

Expresión del gen Bcl2 en cáncer de próstata resistente a la castración. Perspectiva urológica

Rafael Francisco Velázquez Macías

RESUMEN

En el sector salud mexicano, el cáncer de próstata ocupa un lugar preponderante como causa de mortalidad y morbilidad. Las proteínas de la familia Bcl2 participan promoviendo e inhibiendo la proliferación celular. La evidencia de actividad de esta familia en el cáncer de próstata motiva a investigar su papel en el cáncer hormonorresistente. Se realizó búsqueda por conveniencia en medios electrónicos nacionales e internacionales a fin de establecer el vínculo entre la actividad molecular de Bcl2 en el cáncer de próstata hormonorresistente; se incluyeron 41 publicaciones nacionales e internacionales. El cáncer de próstata resistente a la castración aparece en 10 a 20% en los siguientes cinco años después del diagnóstico y se distingue por la persistencia o elevación del antígeno prostático y enfermedad metastásica. Bcl2 sólo se ha identificado en el cáncer de próstata incipiente o localizado que progresa o no a una enfermedad avanzada, sin importar el tratamiento inicial. La presencia de Bcl2 en el cáncer avanzado de próstata resistente o no a la castración no se ha informado hasta el momento. El Bcl2 está expresado en el cáncer localizado de próstata con o sin progresión. Se desconoce si se expresa en el cáncer avanzado resistente o no a hormonoterapia.

Palabras clave: cáncer de próstata, resistencia hormonal, Bcl2, apoptosis.

ABSTRACT

Prostate cancer is a frequent disease in the Mexican population, the castration resistant variety causes high morbidity/mortality rates. The Bcl-2 family members induce and inhibit the apoptosis process. There is evidence that these members are active in prostate cancer patients. Because of this, the role of Bcl-2 in castration resistant prostate cancer is investigated. To establish the Bcl-2 role in castration resistant prostate cancer a non-extensively reviews in national and international electronic browsers were made. 41 papers were included. The castration resistant prostate cancer can appear during the next five years in 10-20%. Bcl-2 is present in localized prostate cancer, both with progression or not progression after primary treatment. There was no evidence of Bcl2 activity in advanced prostate cancer with or without castration resistant. Bcl2 is present in localized prostate cancer with or without subsequent disease progression. The presence of Bcl2 in castration resistant prostate cancer was not informed.

Key words: prostate cancer, Bcl-2, castration resistant, apoptosis.

Servicio de Urología, Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, ISSSTE.

Correspondencia: Dr. Rafael Francisco Velázquez Macías. Avenida Universidad 1321, colonia Florida, CP 01030, México, DF. Correo electrónico: ravelma@urocirugia.com

Recibido: agosto 2013.
Aceptado: octubre 2013.

Este artículo debe citarse como: Velázquez-Macías RF. Expresión del gen Bcl2 en cáncer de próstata resistente a la castración. Perspectiva urológica. Rev Esp Méd Quir 2013;18:339-344.

El cáncer de próstata tiene distribución mundial y en muchos países ocupa un lugar preponderante como causa de mortalidad. Tan sólo en 2007 fallecieron por causa de esta neoplasia 7.9 millones de personas; es decir, 13% de las defunciones generales. Las demás defunciones se debieron a cáncer de pulmón (primer lugar entre hombres), de estómago, de hígado, de colon y de mama (primer lugar entre mujeres). La Organización Mundial de la Salud considera que las muertes por neoplasias aumentan y llegarán a 12 millones para 2030.¹

En el sector salud mexicano, el cáncer de próstata se incrementó de 295 a 4,877 casos durante el periodo de 1996 a 2005. En el Instituto Mexicano del Seguro Social, entre 2004 y 2005, este cáncer representó 4% de las neoplasias y en la Secretaría de Salud ocupó el segundo lugar de tales neoplasias. Durante ese mismo periodo, la mortalidad fue de 4.4%.²

En 2007, en México, el cáncer de próstata ocupó el segundo lugar de egresos hospitalarios, con 8.3%, por debajo de las leucemias, con 19.4%. En cambio, las muertes por este tipo de cáncer alcanzaron el primer lugar en 2006; en el grupo de 50 a 59 años de edad, la mortalidad es de 3.9 a 4.6%, misma que se incrementa a 94.9% después de los 60 años de edad.³⁻⁶

La esperanza de vida de los mexicanos se ha incrementado en las últimas décadas, lo que conlleva a una detección mayor de cáncer de próstata, inquietud que obligó a crear guías para diagnóstico y tratamiento de una manera más sistematizada, al fin de obtener un seguimiento más homogéneo e interpretar mejor la tendencia de la enfermedad.⁷ No obstante, el costo económico de la atención del cáncer de próstata es alto. Por ejemplo, en el Hospital General Dr. Manuel Gea González, de la Secretaría de Salud en México, un análisis del gasto total para la detección, tratamiento y control del cáncer de próstata establece que lo anterior equivale a 111% (mínimo 28, máximo 255) de un salario mínimo mensual de 2005.⁸ Por otra parte, como en muchos otros cánceres, no hay síntomas en las etapas iniciales, lo que puede dar lugar a la identificación del mismo cuando ya se encuentra en etapas avanzadas; esto ocurre en 10 a 50% de los casos. El cáncer avanzado de próstata implica invasión a las vesículas seminales y la vejiga o invasión metastásica a los ganglios linfáticos, el hueso y el pulmón. El tratamiento está dirigido a evitar o disminuir el progreso de la enfermedad y se basa en el agotamiento de la testosterona circulante, lo que puede lograrse interviniendo la vía central que involucra al eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Para ello se utilizan análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante, como acetato de leuprolide, goserelina o buserelina, los cuales compiten con la hormona liberadora nativa al unirse a los receptores gonadótropos. Asimismo, se complementa el agotamiento de testosterona con fármacos antiandrogénos, como acetato de ciproterona, flutamida,

bicalutamida o nilutamida, que bloquean la testosterona proveniente de la glándula suprarrenal. La combinación de estos dos grupos de fármacos se denomina bloqueo androgénico total, privación androgénica máxima o, simplemente, tratamiento hormonal.⁹⁻¹¹

CÁNCER RESISTENTE A TRATAMIENTO HORMONAL

La respuesta terapéutica de la privación androgénica máxima se mide mediante la determinación periódica del antígeno prostático específico, seguimiento de las metástasis existentes, búsqueda de nuevas y vigilancia de los efectos colaterales. El tiempo que puede durar una respuesta terapéutica favorable es variable, entre 12 y 58 meses después de haber iniciado el tratamiento, con mediana de 17 meses. Mientras haya esa respuesta favorable se considera cáncer hormonosensible. Una vez que ya no hay tal respuesta, el cáncer vuelve a extenderse e invadir otros territorios orgánicos; entonces la esperanza de vida disminuye a una mediana de 14 meses (9-30 meses). Este fenómeno se denomina cáncer hormonorresistente o resistente a la castración. En general, para considerar que el cáncer de próstata es hormonorresistente se debe observar por lo menos alguna de las siguientes características a saber: tres elevaciones consecutivas del antígeno prostático específico con una diferencia de dos semanas entre cada determinación, una elevación de más de 50% del antígeno, en comparación con el nadir (valor más bajo obtenido durante el tratamiento), o aparición de nuevas metástasis o crecimiento de las existentes.¹²⁻¹⁵

Los pacientes con cáncer avanzado de próstata evolucionan a cáncer resistente a tratamiento hormonal en 10 a 20% en los cinco años posteriores al diagnóstico. Las metástasis óseas pueden aparecer en más de 84%; no obstante, 33% van a padecer más metástasis en los siguientes dos años. Se ha reportado que sólo 37% recibe quimioterapia con docetaxel o cabazitaxel; el resto recibe principalmente esteroides o alguna otra modalidad terapéutica.^{15,16}

La etapa avanzada del cáncer de próstata representa el camino común que puede seguir un paciente con este cáncer; no obstante, la otra vertiente que terminará en esta senda queda representada, incluso, por 40% de

los hombres con enfermedad clínicamente localizada que tienen recidivas luego del tratamiento inicial con intención curativa, como la prostatectomía radical y la radioterapia en sus diversas modalidades.¹⁷

Un aspecto que continúa en la mesa de discusiones es la medición rutinaria de testosterona plasmática. No obstante, existe el acuerdo en que esta medición debe hacerse cuando exista duda de que haya una verdadera resistencia hormonal o para confirmar que realmente se logró la privación androgénica máxima. Las cifras de testosterona plasmática en este contexto pueden variar de 15 a 50 ng/dL. El valor de castración es 20 ng/dL;¹⁸ sin embargo, se considera castración cuando la testosterona plasmática es de 20 a 50 ng/dL.^{19,20}

El estudio de los mecanismos de resistencia hormonal se enfoca principalmente en el receptor de andrógenos. La localización celular del receptor es el núcleo y se ha observado que tras la administración del tratamiento hormonal aparecen alteraciones en muchos genes cuya expresión se alteraba y ello podría reactivar el receptor androgénico. También se señala que 20 a 30% de las muestras tomadas de pacientes con cáncer resistente al tratamiento hormonal muestran amplificación del gen del receptor de andrógenos, lo que podría tener como consecuencia mayor estabilidad de las proteínas o la fosforilación del receptor y aumentar las concentraciones circulantes o la actividad de ese receptor. En ratones transgénicos se observó que mutaciones puntuales de aminoácidos ante la exposición a flutamida o bicalutamida pueden promover la aparición de neoplasias intraepiteliales, adenocarcinoma y metástasis. La otra línea de enfoque del origen de la resistencia hormonal es la que involucra a las células madre prostáticas, que se cree residen en el compartimiento de las células basales. En modelos de ratones con cáncer de próstata que fueron castrados se producía apoptosis en 90% de las células epiteliales, dejando intactas las células basales; éstas pueden repoblar la próstata con células epiteliales si vuelve a haber un estímulo androgénico.^{21,22}

Bcl2

En 1985, Bakhshi y colaboradores²³ informaron que había traslocación entre los cromosomas 14 y 18 {t(14;18)(q32;q21)} en 60% de los linfomas foliculares obteni-

dos de pacientes con tales neoplasias; ello implicaba la posibilidad de haber identificado un gen que tuviera participación en la aparición de estos cánceres. Años más tarde, este gen surgido de la transferencia de material génico del cromosoma 14 al cromosoma 18 (18q21) se denominaría gen 2 de linfoma de células B, Bcl2. En este locus se encuentran los genes que participan en la formación de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas, por lo que la inclusión de este gen traslocado puede dar lugar a alteraciones en la función del gen no alterado. La expresión del Bcl2 es alta en células B inmaduras, pero se reprime en células B maduras; en las células neoplásicas linfoides, dicha expresión también es alta.²⁴ En la actualidad se sabe que el Bcl2 codifica una familia de proteínas con propiedad híbrida sobre la apoptosis. Esto significa que puede inducir la apoptosis o impedirla.²⁵

El proceso de apoptosis juega un papel muy importante en la aparición y mantenimiento de la homeostasis tisular de organismos multicelulares. En el humano adulto se estima que se producen y, paralelamente, se eliminan aproximadamente 60 mil millones de células por día; las nuevas se producen por división celular y las viejas se eliminan por apoptosis.²⁶ La apoptosis se desencadena por una amplia gama de señales que dan lugar a dos vías principales, denominadas extrínseca, o vía de receptores de muerte, e intrínseca o vía mitocondrial. La extrínseca inicia cuando ligandos se unen a receptores de la superficie celular, como el de Fas (sintetasa de ácidos grasos), o el de factor de necrosis tumoral (TNF). La estimulación resulta en una oligomerización de los receptores, que a su vez da lugar al reclutamiento de una proteína asociada con el dominio de muerte del Fas (FADD) y de caspasa 8 (proteasa contra aspartato dependiente de cistina), mismos que en conjunto forman el complejo de señalización que induce la muerte celular (DISC). Este complejo, a su vez, activa las caspasas 3, 6 y 7, que son las efectoras de la muerte celular en la vía común. La vía intrínseca se desencadena por diversos estímulos que convergen en la mitocondria; en respuesta, ésta produce citocromo C, que se fija al factor 1 de activación de proteasas de apoptosis (Apaf-1) y a la pro-caspasa 9; esto da lugar a un complejo tipo DISC, denominado apoptosoma; dentro de este complejo se activa la caspasa 9, que a su vez activa a la caspasa 3. Éste es el punto de convergencia

de las dos vías descritas, iniciándose así la vía común que culmina en el empaquetamiento del contenido celular en cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por macrófagos.²⁷⁻²⁹

Estos mecanismos de apoptosis son gobernados de manera muy importante, aunque no exclusivamente, por las proteínas de la familia del Bcl-2. Las proteínas proapoptosis Bax (proteína X asociada con Bcl) y Bak (proteína antagonista/asesina asociada con Bcl), pertenecientes a esta familia, inducen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y producen la liberación de caspasas y otros mediadores de muerte celular; en cambio, la proteína Bcl-2 propiamente impide dicha permeabilización de la membrana externa mitocondrial, sirviendo como una especie de guardián para que no ocurra el fenómeno.^{26,30}

Se ha observado que la expresión del gen Bcl-2 reestructurado se asocia con pronóstico malo en linfomas no Hodgkin de células grandes. Asimismo, esta actividad del Bcl-2 pudiera participar en la resistencia a la quimioterapia de neoplasias hematológicas ante una amplia gama de fármacos quimioterapéuticos con mecanismos de acción diversos, como anti-ADN, anti-microtúbulos, análogos de nucleósidos y glucocorticoides.³¹⁻³³

Bcl2 y cáncer de próstata

Hockenbery y colaboradores,³⁴ en 1991, mediante anticuerpos monoclonales anti-Bcl-2, observaron que no sólo las células B y células T expresan el gen Bcl2. También observaron, aunque en menor proporción, tres clases de líneas celulares que podían expresarlo, a saber: los epitelios glandulares, en los que hormonas y factores de crecimiento regulan la hiperplasia e involución; los epitelios con diferenciación compleja, como la piel y el intestino, donde las células madre son longevas; y células posmitóticas longevas, como las neuronas. En la próstata observaron que la tinción de Bcl-2 estaba en las células basales del epitelio prostático pseudocolumnar. En cambio, en las células de las columnas prostáticas y en el tejido hiperplásico no había tinción que indicara la presencia del gen.

Experimentalmente, Liu y su grupo,³⁵ en 1996, utilizando ratones injertados con células prostáticas cancerosas y sometidos a castración, observaron la presencia de Bcl2 en el tejido prostático obtenido de

ratones que tuvieron resistencia hormonal evidenciada por el recrecimiento tumoral posterior a la castración. McDonnell y colaboradores³⁶ identificaron, mediante inmunohistoquímica, Bcl-2 en tejido neoplásico obtenido de bloques de parafina de pacientes sometidos a prostatectomía radical; 19 habían hecho recidiva bioquímica, pero respondían a la privación androgénica, y 13 habían tenido hormonorresistencia. El Bcl2 se identificó en 77% de los pacientes hormonosensibles y en 32% de los hormonorresistentes. Asimismo, otros investigadores informaron en sus hallazgos que pacientes con cánceres localizados o localmente avanzados progresaron tras el tratamiento primario. Así, Revelos y su grupo³⁷ observaron que había expresión del gen Bcl-2 en el tejido de pacientes sometidos a prostatectomía radical y que tuvieron recidiva bioquímica. En 2010, Park y colaboradores³⁸ estudiaron los bloques de parafina de 105 pacientes con cáncer de próstata y observaron que el Bcl-2 se asoció con metástasis óseas y linfáticas. En ese mismo año, Baseskioglu y su grupo³⁹ observaron que Bcl-2 se expresaba en 5% de las células basales del tejido tomado de pacientes operados de prostatectomía radical. En cambio, Cho y colaboradores⁴⁰ observaron una asociación inversamente proporcional entre el periodo libre de enfermedad y la presencia de Bcl-2 en pacientes con cáncer de próstata que también fueron operados de prostatectomía radical; sólo 24.6% de 42 pacientes estudiados mostraba la expresión del Bcl2. El área terapéutica, tomando como blanco a Bcl2, representa una línea de investigación muy importante, con el fin de ampliar las alternativas terapéuticas existentes. En 1999, Gleave y su grupo,⁴¹ utilizando líneas celulares (LNCaP) y ratones machos sin timo, observaron que la administración de oligodesoxinucleótidos contrasentido disminuía la expresión *in vitro* de Bcl2 en ratones castrados que habían tenido resistencia hormonal, además de mostrar una disminución *in vivo* del crecimiento tumoral y evitar el aumento del antígeno prostático. Estos resultados abren la posibilidad de dirigir la terapia a un blanco, el Bcl2, involucrado en la progresión a la resistencia hormonal en el cáncer de próstata. Hasta el momento, la información acumulada de Bcl2 en el cáncer de próstata se ha dirigido a confirmar la expresión del mismo y correlacionarla con variables clínicas y quirúrgicas, pero en etapas tempranas de la enfermedad. Entonces,

resulta interesante preguntarse si la expresión del Bcl2 posee características semejantes a las observadas hasta el momento en pacientes con enfermedad avanzada y que manifiestan resistencia hormonal subsecuente.

REFERENCIAS

- Organización Mundial de la Salud. [OMS] (2010). Cáncer. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
- León G, Cabrera D, De la Rosa B. Cáncer de próstata en México: su registro en las estadísticas. *Epidemiología* 2009;26:1-2.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas a Propósito del Día Mundial contra el Cáncer. México, DF, 4 de febrero de 2010.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Serie de Estadísticas Vitales. 2008:1-6.
- Bernal L. Epidemiología del cáncer de próstata. *Rev Oncol* 2001;5:11-21.
- Merayo Ch, Sánchez G, Santana Z, Pérez R y col. Prevalencia del cáncer de próstata incidental en el Hospital General Dr. Manuel Gea González; 20 años de revisión. *Rev Mex Urol* 2009;69:147-152.
- Jiménez RMA, Solares SM, Martínez CP, Aguilar PJL y col. Oncoguía: cáncer de próstata. *Cancerología* 2011;6:13-18.
- Márquez J, Rojas L, Ávila N, Pacheco C y col. El costo del cáncer de próstata. ¿Qué esperamos? *Rev Mex Urol* 2005;65:307-311.
- Vega R, Figueroa H. Evaluación del acetato de ciproterona en el control del cáncer de próstata avanzado (D-II). *Bol Goleg Mex Urol* 1996;13:77-82.
- Ricardez A, Rodríguez M, Ricardez A, Pámanes A y col. Hormonoterapia para el manejo de cáncer de próstata. Reporte preliminar. *Rev Mex Urol* 2001;61:184-192.
- Tombal B, Stainler A. Hormone therapy in the management of prostate cancer. *Eur Urol Rev* 2010;5:22-26.
- Goodin S, Rao K, DiPaola R. State-of-the-art treatment of metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Oncologist* 2002;7:360-370.
- Hotte S, Saad F. Current management of castrate-resistant prostate cancer. *Curr Oncol* 2010;17:73-79.
- Motte N, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2011;59:572-583.
- Kirby M, Hirst C, Crawford E. Characterizing the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract* 2011;65:1180-1192.
- García E, Velázquez-Macías R, Leiva A, Reyes O y col. Tratamiento del cáncer de próstata hormono-resistente con calcitriol en pacientes del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos. *Rev Mex Urol* 2003;63:274-284.
- Ward JF, Moul JW. Treating the biochemical recurrence of prostate cancer after definitive primary therapy. *Clin Prostate Cancer* 2005;4:38-44.
- Jan de Jong I, Eaton A, Bladou F. LHRH agonist in prostate cancer: Frequency of treatment, serum testosterone measurement and castrate level: Consensus opinion from a roundtable discussion. *Curr Med Res Op* 2007. <http://www.cmrojournal.com>.
- Rove KO, Debruyne FM, Djavan B, Gomella LG, et al. Role of testosterone in managing advanced prostate cancer. *Urology* 2012;80:754-762.
- Cózar JM, Solsona E, Morote J, Miñana B, et al. Recommendations on the management of controversies in advanced castrate-resistant prostate cancer. *Actas Urol Esp* 2012;36:569-577.
- Kasper S, Cookson MS. Mecanismos que conducen a la aparición de cáncer de próstata hormono-resistente. *Urol Clin N Am* 2006;33:201-210.
- Culing Z, Bartsch G. Androgen axis in prostate cancer. *J Cel Biochem* 2006;99:3737-3781.
- Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985;41:889-906.
- Graninger WB, Seto M, Boutain B, Goldman P, et al. Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig. Fusion transcripts in normal and neoplastic cells. www.jci.org/articles/view/113235/files/pdf
- Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* 2006;13:1378-1386.
- Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 2008;111:3322-3330.
- Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005;4:139-163.
- Häcker G, Weber A. BH3-only proteins trigger cytochrome C release, but how? *Arch Biochem Biophys* 2007;462:150-155.
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor super family. *Nat Rev Cancer* 2002;2:420-430.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007;26:1324-1337.
- Garber K. New apoptosis drugs face critical test. *Nat Biotechnol* 2005;23:409-411.
- Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:989-1000.
- Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:1001-1012.
- Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, et al. Bcl2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961-6965.
- Liu AY, Corey E, Bladou F, Lange PH, et al. Prostatic cell lineage markers: emergence of BCL2+ cells of human prostate cancer xenograft LuCaP 23 following castration. *Int J Cancer* 1996;65:85-89.
- McDonnell T, Troncoso P, Brisbay S, Logothetis C, et al. Expression of the proto-oncogene Bcl-2 in the prostate and

- its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Research* 1992;52:6940-6944.
37. Revelos K, Petraki C, Gregorakis A, Scorilas A, et al. Immunohistochemical. Expression of Bcl2 is an independent predictor of time-to-biochemical failure in patients with clinically localized prostate cancer following radical prostatectomy. *Anticancer Research* 2005;25:3123-3134.
38. Park S, Sung W, Kim M. p16INK4a-PTEN, E-cadherin, Bcl-2 and Ki-67 expression in prostate cancer: Its relationship with the metastatic potential and known prognostic factors. *Korean J Pathol* 2010;44:597-604.
39. Baseskioglu B, Akdogan B, Baydar D, Ozen H. Can p53, Ki-67 and bcl-2 predict biochemical failure after radical prostatectomy? *Indian J Urol* 2010;26:206-212.
40. Cho I, Chung S, Cho K, Kim J, et al. Bcl-2 as a predictive factor for biochemical recurrence after radical prostatectomy: An interim analysis. *Cancer Res Treat* 2010;42:157-162.
41. Gleave M, Tolcher A, Miyake H, Nelson C, et al. Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model. *Clin Cancer Res* 1999;5:2891-2898.