

Análise ecocardiográfica da função diastólica do ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio em ratos

Echocardiographic analysis of the ventricular diastolic function after myocardial infarction in rats

Cláudio Léo GELAPE, Marcelo Dias SANCHES, Rosália Morais TÔRRES, Cláudia Alves COUTO, Pedro Corrêa PAIXÃO, Klaus MORALES, José Renan da Cunha MELO

RBCCV 44205-731

Resumo

Objetivo: Avaliar a função ventricular diastólica do ventrículo esquerdo (VE) pelo ecocardiograma (ECO) uma e três semanas pós-infarto agudo do miocárdio (IAM).

Método: Utilizaram-se 19 ratos Wistar com peso médio de 209 gramas. Os animais foram distribuídos em: grupo A, controle (n=7) submetido a ECO e não infartado; grupo B, infartado (n=9), submetido a ECO após uma semana (grupo B1, n=9) e 3 semanas (grupo B3, n=8) do IAM. Três animais morreram no transoperatório e um após o primeiro ECO. Realizou-se anestesia com cetamina (50mg/kg/peso) e xilazina (10mg/kg/peso) intraperitoneal, intubação e ventilação. O IAM foi induzido por ligadura da artéria descendente anterior após toracotomia esquerda. Avaliou-se a função cardíaca por ECO modelo 21275A HP Sonos 1500 com transdutor de 7,5/5,5 MHz e a função diastólica pelo Doppler transmitral com avaliação das ondas A e E, e volume atrial esquerdo (VAE). O IAM foi confirmado por análise histopatológica na terceira semana.

Resultados: Não houve diferença significativa na velocidade das ondas E (A=62cm/s, B1=65cm/s, B3=69cm/s) e onda A (A=43cm/s, B1=40cm/s, B3=41cm/s) entre os grupos. Observou-se aumento significativo no VAE grupo A vs B1 e grupo A vs B3 (A=0,05mL vs B1=0,15mL, p=0,04 e A vs B3=0,14mL, p=0,01). Todos os animais apresentaram IAM na terceira semana.

Conclusões: VAE parece ser útil para definição da disfunção diastólica do VE pós-IAM. O VAE pode refletir aumento da pressão diastólica final do VE, secundário à disfunção sistólica e/ou diastólica.

Descritores: Infarto do miocárdio. Contração miocárdica. Ecocardiografia.

Abstract

Objective: To evaluate the diastolic left ventricular function by echocardiography one and three weeks after acute myocardial infarction (AMI).

Trabalho desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Endereço para correspondência: Cláudio Léo Gelape. Avenida Francisco Salles 1463, sala 805. Belo Horizonte, MG. CEP:30150-221. Tel: (31) 3241-4950.
E-mail: clgelape@uai.com.br

Artigo recebido em novembro de 2004
Artigo aprovado em fevereiro de 2005

Method: Nineteen Wistar rats (mean 209 g) were utilized. After anesthesia with ketamine (50mg/kg) and xylazine (10mg/kg), the left coronary artery was ligated after left thoracotomy to cause myocardial infarction. The animals were divided in two groups: group A (control, n=7) and group B (n=9). Echocardiographic evaluation was undertaken in the control group and one week (B1, n=9) and three weeks (B3, n=8) post-AMI in group B animals. The cardiac function was evaluated using a 21275 A HP Sonos 1500 Echocardiography equipped with 7.5/5.5 MHz transducer. Diastolic function was evaluated by transmitral flow, by analysis of the A wave, E wave and atrial left volume (LAV). Histological specimens were evaluated on third week.

Results: There were no differences on E wave analyses (A=62cm/s, B1=65cm/s, B3=69cm/s) or A wave analyses (A=43cm/s, B1=40cm/s, B3=41cm/s) between the groups. There was an increase in LAV; A vs B1 and A vs B3 (A=0.05mL vs B1=0.15mL, p=0.04 e A vs B3=0.14mL, p=0.01). Histological examination confirmed AMI in all animals.

Conclusions: The LAV may be useful to assess the diastolic function in rats with AMI. LAV could reflect increases in left ventricular end-diastolic pressure secondary to systolic or diastolic dysfunction.

Descriptors: Myocardial infarction. Myocardial contraction. Echocardiography.

INTRODUÇÃO

O estudo da função diastólica do ventrículo esquerdo (VE) é de grande importância, tendo em vista que as alterações no enchimento desta cavidade são, geralmente, as primeiras anormalidades detectadas que podem ser produzidas por várias doenças que antecedem a disfunção sistólica [1-5]. Aproximadamente 20% a 40% dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) têm função sistólica preservada (na ausência de doença valvar) e são classificados como apresentando alterações no relaxamento ventricular. Vários padrões de enchimento ventricular podem caracterizar, não invasivamente, a disfunção diastólica pelo Doppler transmitral. LAVINE [6] concluiu em seu trabalho que IC pós-infarto agudo do miocárdio (IAM) está associada com redução moderada da fração de ejeção (<40%) e índice pseudonormal de enchimento diastólico. Após IAM, a avaliação da função diastólica, medida pelo Doppler, demonstra informações prognósticas que se somam àquelas obtidas em relação à função sistólica [6].

Quando o Doppler é colocado no nível da valva mitral, observa-se uma curva de velocidade característica, que reflete a mudança de volume que chega ao VE na diástole [5]. O padrão normal de fluxo é bifásico, apresentando uma onda inicial, denominada onda E, que representa o enchimento rápido do VE. Segue-se a fase de desaceleração que inscreve uma segunda onda, denominada onda A, correspondente à sístole atrial [7]. No entanto, as medidas do Doppler são afetadas por múltiplos fatores, tais como pressão de enchimento ventricular e complacência, que são influenciados pela pré e pós-carga, que podem mudar rapidamente. Em contrapartida, o volume do átrio esquerdo (VAE), medido por ecocardiografia, é menos influenciado por mudanças agudas e reflete função diastólica aguda e crônica. É, pois, uma medida mais estável da função diastólica. MOLLER et al. [8], em 2003, demonstraram que o aumento do VAE esteve associado à maior mortalidade após IAM em humanos.

O ecocardiograma (ECO) é útil para avaliação da função

miocárdica em modelos de animais de experimentação após IAM. Embora este método seja cada vez mais utilizado em trabalhos experimentais, não há consenso em relação ao melhor parâmetro para caracterizar a IC diastólica. O volume do átrio esquerdo, que tem sido proposto como importante dado complementar à análise dos índices ecocardiográficos da função diastólica do VE, não foi até o momento analisado em ratos.

OBJETIVOS

- Estabelecer parâmetros ecocardiográficos úteis para diagnóstico de disfunção ventricular diastólica pós-IAM em ratos.
- Avaliar o comportamento do volume do átrio esquerdo após IAM em ratos.

MÉTODO

Foram utilizadas 19 ratas Wistar com peso médio de 209 gramas (180 g a 260 g). Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo controle, chamado grupo A, sem IAM, era composto por sete animais. O grupo B foi constituído de 12 animais submetidos à cirurgia para indução de IAM.

Os animais foram obtidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e acondicionados no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, seguindo os princípios do Comitê de Ética em Experimentação Animal. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com água e ração comercial oferecidas livremente. Não houve jejum pré-operatório.

A indução anestésica foi realizada administrando-se cloridrato de cetamina (50mg/kg/peso) e xilazina (10mg/kg/peso), ambas aplicadas por via intraperitoneal. Na seqüência, os animais foram submetidos à intubação traqueal com cateter de látex (Jelco® 18) e à ventilação manual.

Foi realizada toracotomia no quinto espaço intercostal esquerdo, luxação do coração para identificação da artéria

descendente anterior (DA) localizada na parede anterior entre a aurícula esquerda e a artéria pulmonar. Sua ligadura foi realizada no terço médio com fio polipropileno 7-0 (Ethicon®, Inc., Somerville, NJ) com o intuito de induzir IAM da parede ântero-lateral do VE. A isquemia regional foi confirmada pela rápida mudança de coloração do miocárdio e visibilização de área acinética. A posição anatômica do coração foi restabelecida e a toracotomia realizada com fio de seda 2-0 (Ethicon®, Inc., Somerville, NJ).

A avaliação ecocardiográfica dos animais do grupo A (controle) foi denominada ECO-0. Os animais infartados (grupo B) foram avaliados após uma semana (B1) e três semanas (B3) do IAM, seqüencialmente. O primeiro ecocardiograma após IAM (ECO-1) foi realizado uma semana após a operação (n= 9). O segundo exame (ECO-2) foi realizado três semanas pós-IAM em oito ratas, pois um animal morreu durante a anestesia necessária para realização do M e Doppler.

Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo examinador, duas vezes, sendo em seguida calculada a média de cada parâmetro. Utilizou-se ecocardiograma transtorácico com transdutor multifrequencial de 7,5/5,5 MHz (modelo 21275A Hewlett-Packard sonos 1500, EUA). As imagens obtidas foram registradas em fita cassete Panasonic AG 7350, com fotografia vídeo-printer marca Sony modelo UP 870-MD.

A análise ao Doppler foi realizada no plano apical de quatro câmaras, sendo possível obter o espectro Doppler da valva mitral. Amostra do Doppler pulsado foi colocada no nível da valva mitral pela imagem em quatro câmaras. Ao Doppler determinaram-se as seguintes medidas para análise da função diastólica pela curva de fluxo mitral:

- Onda E – Representa a velocidade máxima alcançada pelo sangue no início da diástole. É a distância vertical entre o ápice de E até o ponto mais posterior do movimento atrial durante a sístole.

- Onda A – Representa a velocidade máxima do sangue alcançada no final da diástole. É a distância vertical entre o ápice de A até o ponto mais posterior do movimento atrial durante a sístole.

- Relação E/A.

A análise da cavidade atrial esquerda foi realizada no modo-M, guiado pelo bidimensional, obtida pelo eixo curto paraesternal esquerdo dos vasos da base. Utilizaram-se cortes apicais de quatro câmaras para obtenção de três dimensões do AE que foram usadas para cálculo do volume como uma elipse, com a seguinte fórmula:

$$VAE = \frac{\pi}{6} (SA1 \times SA2 \times LA)$$

Onde: SA1 = medida do AE ao modo-M

SA2 = medida do eixo curto do AE ao modo bidimensional no corte apical de quatro câmaras, ao final da diástole.

LA = medida do eixo longo do AE no corte apical de quatro câmaras, ao final da sístole.

Esse método segue as recomendações preconizadas por PRITCHET et al. [9], em 2003. Foi determinado então, o VAE.

Análise histopatológica

Foram colhidos três fragmentos dos corações dos animais do grupo B3 (n=8), após eutanásia realizada por exsanguinação por secção da aorta ascendente. Identificaram-se as áreas com lesões macroscopicamente evidentes, supostamente correspondentes às áreas infartadas, distais à ligadura da artéria DA. Os fragmentos foram fixados em solução de formol a 10%, processados e incluídos em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 3 a 4 micrômetros de espessura, posteriormente corados pelo método da hematoxilina e eosina e analisados à microscopia óptica sempre pelo mesmo patologista.

Análise estatística

As medidas descritivas são apresentadas em tabelas com a média, mínimo e máximo. O valor de “n” refere-se ao tamanho da amostra avaliada. Para análise estatística foi aplicado teste não paramétrico (Wilcoxon) para duas amostras independentes, ou seja, não emparelhadas. Foram usados os programas estatísticos Minitab 13 e SPSS 8.0. Fixou-se em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

Foram operadas 12 ratas para indução de IAM. Três animais morreram no transoperatório por falência ventricular esquerda e insuficiência respiratória, perfazendo uma taxa de mortalidade de 25%.

Foram analisados os resultados dos ecocardiogramas realizados nos animais do grupo controle (grupo A; n=7) e nos animais do grupo infartado (grupo B; n=9). Os animais do grupo B foram avaliados pelo ecocardiograma após uma semana (grupo B1; n=9) e após três semanas do infarto (grupo B3; n=8). Houve uma morte durante o acompanhamento dos animais no grupo infartado, que ocorreu durante procedimento anestésico para realização do ECO-2.

Observou-se fusão das ondas E e A ao Doppler transmitral em frequência cardíaca acima de 300 bpm nos animais 4 e 5 do grupo A e no animal 1 do grupo B1.

Na primeira semana de pós-operatório, sete (77,7%) animais demonstravam cicatriz evidente de infarto ao ecocardiograma, definida como área de hiper-refringência na parede anterior do miocárdio. Na terceira semana de pós-operatório, todos os animais apresentavam sinais ecocardiográficos de infarto anterior.

Na análise dos parâmetros aferidos pela ecodopplercardiografia transmitral, não houve diferença significativa ao compararmos a velocidade de fluxo entre os grupos. Pode-se observar os valores das ondas E e A na Tabela 1.

Foi analisado pelo plano ortogonal de quatro câmaras o VAE, cujos resultados encontram-se na Tabela 2.

Houve aumento significativo do VAE entre os grupos A e B1 e entre os grupos A e B3 ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos B1 e B3.

Tabela 1. Análise dos parâmetros ecocardiográficos aferidos ao Doppler transmitral no grupo controle (A) e nos animais após uma semana (B1) e três semanas (B3) de IAM.

	Grupo A (n=7)	Grupo B1 (n=9)	Grupo B3 (n=8)	A x B1 (p)	A x B3 (p)	B1 x B3 (p)
Vel E(cm/s)	62,68(52,2-75,9)	65,01(58,6-77,3)	69,86(61,2-98,3)	0,648	0,358	0,562
Vel A(cm/s)	43,73(27,3-54,4)	39,31(26,6-54,8)	41,93(16,6-50,6)	0,648	0,897	0,475
Relação E/A	1,44	1,73	1,82			

Os números representam médias, valores mínimo e máximo. N - número de animais por grupo. Vel E - velocidade máxima da onda E; Vel A - velocidade máxima da onda A; Teste Wilcoxon. *Diferenças significativas se $p < 0,05$. IAM - Infarto Agudo do Miocárdio.

Tabela 2. Análise das medidas ecocardiográficas do VAE no plano ortogonal no grupo controle (A) e nos animais após uma semana (B1) e três semanas (B3) de IAM.

	Grupo A (n=7)	Grupo B1 (n=9)	Grupo B3 (n=8)	A x B1 (p)	A x B3 (p)	B1 x B3 (p)
VAE (ml)	0,047 (0,037-0,058)	0,155 (0,09-0,135)	0,140 (0,07-0,519)	0,01*	0,006*	0,66

Os números representam médias, valores mínimo e máximo. N- número de animais; VAE - volume do átrio esquerdo. IAM - Infarto Agudo do Miocárdio. Teste Wilcoxon. *Diferenças significativas se $p < 0,05$.

Avaliação histopatológica

Pelo exame macroscópico, observou-se, em todos os corações retirados, área de necrose evidente na parede ântero-lateral. Em um animal evidenciava-se claramente área dilatada compatível com aneurisma de ponta de VE.

Ao exame microscópico, observamos, em todos os casos, presença de infarto do miocárdio atingindo quase toda ou toda a espessura da parede do VE, caracterizado por:

- Degeneração e morte das fibras musculares cardíacas, cardiomiócitos, evidenciada por perda das estriações e dos núcleos.

- Substituição das fibras musculares cardíacas por tecido conjuntivo jovem (tecido conjuntivo-vascular) e fibroso (tecido conjuntivo denso).

COMENTÁRIOS

Não há um método único que possa avaliar a função diastólica de forma completa. Atualmente, o ecocardiograma é o principal exame utilizado para avaliação diastólica ventricular e permite acesso indireto à função diastólica do VE através da análise do fluxo da valva mitral e das veias pulmonares. A análise do Doppler no nível da valva mitral, com o transdutor posicionado no precórdio, visibilizando o ápice do VE, demonstra padrão normal de fluxo bifásico, com a primeira onda (onda E), que ocorre na protodiástole, seguida de uma segunda onda (onda A) que corresponde à sístole atrial. A relação E/A, embora comumente usada para avaliação da função diastólica, sofre variações dependentes

da pré-carga e não apresenta relação linear com a disfunção ventricular. Em humanos uma medida mais completa pode ser realizada com a análise do fluxo venoso pulmonar e do Doppler tecidual. Entretanto, em ratos, devido a dificuldades técnicas na obtenção de boas imagens para análise do efeito Doppler e a alta frequência cardíaca destes animais que funde as ondas E e as ondas A, é difícil a mensuração da função diastólica [10].

A função diastólica pós-IAM foi avaliada por PRUNIER et al. [12] pela medida da imagem do anel mitral ao Doppler tecidual em ratos. Estes autores mediram o pico de velocidade E e A e o tempo de relaxamento isovolumétrico e correlacionaram estes dados com a pressão diastólica final do VE aferida invasivamente. Este estudo demonstrou uma possível correlação entre as medidas invasivas e não invasivas, porém evidenciou limitações que devem ser pesquisadas no futuro com novos trabalhos.

Mudanças na complacência miocárdica podem alterar o fluxo transmitral. A diminuição da complacência do coração pode acarretar rápido aumento da pressão ventricular no início da diástole, resultando em encurtamento do tempo de desaceleração. Isso ocorre porque o gradiente entre o AE e VE diminui mais rapidamente e a velocidade de contração atrial pode se reduzir [8].

Três padrões de fluxo transmitral podem indicar disfunção diastólica. Primeiro, o “relaxamento atrasado” que é caracterizado por diminuição da onda E e aumento da onda A com uma relação E/A < 1. Tal padrão de fluxo é consequência da alteração do relaxamento ventricular em que a pressão diastólica precoce do VE é anormalmente elevada. Segundo, o padrão de enchimento “pseudonormal” caracterizado por relação E/A > 1. Finalmente, o padrão “restritivo”, caracterizado pelo aumento da velocidade da onda E (rápida desaceleração da E devido elevação da pressão do AE) e diminuição ou desaparecimento da onda A, o que resulta em uma relação E/A > 2 [6].

Observa-se que a análise das curvas de velocidade do fluxo mitral fornece informações úteis para determinar as pressões de enchimento ventricular e a função diastólica. Entretanto, o fluxo mitral é dependente de múltiplos fatores como a velocidade e extensão do relaxamento ventricular, sucção e complacência atrial e ventricular e pressão atrial esquerda. Além disso, o método para avaliar a função diastólica pode ser bastante complexo limitando sua utilização, tanto em humanos quanto em animais de experimentação.

Durante a diástole ventricular, o AE é exposto diretamente às pressões intraventriculares através da valva mitral aberta, sofrendo as influências de eventuais elevações de pressões de enchimento que alteram seu volume. MOLLER et al. [8] advogam que o VAE pode ser uma medida superior aos índices de velocidade das ondas E e A na aferição da função diastólica, já que sofre menor influência

de fatores externos, representando, assim, uma medida da função diastólica crônica.

Os resultados encontrados evidenciaram aumento significativo do VAE nas ratas infartadas, o que pode significar disfunção diastólica pós-IAM nesses animais. O aumento do VAE ocorreu precocemente na primeira semana pós-infarto e se manteve na terceira semana. O VAE não havia sido avaliado anteriormente no pós-infarto, em estudos experimentais em ratos. Aspecto particular e inesperado do presente estudo foi que não observamos alteração significativa na velocidade das ondas A e E ao Doppler após o infarto. Este parâmetro tem sido utilizado para avaliação da disfunção diastólica ventricular no pós-infarto em humanos. Observou-se, também, tendência ao aumento dos valores da relação E/A, que pode indicar evolução para padrão pseudonormal ou restritivo da disfunção diastólica.

Os resultados encontrados sugerem que a medida do VAE é um parâmetro mais confiável na avaliação da função diastólica do que a velocidade das ondas A e E ao Doppler em ratos. Até o momento, não há relatos na literatura de descrição como esta.

A disfunção diastólica do VE é bastante prevalente na população geral. É importante indicador prognóstico para diversas doenças cardíacas, entre elas o IAM. A disfunção diastólica é a incapacidade do ventrículo em aceitar fluxo sanguíneo ou de fazê-lo sem um aumento compensatório na pressão atrial esquerda. As influências fisiológicas sobre essas medidas são diversas e devem ser sempre consideradas. TSANG et al.[9], em 2002, encontraram correlação positiva entre VAE, idade, escore de risco cardiovascular e dimensões diastólica e sistólica finais do VE. A partir desse trabalho, o VAE tem sido utilizado como adjuvante na análise da função diastólica. PRICHETT et al.[10], em 2003, sugeriram que o VAE reflete a remodelação atrial associada à doença cardiovascular.

Existem fatores que sabidamente podem interferir nos resultados das medidas do VAE. A imagem em quatro câmaras coloca o átrio esquerdo muito distante do feixe de ultrassom, podendo resultar em perda de resolução e limitação na visualização do endocárdio. A planimetria do átrio requer a estimativa visual das paredes posterior e lateral, para excluir a confluência das veias pulmonares e do apêndice atrial esquerdo. Apesar disso, não observamos dificuldades técnicas na obtenção de imagens no plano de quatro câmaras, para a mensuração do VAE.

O ecocardiograma transtorácico em ratos e camundongos vem sendo utilizado progressivamente na avaliação da função sistólica e diastólica por diversos autores. A aplicação do ecocardiograma associado ao Doppler nos ratos é um método de avaliação da função cardíaca custo-efetivo, valioso e pode analisar a função miocárdica após

utilização de novas drogas e intervenções cirúrgicas e genéticas sobre o sistema cardiovascular de forma padronizada e reprodutível, permitindo o estudo longitudinal destes animais.

As velocidades E e A do fluxo mitral e sua relação com disfunção diastólica já estão devidamente estudadas, comprovando-se sua grande variabilidade em função de variáveis como a frequência cardíaca e as condições de pré e pós-carga. Nosso trabalho sugere que o VAE seja útil para definição da disfunção diastólica do VE pós-IAM. O VAE pode refletir aumento da pressão diastólica final do VE, secundário à disfunção sistólica e/ou diastólica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med*. 2003;348(20):2007-18.
2. Colucci WC, Braunwald E. Pathophysiology of heart failure. In: Braunwald E, editor. *Heart disease: A textbook of cardiovascular medicine*. 5nd ed. Philadelphia:WB Saunders;1997.p.394-421.
3. Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Yau TM. Cell transplantation comes of age. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;121(5):835-6.
4. DATASUS. Ministério da Saúde, Brasil. Óbitos de residentes. Sistema de informações sobre mortalidade (SIM); 1998. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>
5. MorcefFAP. *Ecocardiografia uni-bidimensional transesofágica e doppler*. 2ª ed. Rio de Janeiro:Revinter;1996.
6. Lavine SJ. Prediction of heart failure post myocardial infarction: comparison of ejection fraction, transmitral filling parameters and the index of myocardial performance. *Echocardiography*. 2003;20(8):691-701.
7. Feigenbaum H. *Echocardiography*. 5th ed. Philadelphia:Lea & Febiger;1994.p.695.
8. Moller JE, Hillis GS, Oh JK, Seward JB, Reeder GS, Wright RS et al. Left atrial volume: a powerful predictor of survival after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2003;107(17):2207-12.
9. Tsang TS, Barnes ME, Gersh BJ, Bailey KR, Seward JB. Left atrial volume as a morphophysiologic expression of left ventricular diastolic dysfunction and relation to cardiovascular risk burden. *Am J Cardiol*. 2002;90(12):1284-9.
10. Pritchett AM, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Rodeheffer RJ, Bailey KR, Redfield MM Left atrial volume as an index of left atrial size: a population-based study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(6):1036-43.
11. Brown L, Fenning A, Chan V, Loch D, Wilson K, Anderson B et al. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. *Heart, lung and Circulation* 2002;11(3):167-73.
12. Prunier F, Gaertner R, Louedec L, Michel L, Mercadier JJ, Escoubet B. Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(1):H346-52.