

## Aislamiento y Caracterización de Células Troncales Mesenquimales en Sangre Periférica Humana

### *Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells in Human Peripheral Blood*

Carlos Landa-Solis<sup>1</sup>, Anell Olivos-Meza<sup>2</sup>, Hermelindo Umanzour<sup>2</sup>, Víctor Hugo Cárdenas-Soria<sup>2</sup>, Clemente Ibarra<sup>3</sup>.

#### Resumen:

**Antecedentes:** Las células troncales mesenquimales (CTM) se caracterizan por la expresión de marcadores de superficie específicos (CD73, CD90 y CD105) y por su capacidad de diferenciarse a los tres linajes de la línea mesenquimal (cartilago, hueso y tejido adiposo). Actualmente, la médula ósea (MO) es considerada la principal fuente de CTM en individuos adultos para su utilización en Ingeniería Tisular. La sangre periférica movilizada ha sido utilizada como fuente eficaz de CTM. Sin embargo, el aislamiento de CTM de remanentes de sangre periférica de donación no ha sido estudiado. **Objetivo:** Aislar y caracterizar CTM de sangre periférica del remanente de bolsas de donación (Buffy-coat). **Metodos:** Se obtuvieron 6 muestras de 20 ml de Sangre Periférica Humana (SPH) remanente de paquetes globulares en el INR-LGII. Las células mononucleares se aislaron con Ficoll, se cultivaron y expandieron durante 14 días. **Resultados:** Durante el aislamiento se identificó la presencia de un 8% de células positivas a marcadores de CTM (CD73, CD90 y CD105). Durante el cultivo se identificaron 2 poblaciones celulares: CT-hematopoyéticas y CT-Mesenquimales. A los 14 días de cultivo hubo una disminución de las células positivas a marcadores hematopoyéticos y un incremento significativo de la positividad a marcadores de CTM. **Conclusiones:** Es posible aislar del remanente de donación sanguínea células con marcadores positivos para CTM (CD73, CD90 y CD105), capaces de adherirse al plástico y multiplicarse disminuyendo significativamente su expresión de marcadores hematopoyéticos e incrementando la de marcadores característicos del linaje mesenquimal a los 14 días de cultivo *in-vitro*.

#### Abstract:

*Mesenchymal Stem Cells (MSCs) has been studied as a suitable source of cells for tissue engineering and to treat different diseases. At present, Bone Marrow (BM) has been considered the main source to obtain MSC. However, is a painful procedure that requires to be done in the operating room under anesthesia with their inherent risks and costs. Peripheral blood (PB) after mobilization is an ambulatory procedure with lower risks that has been considered a novel source of MSC. However, there is no description in the literature about the isolation of MSC from PB without growth factors administration. Objectives: To isolate MSC from human peripheral blood of the remnants in the blood bags of conventional donation & characterize the MSC by flow cytometry. Materials: The remnant of 6 samples of peripheral blood of adult donors were used. Mononuclear cells were isolated by ficoll gradient, then cells were cultured in standard conditions during 14 days. Their immunophenotype was assessed by flow cytometry. Results: In the beginning of culture a population of 8% of the cells were positive to CD73, CD90 & CD105 markers. However, two different groups of cells were identified: hematopoietic & mesenchymal. At day-14 of culture hematopoietic markers decreased while mesenchymal markers increased through the time. Conclusions: Is possible to isolate cells with MSC positive markers from remnants of Human Peripheral Blood with the capability to multiply in standard conditions.*

<sup>1</sup> Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

<sup>2</sup> Ortopedia del Deporte y Artroscopia, Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

<sup>3</sup> Dirección General, del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

#### Dirección para correspondencia

Clemente Ibarra

Dirección General, del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.  
Calzada México-Xochimilco no. 289  
Col. Arenal de Guadalupe, Del. Tlalpan,  
Cd. De México C.P 14389.  
Tel. +52(55)5999-1000 ext.10035

Recibido: 14 de Octubre de 2017

Aceptado: 11 de Marzo 2018

**Conflicto de intereses:** Se declara que no existe ningún tipo de conflicto de intereses con ninguno de los autores.

#### Palabras clave:

**Palabras Clave:** Células Troncales Mesenquimales; marcadores de superficie celular; Inmunofenotipo.

#### Key words:

Mesenchymal stem cells; cell surface markers; Immune.

## Introducción

Las células troncales mesenquimales (CTM) son células inmaduras, no especializadas que tienen la capacidad de autorenovarse durante largos períodos de tiempo y diferenciarse en células especializadas con funciones características. Este tipo de células se han identificado en varios tejidos maduros del organismo como la médula ósea (MO),<sup>1</sup> hígado,<sup>2</sup> tejido adiposo,<sup>3</sup> limbo corneal,<sup>4</sup> líquido amniótico,<sup>5</sup> sangre de cordón umbilical<sup>6,7</sup> y sangre periférica (SP)<sup>8,9</sup> principalmente.

En la SP se han identificado dos poblaciones de CTM: las células troncales hematopoyéticas (PB-HSC)<sup>10</sup> y células troncales mesenquimales (PB-MS)<sup>11</sup> Las PB-HSC se han caracterizado por medio de los marcadores de superficie CD133+, CD45+, CD34+ y CD38-.<sup>12</sup> Mientras que las PB-MS se identifican por los marcadores de superficie CD105+, CD90+, CD73+, CD31-, CD34-, y CD45-.<sup>7,13</sup> Para el caso particular de las PB-MS se ha demostrado su plasticidad al ser diferenciadas en adipocitos, condrocitos y osteocitos.<sup>8,13,14</sup>

De todas las fuentes descritas en la literatura para la obtención de CTM, la punción de la médula ósea se considera la mejor, seguido por el tejido adiposo y la sangre de cordón umbilical.<sup>15</sup> Una de las fuentes más actuales es la obtención de CTM de sangre periférica movilizada después de la administración del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF por sus siglas en inglés).<sup>16</sup> Este factor fue purificado molecularmente, y aprobado en los Estados Unidos de Norte América para su uso en pacientes con cáncer y conducir a la movilización de células troncales mesenquimales de la médula ósea a sangre periférica, para ser usada en trasplantes.<sup>8,9</sup> Estudios de seguimiento de hasta 5 años los efectos adversos reportados se han limitado a dolor musculoesquelético sin que se observe ninguna evidencia de anomalías en la médula ósea.<sup>10</sup>

El mecanismo de acción descrito se basa en la modulación negativa de la molécula de superficie de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en las células troncales localizadas en el nicho de la médula ósea,<sup>11</sup> favoreciendo su liberación y que estas migren por el espacio intramedular hacia la circulación periférica.<sup>12</sup>

Las células troncales mesenquimales son células indiferenciadas con capacidad de proliferación y autorenovación. Por estas características, las células troncales son una excelente herramienta con gran potencial en la medida regenerativa. Las células troncales en diferentes etapas del desarrollo parecen tener diferentes capacidades de autorenovación y diferenciación.

El empleo de las CTM humanas para uso en modelos preclínicos experimentales presentan problemas éticos ya que no se ofrece un beneficio directo para la salud del donador, sumado al riesgo que implica someterse a un procedimiento quirúrgico para su obtención, así como los efectos secundarios de la administración de factores recombinantes para su movilización.<sup>17</sup> En este tema característico radica la importancia del análisis de éste estudio, ya que no se encuentra descrito en la literatura el aislamiento de CTM en el remanente de las bolsas de donación sanguínea (Buffy coat), sin la previa administración de C-SGF, con lo cual se contaría con una fuente de fácil acceso que no implique problemas éticos obteniendo grandes cantidades en el "buffy coat" que a diario se desecha después del fraccionamiento para la obtención del plasma y el paquete globular en todos los bancos de sangre. El objetivo de este trabajo fue aislar de la sangre periférica humana sin movilizar, las células troncales mesenquimales valorando la presencia de marcadores de superficie celular al inicio del cultivo y posteriormente caracterizarlas al cultivarlas durante 14 días *in-vitro*.

## Material y métodos

**Obtención de sangre periférica.** Se tomaron muestras remanentes de aproximadamente 20ml de sangre periférica de banco de sangre provenientes de bolsas de donación. Las muestras se procesaron en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa (UITTC) del Instituto nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR-LGII)". Los donadores firmaron consentimiento informado por escrito para su participación. Las bolsas de obtención contienen heparina de sodio 75 USP, 13 x 75 mm (BD, cat. 367871).

**Aislamiento de las células mononucleares.** Las células mononucleares se obtuvieron a partir de los 20 mL de sangre periférica de los voluntarios sanos por medio de gradiente de concentración. Dentro de una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA) cada muestra se colocó en tubos de polipropileno para centrifuga con capacidad de 50 mL, posteriormente se realizó una dilución 1:2 con solución salina fosfatada (PBS) [Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA]. Se prepararon 15 mL de Ficoll Paque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) en tubos estériles de polipropileno de 50 mL (cat. CLS430829 Corning) y se añadieron 25 mL de la muestra diluida de sangre y PBS con mucho cuidado para no romper la tensión superficial, quedando un volumen final de 40 mL. Poste-

rior a esto, las muestras fueron centrifugadas a 300 g durante 30 minutos. La fracción de células mononucleares fue tomada para iniciar el procedimiento de cultivo y su posterior caracterización por citometría de flujo.

**Caracterización por citometría de flujo.** Posterior al aislamiento de las células mononucleares se apartó una alícuota de  $5 \times 10^5$  células en 1 mL de PBS para evaluar la presencia de marcadores de superficie característicos por citometría de flujo. Una vez separadas las células, se colocó una alícuota con  $2.5 \times 10^4$  en tubos de poliestireno (Falcon, Becton Dickinson) con 10  $\mu$ L de la suspensión de anticuerpos, dejándose en incubación durante 30 minutos a 4°C. Se utilizaron anticuerpos monoclonales conjugados: anti CD14 (cat. 340585), CD34 (cat.555822), CD45 (cat. 347463), CD90 (cat.555595), CD73 (cat.561014) y CD105 (cat. 56144) todos de la marca BD Pharmigen™. Los datos fueron adquiridos en un citómetro de flujo BD FACSCalibur y analizados por el software Cell Quest PRO™ (Becton Dickinson) con una media de 10, 000 eventos.

**Cultivo de las células mononucleares adherentes.** Una vez aisladas las células mononucleares, se procedió a expandir una alícuota de  $5 \times 10^5$  células en cultivo en dos dimensiones con medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Life Technologies, EU) enriquecido con 10% de suero humano (BIOWEST, cat. S4190-100), 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco Life Technologies, EU). Los cultivos se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en pozos de cultivo de 4.9 cm<sup>2</sup> por un periodo de 14 días, realizando cambios del medio cada dos días hasta alcanzar el 90% de confluencia. Posteriormente, las alícuotas con células se marcaron con los anticuerpos y se procedió a realizar el análisis por citometría de flujo e inmunofluorescencia para establecer su inmunofenotipo.

**Caracterización por inmunofluorescencia.** Las monocapas obtenidas después de 14 días de cultivo primario fueron fijadas con PFA (Paraformaldehído) al 2% durante 20 minutos, posteriormente fueron lavadas con PBS y despegadas de la caja de cultivo empleando acutasa en lugar de tripsina debido a que no necesita lavados, no daña las paredes celulares y de esta forma ayuda a conservar la viabilidad celular. Una vez despegadas, las células fueron marcadas usando una dilución de 2:100  $\mu$ L de los anticuerpos primarios (CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 y CD105) y una dilución de 1:100  $\mu$ L de los anticuerpos secundarios

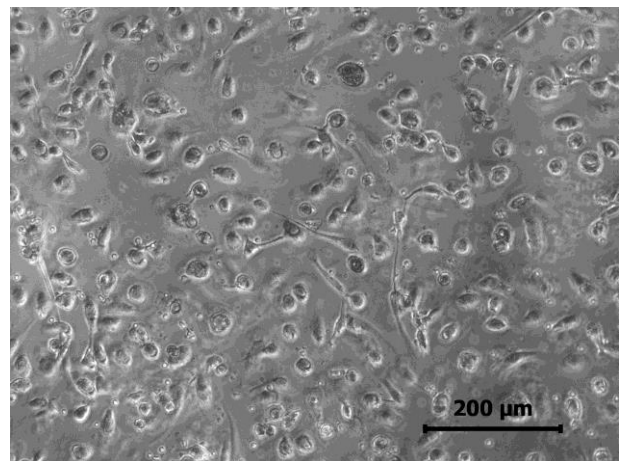
(anti IgG-FITC, anti IgG1-FITC y anti IgG2a-FITC). Después del marcaje las monocapas se trataron con el medio de montaje VECTASHIELD® que contiene el colorante DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) para teñir los núcleos de las células. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio vertical Carl Zeiss con el sistema de imagen Axio Vission 4.8.2.

**Análisis estadístico.** Todos los datos se expresan como promedio y desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con el programa STATISTICA (sistema de software de análisis de datos, StatSoft.), versión 7. Se compararon los resultados de todos los marcadores de superficie expresados en células mononucleares aisladas el día de la toma de la sangre periférica y a 14 días de cultivo primario. La comparación se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se considero como diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de  $p < 0.05$ .

## Resultados

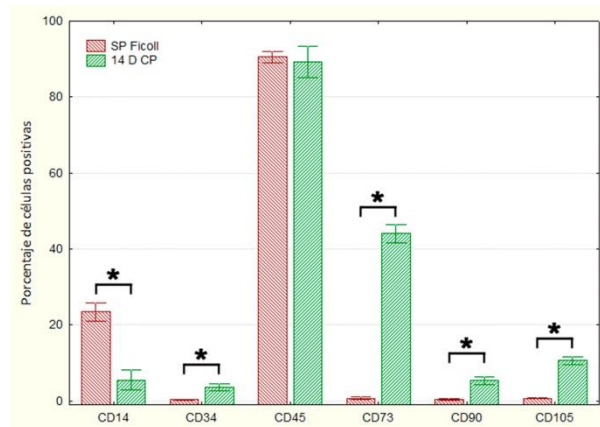
**Número de células mononucleares aisladas.** De la muestra de 20 mL de sangre periférica del remanente de las bolsas de donación, se obtuvo un promedio de  $7.94 \times 10^6$  células mononucleares después de la separación por gradiente de concentración de Ficoll.

**Morfología de las células cultivadas.** A los 14 días de cultivo primario las células presentaron principalmente dos morfologías: alargadas parecidas a fibroblastos y redondeadas (figura 1).



**Figura 1.** Microfotografía en campo claro del cultivo *in-vitro* a los 14 días de sembradas las células aisladas de sangre periférica humana.

**Inmunofenotipo de las células recién aisladas vs post-cultivo.** El inmunofenotipo de las células mononucleares aisladas después del gradiente de concentración por Ficoll comparado con el evaluado a los 14 días de cultivo fue el siguiente: CD14 (23.44% ± 2.55 vs 5.53% ± 2.70), CD34 (0.29% ± 0.15 vs 3.56% ± 0.87), CD45 (90.54% ± 1.52 vs 89.20% ± 4.38), CD73 (0.63% ± 0.36 vs 44.07% ± 2.52), CD90 (0.33% ± 0.24 vs 5.32% ± 1.03) y CD105 (0.71% ± 0.21 vs 10.59% ± 1.10), respectivamente. Al comparar los promedios con la prueba U de Mann-Whitney entre las lecturas de los marcadores de superficie del día del aislamiento versus a los 14 días de cultivo se observó una disminución estadísticamente significativa de los marcadores de monocitos CD14 ( $p < 0.05$ ) y el marcador de células troncales hematopoyéticas CD34 ( $p < 0.05$ ), solo se mantuvo sin cambios significativos el porcentaje de células positivas para el marcador CD45. Por otra parte, los marcadores para células troncales mesenquimales (CD73, CD90 y CD105) presentaron un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto al número basal obtenido después del aislamiento de las células mononucleares por el gradiente de concentración con Ficoll y la medición a los 14 días de cultivo primario. (figura 2)



**Figura 2.** Comparación del inmunofenotipo de las células mononucleares aisladas de sangre periférica humana; barra roja: células aisladas después del gradiente de concentración con el Ficoll (SP inicio de cultivo) y barra verde: células a 14 días de cultivo primario *in-vitro*.

\*. Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ )

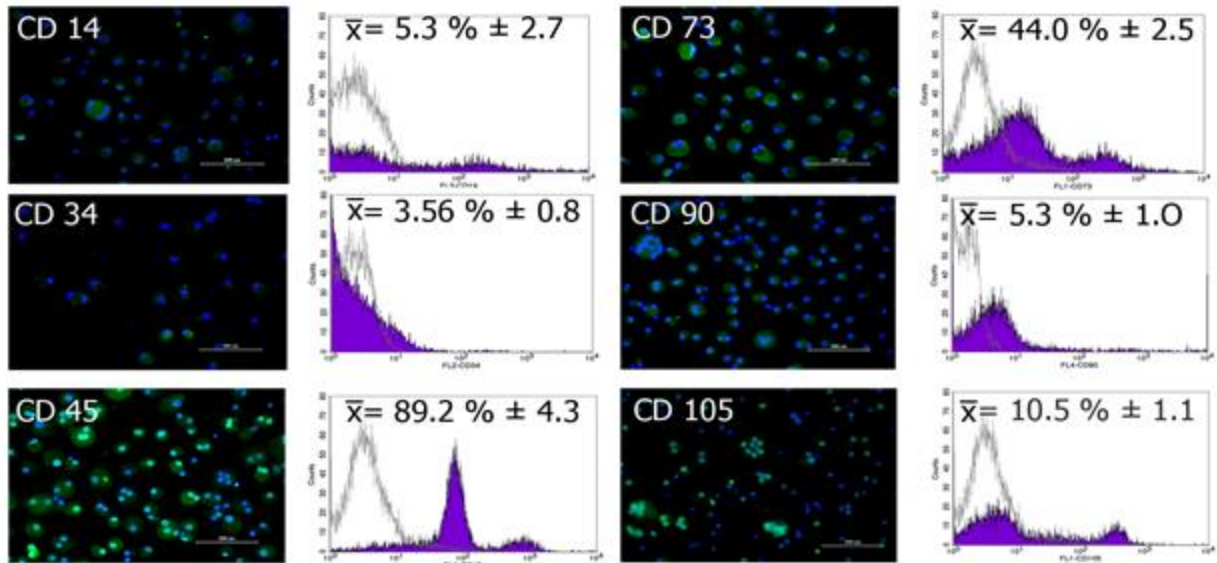
A partir del marcaje por inmunofluorescencia y citometría de flujo a 14 días de cultivo primario se

estableció que existen una población heterogénea de células en el cultivo compuestas por células que expresan marcadores de superficie para células troncales mesenquimales y células hematopoyéticas maduras, observándose marcas positivas de color verde y núcleos de las células en azul teñidas con DAPI. Además que en los histogramas por citometría de flujo el pico delimitado por la línea gris representa el control de isotipo; el pico de color lila representa la marca positiva del anticuerpo asignado (figura 3)

### Discusión

Los criterios mínimos para definir una CTM propuesta por la Sociedad Internacional de Terapia Celular son la adherencia a las cajas de cultivo bajo condiciones estándar, la expresión positiva de los marcadores de superficie (CD105, CD73 y CD90) y ausencia de la expresión de marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79alfa o CD19 y HLA-DR), así como la capacidad para diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condrocitos.<sup>18</sup> Por otra parte, se han logrado aislar CTM en bajas densidades en la sangre periférica en especies animales como ovino<sup>19</sup> y rata.<sup>20</sup> Las células troncales mesenquimales tiene un potencial de revolucionar el tratamiento de enfermedades ortopédicas y de discapacidad, pues tienen la habilidad de renovarse y diferenciarse a varios tipos de tejidos bajo condiciones específicas. El uso de las CTM puede llegar a ser la clave de la regeneración natural celular, enfocando al potencial de nuevos cultivos de tejidos y órganos reemplazando el daño o enfermedad del tejido.<sup>4</sup> Por lo que si se puede obtener las CTM de una manera mas sencilla y minimizando el riesgo de su obtención sería de gran beneficio para los pacientes y los sistemas de salud. El beneficio del aislamiento de CTM de remanentes de sangre periférica de donación, en contraste con otros tejidos como la médula ósea, se eliminarían las desventajas como el hecho de ser un procedimiento invasivo y doloroso.

En éste trabajo se describe un primer abordaje en el aislamiento de CTM de SP en humanos, sin el antecedente de la aplicación de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), lo que evitaría los efectos adversos propios de este tratamiento, así como los criterios de selección específicos de los pacientes. Con estos resultados, se ha podido demostrar que es posible aislar células mononucleares positivas para línea mesenquimal (CD73, CD90 y CD105) que tienen la capacidad de multiplicarse en cultivo monocapa y la posibilidad



**Figura 3.** Expresión del inmunofenotipo de las células mononucleares a 14 días de su cultivo *in-vitro*. En las microfotografías se observa por inmunofluorescencia la marca positiva de color verde y los núcleos de las células en azul teñidos con DAPI. En los histogramas por citometría de flujo el pico delimitado por la línea gris representa el control de isotipo; el pico de color lila representa la marca positiva del anticuerpo asignado.

de ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades o generación de nuevos modelos dentro de la ingeniería tisular. Esta población celular se puede expandir de forma exponencial para luego ser aislada del resto de las células negativas a los marcadores de superficie de CTM. De ésta forma es posible obtener un número suficiente de mesenquimales que se requiera para ensayos preclínicos, ya que es importante recordar que pueden ser expandidas durante muchos pases sin que pierdan su capacidad de diferenciarse a cualquier linaje de origen mesenquimal. Se requieren estudios con mayor número de muestras para determinar si estos resultados persisten constantes, así mismo es importante cuantificar y estudiar de forma cotidiana los buffy coat generados como desecho en los bancos de sangre y transformarlo en una fuente de fácil acceso que genere un banco de CTM para ensayos pre-clínicos sin el riesgo de morbilidad por toma de muestras o por la administración de G-CSF.

### Conclusion

Es posible aislar del remanente de donación sanguínea una población de células con marcadores positivos para CTM (CD73, CD90 y CD105), capaces de adherirse al plástico y multiplicarse disminuyendo significativamente la expresión de marca-

dores hematopoyéticos e incrementando la de marcadores característicos del linaje mesenquimal a los 14 días de cultivo *in-vitro*.

### Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el CONACyT: PDCPN-2013-01-215138; Tecnología, Secretaría de Ciencia e Innovación subvenciones: SECITI 079 BIS / 2013 y SECITI / INR / GOB-25/2013. Agradecemos apoyo y colaboración al personal de Banco de Sangre del INR-LGII: QFB. Mónica Saldaña García, Dra. Cecilia Nieto Gómez y Dr. Miguel Antonio Cervera Bustamante.

### Bibliografía

1. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 1970;3:393-403.
2. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-42.
3. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-28.

4. Landa-Solis C, Vazquez-Maya L, Martinez-Pardo ME, et al. Use of irradiated human amnion as a matrix for limbal stem cell culture. *Cell Tissue Bank* 2013;14:77-84.
5. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002;30:870-8.
6. Campagnoli C, Roberts I, Kumar S, Bennett PR, Fisk NM. Clonal culture of fetal cells from maternal blood. *Lancet* 2001;357:962.
7. Rammal H, Beroud J, Gentils M, et al. Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. *Bio-medical materials and engineering* 2013;23:299-309.
8. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 2005;23:1105-12.
9. Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N, et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2004;89:1421-7.
10. Gallardo F, Esteller M, Pujol RM, Costa C, Estrach T, Servitje O. Methylation status of the p15, p16 and MGMT promoter genes in primary cutaneous T-cell lymphomas. *Haematologica* 2004;89:1401-3.
11. Fu W-L, Zhang J-Y, Fu X, et al. Comparative study of the biological characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow and peripheral blood of rats. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1793-803.
12. Azouna NB, Berraeis L, Regaya Z, Jenhani F. Immunophenotyping of hematopoietic progenitor cells: Comparison between cord blood and adult mobilized blood grafts. *World J Stem Cells* 2011;3:104-12.
13. Villa-Diaz LG, Brown SE, Liu Y, et al. Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2012;30:1174-81.
14. Jin P, Wang E, Ren J, et al. Differentiation of two types of mobilized peripheral blood stem cells by microRNA and cDNA expression analysis. *J Transl Med* 2008;6:39.
15. Bieback K, Kern S, Kocaomer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng* 2008;18:S71-6.
16. Lu R-N, Miao K-R, Zhang R, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation following myeloablative conditioning regimens in hematologic diseases with G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells grafts without T cell depletion: a single center report of 38 cases. *Med Oncol* 2014;31:81.
17. Deng J, Zou ZM, Zhou TL, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue. *Neurol Sci* 2011;32:641-51.
18. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 2006;8:315-7.
19. Lyahyai J, Mediano DR, Ranera B, et al. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res* 2012;8:169.
20. Jia LY, Zhang Q, Fang N, et al. [Enrichment and Biological Characteristics of Peripheral Blood-derived Mesenchymal Stem Cells in Rats]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2015;23:506-11.