lo sintetizan: el NOS, eNOS y bNOS que son regulados en parte por la Calmodulina y las formas inducibles (iNOS) (5,17,19). La actividad de iNOS es regulada frecuentemente por los niveles de expresión, usualmente por citokinas y lipopolisacáridos bacterianos (LPS) (19,46,50,55). Las rutas celulares y el destino celular del NO han sido entendidas recientemente, las potenciales rutas son el endotelio vascular, los macrófagos, los neutrófilos, las células del músculo liso, las neuronas no adrenérgicas, colinérgicas, las células epiteliales, los mastocitos, las plaquetas y los fibroblastos (11,33,41). Su vida media es muy corta. Ahora se reconocen algunas funciones del óxido nítrico como relajante del músculo liso, modulador de la función plaquetaria, neurotransmisor, bactericida, participador en el proceso de lisis de células tumorales, liberador de hormonas y modulador de función inmune, así como su participación en el tono vascular, desempeñando un papel en el mantenimiento de la hemodinámica sistémica basal, a través vasodilatación (1,3,5,10, 14,19,33,47,54), funcionando conjuntamente con el factor natriurético atrial por estímulo de la síntesis de

cGMP (24). De esta forma se ha demostrado que los radicales hidroxilo están envueltos en la patología mientras que factores antioxidantes pueden tener funciones protectoras (15,16), especialmente a través de la regulación hemodinámica renal y funciones excretoras (14,26), en el balance glomérulo-tubular (32) y a través de la regulación genética de la eritropoyetina (6,39,58). En la injuria celular epitelial hipóxica e isquémica, frecuentemente ocurre inflamación o activación de la cascada de la coagulación. Durante este tipo de injuria los niveles de autocoides y péptidos como el tromboxano, trombina, angiotensina II y bradikinina se elevan. En respuesta a estos insultos la producción epitelial celular de óxido nítrico y calcio intracelular se elevan (1,3,21,26,33,49,52,58), asimismo la osteopontina tiene un efecto protector del hueso y es responsable por la falla de la inducción del iNOS en las células epiteliales renales (3,17,28), aumenta la producción de CO que juega un papel fisiológico importante en las interacciones entre el músculo liso celular y el endotelial, modulando además el tono de los vasos sanguíneos en respuesta a la hipoxia (8,14,39,58). Se ha visto que se produce en exceso por la vasculatura de animales cirróticos, así como en los pacientes, considerándose como un causante de la circulación hiperdinámica, y de esta forma juega un papel importante en la patogénesis de la vasodilatación arterial asociada a la cirrosis (28), así como en la insuficiencia cardíaca crónica, contribuyendo a mantener flujos regionales y jugando un papel en el mantenimiento de la filtración glomerular y el flujo plas-

mático renal (14,29), de igual manera la relajación vascular inducida por la acetilcolina requiere un endotelio intacto, que responde a la liberación del óxido nítrico e induce vasorelajación (5,13,14,18). Bajo condiciones basales, la producción tónica del óxido nítrico, participa en el mantenimiento del tono vascular sistémico y local, incluyendo el tono vascular renal (19,53). Los marcados efectos hemodinámicos renales de sustancias que inducen la producción de óxido nítrico como la bradikinina, la acetilcolina, la inhibición de la liberación de renina, la producción de endotelina, la interacción entre Angiotensina II y III con la IV y la hiperinsulinemia, sugieren un posible papel de esta sustancia en la vasodilatación renal (3,5,13,14,37,53), así como en la apoptosis, asociado a la adhesión de moléculas de células mesangiales (12,52), también se ha asociado con carga de amino ácidos, carnes y alta ingesta proteica. Hay evidencia de producción del óxido nítrico renal en la participación de la respuesta a la carga de amino ácidos (18). También se ha encontrado una serie de alteraciones bioquímicas que llevan al trastorno en la hemostasis primaria en la insuficiencia renal crónica, tales como desórdenes en la ciclooxigenasa plaquetaria, disminución en la producción del tromboxano A2 en plaquetas, aumento de la producción de óxígeno nítrico y prostaciclina en la pared de los vasos, así como otros desórdenes (36), participando en la progresión de la enfermedad renal, incluyendo la nefropatía diabética por daño tubular temprano (13,20,35,41, 48), así como también daño oxidativo en hemodiálisis (4). Igualmente se ha

demostrado que el óxido nítrico participa en enfermedades renales agudas o crónicas, de injuria inmune o no inmune, haciendo del riñón un órgano único dentro de los trastornos envueltos, variando de un espectro de enfermedades no relacionadas, desde enfermedad de cambios mínimos hasta nefropatía obstructiva (2,15), en estas entidades se ha visto la formación del ataque a la membrana por complejos C5b-9, teniendo la variedad de factor protector o de ataques dependiendo de la injuria causada por la oxidación (43,55), en el caso de enfermedad glomerular, causa un aumento de la permeabilidad glomerular a las macromoléculas (2,43). La interacción de monocitos - macrófagos con las células glomerulares mesangiales juega un papel importante en la enfermedad glomerular por complejos inmunes (42), de tal forma que la injuria glomerular aumenta la generación de ROS y citokinas proinflamatorias como la IL-1 B y el TNF- α , en presencia de RANTES (regulación después de activación de células T normales expresadas y secretadas) e ICAM-1 (moléculas de adhesión intercelulares) (42,43,52). En su insuficiencia renal aguda se menciona que el daño hipóxico, lleva a un desbalance entre la endotelina y el óxido nítrico derivado del endotelio, especialmente en daño asociado a la ciclosporina, pigmentos (mioglobina o hemoglobina) y medios de contraste, causando mayor vasoconstricción (8,9,10,26,48,52,56) y daño de las células del túbulo proximal, así como la participación de la calpaina que se sabe es un mediador de la injuria hipóxica/isquémica en cerebro, hígado y corazón, recientemente se ha demos-

trado que es un mediador de la injuria hipóxica en el túbulo proximal renal (8,9,50,54). Igualmente puede estar asociado a la disfunción endotelial en pacientes adultos mayores y con el uso de drogas antiinflamatorias (26). También se ha reportado un papel importante del óxido nítrico en la prevención de la trombosis glomerular en el estado prenatal o con el cambio de endotoxinas (33). Se ha reportado mejoría clínica por administración de óxido nítrico en un caso de síndrome HELLP (hemólisis, aumento de enzimas hepáticas y trombocitopenia) (33). Se ha encontrado aumento del factor relajante derivado del endotelio en los casos de anemia severa en ratas, concluyéndose que existe un aumento de la inactivación del óxido nítrico (34). En Argentina y España se ha reportado que los inhibidores ECA podrían proteger a los tejidos del daño oxidativo aumentando las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas (7,26,38,40), así como el uso de bloqueadores de receptores de AG II (3,32). Se ha visto que la susceptibilidad a LDL a la oxidación parece verse incrementada en la diabetes mellitus, existiendo relación entre la albuminuria y la disfunción tubular, así como asociada al nivel de lípidos séricos, lipoproteínas, apolipoproteínas o niveles antioxidantes (35,49), también se ha encontrado relación con la administración de CsA en comparación con el tratamiento con AZA, sin embargo se requieren mayores estudios de los efectos de CsA sobre la peroxidación de lípidos y sus implicaciones para la aterogénesis, así como en la progresión de la enfermedad renal, particularmente la glomeruloesclerosis focal y segmen-

taria (23,47), sin encontrarse relación con daño inducido por la hemodiálisis per se (51). También el uso de bloqueadores de canales de calcio reducen la severidad de la injuria isquémica a los túbulos proximales, el exceso de calcio intracelular puede tener múltiples efectos tóxicos, al actuar sinérgicamente con el óxido nítrico causando injuria de los tejidos huéspedes, incluyendo la supresión de la producción de ATP por la mitocondria, activación de las fosfolipasas y proteasas, generando radicales libres (19). La habilidad de las células isquémicas para regular el volumen se compromete, con edema hipoxémico resultante de la producción de ATP y la actividad de Na-K-ATPasa (19). El desarrollo de nuevas drogas acuaréticas, efectivas en la corrección del aumento de la producción del NO, brinda nuevas perspectivas en el tratamiento de la retención de sodio y agua en la cirrosis (2,28,30), así como el desarrollo de antagonistas de endotelina, bosentan, que ha demostrado efectos benéficos, hemodinámicos en la insuficiencia cardíaca (29). Hay resultados contradictorios, aunque en general se sugiere un papel el bloqueo de la Angiotensina II (3,18,37). También se menciona el papel en el balance de retroalimentación glomerulo-tubular, al encontrarse óxido nítrico sintetasa en células de la mácula densa (14,18), aumentando la vasodilatación de la arteriola aferente, y de esta forma contribuyendo a la hiperfiltración (13,18,24), cuyo efecto puede ser bloqueado por los glucocorticoides al inhibir el NOS (24), también se menciona del papel protector de la síntesis de óxido nítrico en el daño inducido por isquemia

renal (8,45). De tal forma que en efecto neto en la modulación del óxido nítrico es variable y resulta del balance entre los efectos benéficos hemodinámicos y la citotoxicidad, el daño o la protección es dependiente de varios factores tales como el tipo de célula, dosis y duración de la administración de L-arginina y especificidad del inhibidor de NO sintetasa (55). También se ha encontrado que el tratamiento con alopurinol después de reperusión postisquemia puede reducir la peroxidación inducida por lípidos (22). Las vitaminas antioxidantes E y C pueden tener un efecto protector celular del daño oxidativo (16), y a través de estimulación de producción de eritropoyetina (vitamina A) (16).

RESUMEN

Se realiza una revisión sobre la participación del óxido nítrico en procesos de vasodilatación y vasoconstricción renales. También se analiza el papel del mismo de diversas patologías renales, su interacción con diversos medicamentos, las opciones terapéuticas que ofrece para diversas patologías.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aiello S, Noris M, Todeschini M, Zappella S, Foglieni C, Benigni A, Corna D, Zoja C, Cavallotti D, Remuzzi G: Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. *Kidney Int* 1997; 52: 171-181.
- 2) Apostol E, Ecelbarger CA, Terris J, Bradford AD, Andrews P, Knepper MA: Reducen renal medullary water channel expression in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 15-24.
- 3) Ardailhou R, Chansel D: Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int* 1997; 52: 1458-1468.
- 4) Barrero MJ, Matín Mateo MC, del Canto E, Bustamante J, de Paula A: Oxidative stress in patients undergoing hemodialysis. *Kidney Int* 1997; 52: 1140 (Abstract).
- 5) Baylis C, Braith R, Santmyre BR, Engels K: Renal nerves do not mediate vasoconstrictor responses to acute nitric oxide synthesis inhibition in conscious rats. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 887-892.
- 6) Chen HC, Tsal JC, Tsal JH, LI YH: Recombinant human erythropoietin enhances superoxide production by FMLP-stimulated polymorphonuclear leukocytes in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997; 52: 1390-1394.
- 7) De Cavanagh EMV, Fraga CG, Ferder L, Inserra F: Enalapril and captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues. *Am J Physiol* 1997; 272: R514-R518.
- 8) Edelstein CL, Ling Hong, Schrier RW: The nature of renal cell injury. *Kidney Int* 1997; 51: 1341-1351.
- 9) Epstein FH: Oxygen and renal metabolism. *Kidney Int* 1997; 51: 381-385.
- 10) Erley CM, Heyne N, Burget K, Langanke J, Risler T, Osswald H: Prevention of radiocontrast-induced nephropathy by adenosine antagonists in rats with chronic nitric oxide deficiency. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1125-1132.
- 11) Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, et al. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 538.
- 12) Gauer S, Yao J, Schoeckmann HO, Sterzel RB: Adhesion molecules in the glomerular mesangium. *Kidney Int* 1997; 51: 1447-1453.
- 13) Hayashi K, Fujiwara K, Oka K, Nagahama T, Matsuda H, Saruta T: Effects of insulin on rat renal microvessels: Studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Kidney Int* 1997; 51: 1507-1513.
- 14) Heyman SN, Karmeli F, Rachmilewitz D, Haj-Yehia A, Brezis M: Intrarenal nitric oxide monitoring with a Clark-type electrode: Potential pitfalls. *Kidney Int* 1997; 51: 1619-1623.
- 15) Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T: Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. *Kidney Int* 1994; 45: 1-9.
- 16) Jellmann W, Pagel H, Hellwing T, Fandrey J: Effects of antioxidant vitamins on renal and hepatic erythropoietin production. *Kidney Int* 1997; 51: 497-501.
- 17) Johnson RJ, Schreiner GF: Hypothesis: The role of acquired tubulointerstitial disease in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Kidney Int* 1997; 52: 1169-1179.
- 18) King AJ: Nitric Oxide and the renal hemodynamic response to proteins. *Seminars in Nephrology* 1995; 15 (5), 405-414.
- 19) Kitamura K, Tomita K, Miller RT: Inhibition of nitric oxide synthase activity and nitric oxide dependent calcium influx in renal epithelial cells by cyclic adenosine monophosphate: Implications for cell injury. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 558-568.
- 20) Kitching AR, Rüger BM, Davis PF: Oxidant stress in the kidney in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 1997; 51: 1314 (Abstract).
- 21) Kourembanas S, Morita T, Liu Y, Christou H: Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int* 1997; 51: 438-443.
- 22) Lee SJ, Hong YS: Preventive effects of allopurinol on the ischemia-reperfusion renal injury in rats. *Kidney Int* 1997; 51: 966 (Abstract).
- 23) Lee HS, Jeong JY, Kim BC, Kim YS, Zhang YZ, Chung HK: Dietary antioxidant inhibits lipoprotein oxidation and renal injury in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1997; 51: 1151-1159.
- 24) Lewko B, Wondt U, Szczepanska-Kunkel M, Stepinski J, Drewnowska K, Angielski S: Inhibition of endothelial nitric oxide synthesis activates particulate guanylyl cyclase in the rat renal glomeruli. *Kidney Int* 1997; 52: 654-659.
- 25) Lieberthal W: Biology of acute renal failure: Therapeutic implications. *Kidney Int* 1997; 52: 1102-1115.
- 26) Llinás MT, González JD, Nava E, Salazar FJ: Role of angiotensin II in the renal effects induced by nitric oxide and prostaglandin synthesis inhibition. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 543-550.
- 27) Madsen KM, Zhang L, Abu Shamah A-R,

- Siegfried S, Cha JH: Ultrastructural localization of osteopontin in the kidney: Induction by lipopolysaccharide. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1043-1053.
- 28) Martin PY, Schrier RW: Pathogenesis of water and sodium retention in cirrhosis. *Kidney Int* 1997; 51 (Suppl 59), S 57.
- 29) Martin PY, Schrier RW: Sodium and water retention in heart failure: Pathogenesis and treatment. *Kidney Int* 1997; 51 (Suppl 59), S 57.
- 30) Mauns AB, Marples D, Chin D, Ning G, Bondy C, Agre P, Nielsen S: Aquaporin-1 water channel expression in human kidney. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1-14.
- 31) Mizutani T, Layton J: Clinical applications of Nitric Oxide. *Chest* 1996; 110: 506-524.
- 32) Murakami T, Tsuchiya K, Naruse M, Naruse K, Demura H, Arai J, Nihei H: Nitric oxide synthase I immunoreactivity in the macula densa of the kidney is angiotensin II dependent. *Kidney Int* 1997; 52: S208-S210.
- 33) Nangaku M, Alpers CE, Pippin J, Shankland SJ, Adler S, Hurokawa K, Couser WG, Johnson RJ: A new model of renal microvascular endothelial injury. *Kidney Int* 1997; 52: 182-194.
- 34) Ni Z, Morcos S, Vaziri ND: Up-regulation of renal and vascular nitric oxide synthase in iron-deficient anemia. *Kidney Int* 1997; 52: 195-201.
- 35) O'Brien SF, Watts GF: Lipoprotein metabolism and antioxidant status in diabetic glomerular and tubular dysfunction. *Kidney Int* 1997; 51: 1305 (Abstract).
- 36) Opatrný, K: Hemostasis disorders in chronic renal failure. *Kidney Int* 1997; 52 (Suppl 62): S87-S89.
- 37) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524.
- 38) Peters H, Noble NA: Angiotensin II and L-arginine in tissue fibrosis: More than blood pressure. *Kidney Int* 1997; 51: 1481-1486.
- 39) Ratcliffe PJ, Ebert BL, Firth JD, Gleadle JM, Maxwell PH, Nagao M, O'Rourke JF, Pugh CW, Wood SM: Oxygen regulated gene expression: Erythropoietin as a model system. *Kidney Int* 1997; 51: 514-526.
- 40) Ruiz-López LM, Muñoz R, Solís A, Muñoz ML, Martínez MP, Lampreale I: Inhibition by enalaprilat of the hydrogen peroxide production by murine mesangial cells exposed to high glucose concentrations. *Kidney Int* 1997; 52: 1137 (Abstract).
- 41) Sandau K, Pfeilschifter J, Brüne B: Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 596-603.
- 42) Satriano JA, Bunas B, Luckow B, Nelson P, Schiondoff DO: Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 696-603.
- 43) Schena FP, Gesualdo L, Grandaliano G, Montirano V: Progression of renal damage in human glomerulonephritides: Is there sleight of hand in winning the game? *Kidney Int* 1997; 52: 1439-1457.
- 44) Thursingham RC, Nott CA, Dodd SM, Yaqoob MM: Peroxynitrite may mediate progression in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1997; 52: 1122 (Abstract).
- 45) Tibballs J: The role of nitric oxide (formerly endothelium-derived relaxing factor-EDRF) in vasodilation and vasodilator therapy. *Anaesth Intensive Care* 1993; 21: 759.
- 46) Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS: Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 1997; 52: 1593-1601.
- 47) Valdivieso JM, Rivas-Cubañero L, Arévalo M, Crespo C, Alonso JR, López-Novoa JM: Increased glomerular nitric oxide synthesis in ischemic acute renal failure. A role for uremia. *Kidney Int* 1997; 52:1139 (Abstract).
- 48) Van der Dorpel MA, Ghanem H, Rischen-Vos J, Man in't Veld AJ, Jansen H, Weimar W: Conversion from cyclosporine A to azathioprine treatment improves LDL oxidation in kidney transplant recipients. *Kidney Int* 1997; 51: 1608-1612.
- 49) Wanner C, Greiber S, Krämer-Guth A, Heinloth A, Galle J: Lipids and progression of renal disease: Role of modified low density lipoprotein and lipoprotein (a). *Kidney Int* 1997; 52: S102-S106.
- 50) Weigert AL, Martin P-Y, Achrier RW: Vascular hyporesponsiveness in cirrhotic rats: Role of different nitric oxide synthase isoforms. *Kidney Int* 1997; 52 (Suppl 61): S41-S44.
- 51) Westhuyzen J, Morgan D, Saltissi D, Healy H: Oxidative status of low density lipoprotein (LDL) in hemodialysis (HD) patients: Effect of dialysis and comparison with matched controls. *Kidney Int* 1997; 51:1312 (Abstract).
- 52) Wijesekera DS, Jarama MJ, Paller MS: Effects of integrins on proliferation and apoptosis of renal epithelial cells after acute injury. *Kidney Int* 1997; 52:1511-1520.
- 53) Wolf G, Ziyadeh FN, Schroeder R, Stahl RAD: Angiotensin II inhibits inducible nitric oxide synthase in tubular MCT cells by a posttranscriptional mechanism. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 551-557.
- 54) Woods LL: Mechanisms of renal hemodynamic regulation in response to protein feeding. *Kidney Int* 1993; 44: 659-675.
- 55) Yu L: Nitric oxide in acute renal failure: Foe or friend? *Kidney Int* 1997; 52 (Suppl 61): S39-S40.
- 56) Zager RA, Burkhart K: Myoglobin toxicity in proximal human kidney cells: Roles of Fe, Ca ++, H2O2, and terminal mitochondrial electron transport. *Kidney Int* 1997; 51: 728-738.
- 57) Zapol WM, Riimar S, Gills N, et al: Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1375.
- 58) Zhou XJ, Pandian D, Wang XQ, Vaziri ND: Erythropoietin-induced hypertension in rat is not mediated by alterations of plasma endothelin, vasopressin or atrial natriuretic peptide levels. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 901-905.