

Características clínicas de los tumores del estroma gastrointestinal

Clinical characteristics of the gastrointestinal stromal tumors

Dr. Rafael Medrano Guzmán, Dr. Sergio Torres Vargas, Dr. Domingo González Rodríguez

Resumen

Los tumores del estroma gastrointestinal (GIST, por sus siglas en inglés) forman parte de una de las neoplasias malignas más estudiadas actualmente, ya que su localización (estómago, intestino delgado, recto, esófago, apéndice, vesícula biliar, páncreas, mesenterio, omento, retroperitoneo) y características clínicas delinean su comportamiento biológico y la posibilidad de tratarlos con las nuevas terapias moleculares blanco. Debido a que el tipo de morfología de estos tumores puede confundirse con otras neoplasias malignas, es necesario reunir los resultados de varios estudios, tales como ultrasonido endoluminal (USE), tomografía axial computarizada (TAC), tomografía por emisión de positrones (PET), para poder detectarlos, etapificarlos, dar un diagnóstico más preciso y poder detectar metástasis.

Palabras clave: GIST, neoplasias, comportamiento biológico, terapias blanco, ultrasonido endoluminal (USE), tomografía axial computarizada (TAC), tomografía por emisión de positrones (PET), mesilato de imatinib.

Cir Gen 2008;30:17-22

Abstract

Nowadays, gastrointestinal stromal tumours (GIST) constitute one of the most important researches which deal with malignant neoplasms because their sites (stomach, small bowel, rectum, esophagus, appendix, gallbladder, pancreas, mesentery, omentum, retroperitoneum) and clinical features trace the biological behaviour and the possibility of treating them with the ultimate molecular target therapy. Given that the GIST morphology is similar to other malignant neoplasms, it is necessary to gather the results of several studies such as endoluminal ultrasound (EUS), computed tomography, positron emission tomography (PET), in order to detect them, classify them, give an accurate diagnosis, and detect metastases.

Key words: GIST, neoplasms, biological behaviour, molecular target therapy, endoluminal ultrasound (EUS), computed tomography, positron emission tomography (PET), imatinib mesylate.

Cir Gen 2008;30:17-22

Objetivo

Proporcionar los elementos básicos para el diagnóstico de GIST y su recurrencia.

Puntos clave

- Los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) tienen una incidencia anual poco conocida; levemente mayor en la población masculina.
- Los GIST tienen su origen principalmente en el estómago y en el intestino delgado, aunque también se presentan en recto, esófago, apéndice,

vesícula biliar, páncreas, mesenterio, omento y retroperitoneo.

- Los GIST se presentan a los 60 años, aproximadamente; su diámetro oscila entre los 2 a 30 cm.
- No se recomienda la biopsia percutánea para diagnosticar este tipo de tumores ya que son frágiles, sobre todo si hay necrosis o hemorragias.
- Si la biopsia es necesaria, también se sugiere un ultrasonido endoluminal. Actualmente, el ultrasonido externo sólo se emplea en la vigilancia postoperatoria.

- El ecoendoscopio es el método más adecuado para obtener biopsias con menor riesgo de contaminación peritoneal.
- Para evaluar tumores abdominales se recurre a la tomografía computarizada y a la resonancia magnética para detectar metástasis, etapificación, detección, resecabilidad, irresecabilidad o medir respuesta ante terapias sistémicas.
- Los GIST son voluminosos, pero poco infiltrantes a estructuras adyacentes.
- Para medir la respuesta a las terapias sistémicas de los GIST se deben evaluar el tamaño y la densidad de los tumores.
- Los criterios para evaluar la respuesta de los tumores a la terapia con mesilato de imatinib correlacionan mejor con la tomografía por emisión de positrones (PET).
- La respuesta máxima al tratamiento con inhibidores de tirosincinasas ocurre entre los 6 y 12 meses.

Introducción

El término “tumor estromal” fue introducido por Mazur y Clark en 1983, quienes lo identificaron como una entidad diferente a los tumores gastrointestinales hasta entonces referidos.¹ La incidencia anual de los GIST es poco conocida en la mayoría de las poblaciones a nivel mundial. No obstante, en países con mejor control estadístico como Suecia, se estima una incidencia de 14.5 casos por millón de habitantes. Asumiendo esta misma media, en los Estados Unidos de Norteamérica se presentan entre 4,500 y 6,000 casos anuales. No existe una clara predilección en el sexo, pero los estudios sugieren una incidencia ligeramente mayor en la población masculina.² Los GIST tienen su origen predominantemente en el estómago (60%) y en el intestino delgado (25%); sin embargo, pueden presentarse en el recto (5%), esófago (2%) y en otros sitios (5%), incluidos el apéndice, vesícula biliar, páncreas, mesenterio, omento y retroperitoneo.³⁻⁵ La proporción de pacientes menores de 40 años varía entre 5% y 20%. Los GIST son extremadamente raros en niños (menos del 1%). La edad de presentación es entre los 10 y 90 años, con mayor frecuencia en la

sexta década de la vida. Los tumores generalmente se presentan entre 2 y 30 cm de diámetro al momento del diagnóstico.⁶

Diagnóstico

Los tumores GIST, a diferencia de otras estirpes histológicas malignas, no requieren confirmación histopatológica en la mayoría de los casos. La biopsia percutánea no es recomendable debido a que este tipo de tumor es frágil, especialmente si hay extensa hemorragia o necrosis, lo cual puede condicionar diseminación intra-peritoneal.

En los pacientes que necesitan biopsia, se sugiere endoscopia con apoyo del ultrasonido endoluminal.⁷ Actualmente, se está investigando la posibilidad de recurrir al ultrasonido externo como método de diagnóstico, por el momento se considera exclusivamente como apoyo en la vigilancia postratamiento.⁸

Evaluación inicial

Ultrasonido endoluminal

En la actualidad, el ecoendoscopio representa un estudio indispensable para el diagnóstico de los GIST. El ultrasonido endoluminal (USE) es superior a la endoscopia para detectar y definir las características de las lesiones submucosas porque permite orientar el diagnóstico de los GIST intraluminales y extraluminales (**Figura 1**). La sensibilidad para diagnóstico es de 89% y la especificidad de 70%, aproximadamente. Se considera el método más adecuado para la obtención de biopsias, con menor posibilidad de contaminación peritoneal, secundaria a este procedimiento.^{9,10} El USE es útil para localizar, asistir y dirigir en las cirugías por laparoscopia; desafortunadamente, no se tiene acceso a este equipo en la mayoría de los centros hospitalarios en México. Sin embargo, en todas las guías internacionales se considera necesario para el protocolo pre-tratamiento y postratamiento de los GIST.¹¹

Tomografía axial computarizada

La tomografía axial computarizada (TAC), y ocasionalmente la resonancia magnética nuclear (RMN), son la modalidad de imagen cuando se está evaluando



Fig. 1. A. Imagen de tumor estromal por endoscopia. **B.** Correlación con USE endoluminal.
Fuente: Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Cuadro I.
Criterios para evaluar respuesta por tomografía axial computarizada (Choi y cols.)

Respuesta	Definición
Respuesta completa	1. Remisión de todas las lesiones 2. Sin evidencia de nuevas lesiones
Respuesta parcial	1. Disminución del tamaño en 10% o más o disminución en la densidad del tumor (UH) del 15% o más por TAC 2. Sin lesiones nuevas 3. Sin datos de progresión
Enfermedad estable	1. Sin datos de progresión 2. Control de los síntomas
Progresión de la enfermedad	1. Aumento del tamaño en 10% o más y/o aumento en la densidad (UH) 2. Nuevas lesiones 3. Nuevos nódulos intratumorales o aumento en el tamaño de los nódulos preexistentes

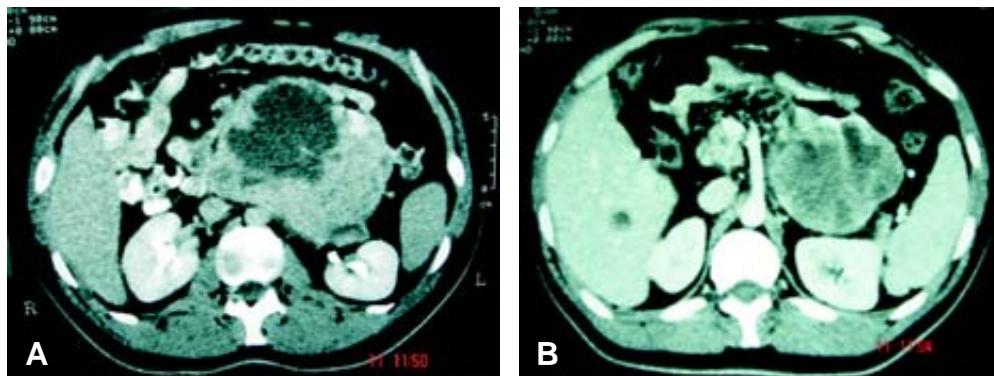


Fig. 2. A. Paciente con un mes de tratamiento con mesilato de imatinib a una dosis de 400 mg/24. **B.** Respuesta parcial medida por criterios Choi posterior a 6 meses de tratamiento con mesilato de imatinib.

Fuente: Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

los tumores abdominales. La TAC es el estudio de elección para evaluar las características de un tumor intraabdominal, metástasis, etapificación, resecabilidad o medir respuesta ante terapias sistémicas. La imagen típica por TAC de un GIST es una lesión sólida, con aumento en su densidad. Sin embargo, tumores mayores de 10 cm resultan ser más complejos en su evaluación, debido a la degeneración por necrosis y hemorragia.¹²

Una de las características de los GIST consiste en ser poco infiltrantes a estructuras adyacentes, independientemente de ser voluminosos. La obstrucción intestinal también es poco frecuente. Las metástasis de los GIST pueden ser por diseminación transcelómica o hematogena y la linfática suele ser poco frecuente (-1%). El hígado es el sitio más frecuente de metástasis; sin embargo, se pueden presentar en el peritoneo, omento y esporádicamente en el pulmón.¹³

La TAC también puede ser empleada como monitor para medir respuesta a terapias sistémicas, principalmente en fármacos inhibidores de tirosincinasas. Se recomienda realizar la primera evaluación posterior a los tres meses de iniciada la terapia, en pacientes con enfermedad irrecusable o metastásica. Generalmente,

la respuesta se presenta dentro de los dos primeros meses. La respuesta temprana por TAC se considera un factor de buen pronóstico y un efecto favorable de la terapia sistémica.¹⁴

Tradicionalmente, los criterios de evaluación por TAC se apoyaban en el sistema RECIST (criterios de respuesta, basados en cambios de tamaño del tumor). Si bien es cierto que estos criterios son aplicables a otros tumores sólidos, en la actualidad no son válidos para los tumores GIST. La causa es una mayor correlación de respuesta, con base en una disminución de la densidad medida en unidades Hounsfield (UH). Esta medición de densidad correlaciona con la necrosis tumoral y degeneración quística o mixoide.¹⁵

Los criterios de respuesta por TAC fueron propuestos inicialmente por Choi y cols.¹⁶ Tamaño y densidad son los elementos de evaluación para medir respuesta a las terapias sistémicas de los GIST (**Cuadro I**).

Estos criterios correlacionan mucho mejor con la tomografía por emisión de positrones (PET), al medir respuesta a la terapia con mesilato de imatinib; sin embargo, aún no han sido validados universalmente.¹⁷ En algunos casos, el tamaño del tumor puede, eventualmente, aumentar de tamaño, lo cual es una situación

secundaria al desarrollo de hemorragia intratumoral o degeneración mixoide. En pacientes con tratamiento de mesilato de imatinib se ha observado una rápida regresión de los implantes peritoneales, no así de las lesiones hepáticas, las cuales habitualmente manifiestan una respuesta más tardía (**Figura 2**). En forma global, la respuesta máxima al tratamiento con inhibidores de tirosincinasa ocurre entre los 6 y 12 meses.¹⁸

Tomografía por emisión de positrones

La evaluación por PET también tiene como objetivos el diagnóstico, etapificación, detección de metástasis con mayor sensibilidad que otros estudios de imagen y la medición de respuesta ante tratamientos sistémicos como el mesilato de imatinib. Actualmente, este estudio se puede combinar con la TAC (PET-TAC) para originar mayor sensibilidad y especificidad. La principal aportación del PET al estudio de los GIST es la evaluación de la actividad metabólica, la cual aparece aumentada en las neoplasias malignas.¹⁹

De igual forma, este estudio puede ayudar a diferenciar un tumor activo de un tumor necrótico o inactivo, tejido maligno de tejido benigno y tumor recurrente de cambios benignos sospechosos de recurrencia.²⁰ La European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) ha desarrollado criterios para evaluar la respuesta metabólica de los tumores malignos, a saber: 1) respuesta metabólica completa, 2) respuesta metabólica parcial, 3) enfermedad metabólica estable y 4) progresión metabólica. Estos criterios han probado ser de pronóstico para evaluar progresión y supervivencia global.²¹

Como se mencionó previamente, la TAC es el estudio de primera elección; sin embargo, el PET tiene, claramente, mayor sensibilidad que la TAC.²² La inclusión del PET en la evaluación de los GIST tiene como objetivos: 1) etapificación y detección de metástasis que no son aparentes por otros estudios; 2) detección de otros sitios primarios no conocidos, 3) monitor de respuesta de los tratamientos sistémicos, como los inhibidores de tirosincinasa (**Figura 3**); 4) detección de resistencia primaria o secundaria a las terapias con inhibidores de tirosincinasa y 5) como sistema de resolución de estudios por TAC, altamente controversiales al medir los rubros antes señalados.²³ Es útil también en pacientes con resección marginal o que presentan una morbilidad significativa secundaria al procedimiento quirúrgico.²⁴

El PET no está indicado en tumores resecables por TAC o en tumores de bajo riesgo, la consideración para realizarlo es la intención de neoadyuvancia.²⁵ La respuesta medida por PET en pacientes con tratamiento a base de inhibidores de tirosincinasa, puede observarse desde las primeras horas de iniciado el tratamiento. Puede detectar en forma temprana a los pacientes resistentes a terapias sistémicas y, de esta forma, redefinir una mejor opción terapéutica (**Cuadro II**).²⁶

Diagnóstico de la recurrencia y esquema de vigilancia

Actualmente, se acepta que el estudio de imagen con mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la recurrencia en los GIST es el rastreo por medio

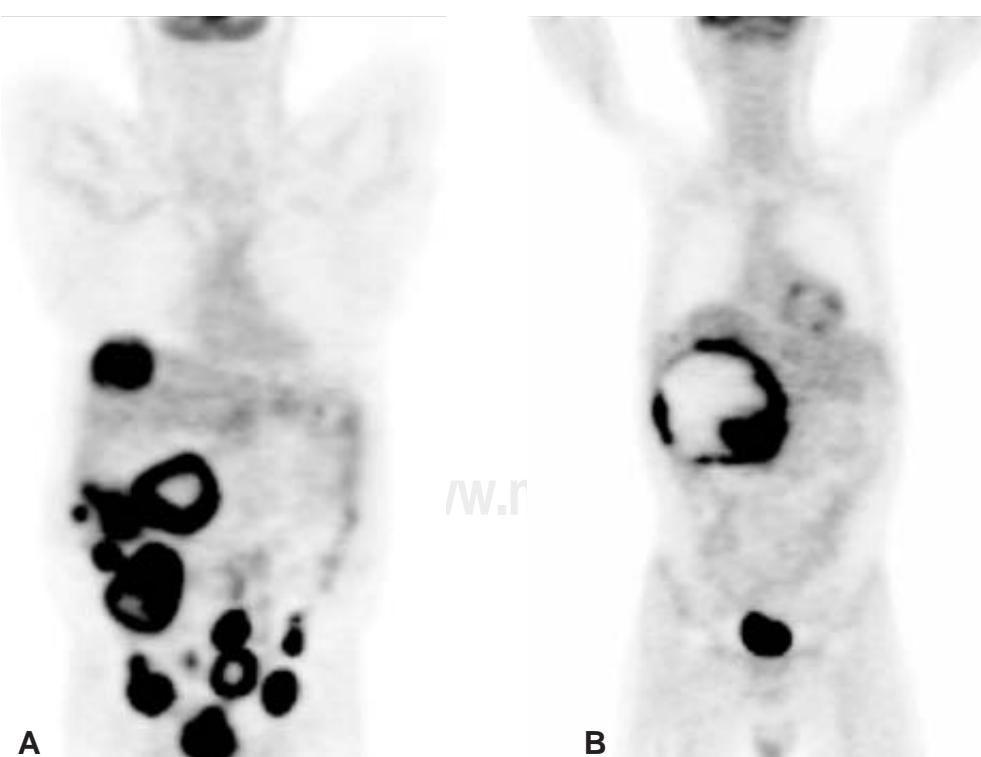


Fig. 3. A. Paciente con múltiples metástasis peritoneales y hepáticas, medido por PET. B. Imagen por PET del mismo paciente posterior a 3 meses de tratamiento.

Cuadro II. Diagnóstico

Estudio	Sensibilidad %	Especificidad %
TAC	60	50-60
RMN	60	60-80
PET-CT	80	70-80
USG	30	30
Endoscopia	80	80-90
SEG	30	30

Demetri G. D. MD Robert, Benjamin et al. NCCN Task Force Report: Management of patients with Gastrointestinal Stromal tumor- Update of the NCCN Clinical Practice Guidelines. *J NCCN* 2007; 5 (Suppl 2): 51-29.

de PET. Desafortunadamente, este tipo de estudio no es asequible en la mayor parte de los centros hospitalarios y, por tanto, es indispensable adaptar otros estudios de imagen (en tiempo y forma) que puedan proporcionar una adecuada vigilancia, de acuerdo con la conducta biológica de los GIST.²⁷

En los tumores de bajo riesgo, la recurrencia es menor a 5%, pero aun así se recomienda el seguimiento postratamiento con ultrasonido abdomino-pélvico (USG) cada seis meses durante los primeros tres años y, posteriormente, en forma anual.²⁸ En pacientes de alto riesgo, se recomienda la vigilancia cada tres a seis meses con un USG como estudio mínimo y una placa de tórax (posibilidad de 5% de metástasis pulmonares).

La TAC presenta una alta sensibilidad para detectar recurrencia y se sugiere cada tres a seis meses, dependiendo de las características del paciente, por un mínimo de tres años. Posteriormente, el control deberá llevarse a cabo cada seis meses.²⁹ La posibilidad de recurrencia endoluminal en forma global no es mayor a 20%,³⁰ por lo que la endoscopia y el USG endoluminal se deben realizar en grupos de alto riesgo, por lo menos una vez al año.³¹

En los centros hospitalarios que pueden realizar un rastreo por PET, se sugiere cada seis meses, en el grupo de alto riesgo durante los primeros tres años y, posteriormente, en forma anual. Si el acceso es muy limitado para el PET, se considerará como un estudio que pueda resolver las controversias generadas por la TAC, en el diagnóstico de la enfermedad recurrente.³²

Conclusiones

En la primera década de este siglo, se ha iniciado una revolución en lo referente al diagnóstico y tratamiento de las neoplasias malignas. La inclusión de las terapias moleculares blanco, su efecto en el tratamiento de tumores malignos y métodos modernos de diagnóstico, forman parte indiscutible en el desarrollo de la oncología actual.

Uno de los referentes más importantes ha sido el estudio de los GIST, su categorización y reconocimiento histológico correctos, así como las nuevas formas de evaluar su respuesta, aportaciones que ha dejado la

observación de la conducta biológica de estos tumores. Asimismo, actualmente se cuenta con una de las terapias moleculares blanco más efectivas: el mesilato de imatinib, el cual tiene altos porcentajes de respuesta y uno de los períodos libres de enfermedad más efectivos en la era de estas terapias.

La hemorragia y la sintomatología derivadas de la compresión son los eventos clínicos más frecuentes que sugieren un GIST. De ahí que la TAC se considere un estudio indispensable para evaluar resecabilidad. En los pacientes con sospecha de GIST resecables, no es necesaria la confirmación histológica preoperatoria. En los casos de irresecabilidad es prioritario el diagnóstico histopatológico, en el que el método más adecuado es la biopsia guiada por USG endoluminal, estudio óptimo para evaluar tumores submucosos. Este tipo de biopsia disminuye significativamente el riesgo de diseminación peritoneal.

En el diagnóstico y vigilancia, el estudio más sensible y específico es el PET; sin embargo, éste es poco accesible en la mayor parte de los centros hospitalarios, por lo que se sugiere considerarlo como un estudio de exclusión para los pacientes en controversia diagnóstica de recurrencia o de respuesta ante alguna terapia con inhibidores de tirosincinasas. Uno de los estudios más asequibles y con porcentajes de efectividad más cercanos al PET es la TAC, la cual puede evaluar recurrencia y respuesta mediante el empleo de los criterios propuestos por Choi y cols.

En los pacientes de bajo riesgo, se sugiere la vigilancia con USG abdomino-pélvico cada seis meses, por un periodo de tres años y, posteriormente, en forma anual. En pacientes de alto riesgo, la recomendación es una TAC cada tres a seis meses, durante los primeros tres años y, posteriormente, cada seis meses. En pacientes de alto riesgo o ante sintomatología inminente se sugieren la endoscopia y el USG endoluminal, una vez al año. En este mismo grupo de pacientes y con poco acceso a un estudio de TAC, se recomienda un USG abdomino-pélvico como estudio mínimo cada tres meses.

Referencias

1. Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 507-519.
2. Nishida T, Hirota S. Biological and clinical review of stromal tumors in the gastrointestinal tract. *Histol Pathol* 2000; 15: 1293-1301.
3. Thomas RM, Sabin LH. Gastrointestinal cancer. *Cancer* 1995; 75: 154-170.
4. Tran T, Davila JA, ElSerag HB. The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 162-168.
5. Tryggvason G, Gislason HG, Mafrusson MK, et al. Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003; the Icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. *Int J Cancer* 2005; 117: 289-293.

6. Goetsch WG, Bos SD, Breekveldt-Postma N, et al. Incidence of gastrointestinal stromal tumors in underestimated: results of a nation-wide study. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2868-2872.
7. Alexander J, Eckardt, et al. Diagnosis of subepithelial tumor in the GI tract. Endoscopy, EUS and histology: bronze, silver, and gold standard? *Gastrointestinal Endoscopy* 2005; 62: 209-212.
8. Polkowski M, Butruk E, Submucosal lesions. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2005; 15: 33-54.
9. Hwang JH, Sauders MD, Rulyak SJ, Shaw S, Kimmey MB. A prospective study comparing endoscopy and EUS in the evaluation of GI subepithelial masses. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 202-208.
10. Rösch T, Kapfer B, Will U, Baronius W, Strobel M Lorenz R, et al. Accuracy of endoscopic ultrasonography in upper gastrointestinal submucosal lesions: a prospective multicenter study. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 856-62.
11. Miettinen M, El-Riafi W, Sabin LH. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Hum Pathol* 2002; 33: 478-83.
12. DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, et al. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 2000; 231: 51-58.
13. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 70-83.
14. Dow N, Giblen G, Sabin LH, et al. Gastrointestinal stromal tumors: differential diagnosis. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 11-119.
15. Demetri GD, Benjamin RS, Blanke C, et al. Optimal management of patients with gastrointestinal stromal tumors. Expansion and update of NCCN Clinical Practice Guidelines. *JNCCN* 2004; 2 (Suppl 1).
16. Choi H, Charnsangavej Ch, de Castro FS, et al. CT Evaluation of the response of gastrointestinal stromal tumors after Imatinib mesylate treatment: A quantitative analysis correlated with FDG PET findings. *AJR* 2004; 183: 1619-1628.
17. van den Abbele A, Badawi RD, Cliché J, et al. 18 FDG-PET predicts response to imatinib mesylate in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. In: Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology. Alexandria, VA: American Society of Clinical Oncology, 2002, Abstract 1610.
18. Holdsworth CH, Badawi RD, Manola JB, Kijewsky MF, Israel DA. CT and PET early prognostic indicators of response to imatinib mesylate in patients with gastrointestinal stromal tumor. *Am J* 2007; 189.
19. Margolis DJA, Hoffman JM, Herfkens RJ, Jeffrey RB, Quon A, Gambhir SS. Molecular imaging techniques in body imaging. *Radiology* 2007; 245: 333-356.
20. Hamstra DA, Rehemtulla A, Ross BD. Diffusion magnetic resonance imaging: a biomarker for treatment response in oncology. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4104-4109.
21. Blay JY, Bonvalot S, Casali P, et al. Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. *Ann Oncol* 2005; 16: 566-578.
22. Choi H, Charnsangavej C, S. Faria SC, et al. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: Proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1753-1759.
23. Andtbacka HI, Ng CS, Scaife CL, et al. Surgical resection of gastrointestinal stromal tumors after treatment with imatinib. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 14-24.
24. Linton KM, Taylor MB, Radford JA. Response evaluation in gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib: misdiagnosis of disease progression on CT due to cystic change in liver metastases. *Br J Radiol* 2006; 79: e40-e44.
25. Meyer MA, Aliberti S, Grignani G, Aglietta M, Juweid ME, Cheeson BD. Positron-emission tomography in cancer therapy. *N Engl J Med* 2006; 354: 1958-1960.
26. Choi HH, Loyer EM, Benjamin RS, Trent JC, Charnsangavej C. Gastrointestinal stromal tumor: Role of CT in diagnosis and in response evaluation and surveillance after treatment with imatinib. *RadioGraphics* 2006; 26: 481-495.
27. Ryu M-H, Lee J-L, Chang HM, Kim TW, Kang HJ, Sohn HJ, Lee JS, Kang Y-K. Patterns of progression in gastrointestinal stromal tumor treated with imatinib mesylate Jpn. *J Clin Oncol* 2006; 36: 17-24.
28. Erturk SM. CT Evaluation of gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib mesylate. *Am J Roentgenol* 2005; 185: 1366-1366.
29. Demetri GD, Robert B, et al. NCCN task force report: Management of patients with gastrointestinal stromal tumor-update of the NCCN Clinical Practice Guidelines. *J NCCN* 2007; 5 (Suppl 2): 51-29.
30. Kim H-Ch, Jeong ML, Seung HCh, et al. Imaging of gastrointestinal stromal tumors. *J Comput Assist Tomogr* 2004; 28: 596-604.
31. Levy AD, Remotti HE, Thompson WM, et al. Gastrointestinal stromal tumors radiologic features with pathologic correlation. *RadioGraphics* 2003; 23: 283-304.
32. Kim H, Lee JM, Kim SH, et al. Primary gastrointestinal stromal tumors in the omentum and mesentery: CT findings and pathologic correlations. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 185-189.