Detección de hipotiroidismo en un programa de atención de VIH/SIDA en un hospital de Bogotá, Colombia

Carlos Hernando Gómez Q., Juan Fernando Vesga G., Ellen Lowenstein De M., Jorge Oswaldo Suárez R., Fabián Armando Gil L., Sandra Liliana Valderrama B., José Roberto Tamara, Norys Alexandra Castro P. y Carlos Arturo Álvarez M.

Mass screening for hypothyroidism in a cohort of HIV infected patients in a Bogotá hospital, Colombia

Introduction: The objective of this study was to evaluate the frequency of thyroid function alterations and its associated factors in a group of patients from a university hospital in Colombia. **Methods:** From June 2007 through June 2008, 636 HIV patients were followed in order to assess the relation of thyroid function with the use of HAART. **Results:** The overall prevalence of hypothyroidism (TSH > 4.6 µUI/mL) was 15.5% (100/636). The association of hypothyroidism in the independent analysis showed significant relation only for the use of nevirapine (RR 1.6; CI 95% 1.1 - 2.34) and stavudine (RR 1.5; CI 95%, 1 - 2.3). **Conclusions:** The prevalence of hypothyroidism was surprisingly high among the studied population.

Key words: HIV, hypothyroidism, metabolic diseases, antiretroviral therapy, highly active, diagnosis.

Palabras clave: VIH, hipotiroidismo, enfermedades metabólicas, terapia anti-retroviral de gran actividad, diagnóstico.

Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá D.C., Colombia.

Unidad de Infectología (CHGQ, JFVG, ELD, JOSR, SLVB, JRT; CAAM).

Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

Departamento de Epidemiología Clínica y Bioestadística (JFVG, FAGL). Departamento de Medicina Interna (NACP).

London School of Hygiene and Tropical Medicine

London, UK. Estudiante Public Health (JFVG).

Especialista en Infectología. MSc en Epidemiología Clínica. DTM&H (CAAM).

Recibido: 9 de noviembre de 2009

Aceptado: 19 de noviembre de 2010

Correspondencia a:

Carlos Hernando Gómez Quintero
chgomez@husi.org.co

Introducción

El hipotiroidismo subclínico es la condición en la cual se encuentra alteración de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), por incremento de la misma por encima de 10 µUI/mL, sin elevación de las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4); este concepto es principalmente bioquímico. Dado que los síntomas pueden ser inespecíficos, la búsqueda paraclínica debe ser realizada bajo sospecha en condiciones predisponentes con el fin de ofrecer tratamiento a los pacientes. El hipotiroidismo subclínico tiene una prevalencia en la población general de 7 a 8% en mujeres y alrededor de 3% en hombres, siendo más frecuente en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y en aquellos con enfermedades autoinmunes^{1,2}.

En Colombia, un estudio prospectivo de detección de TSH en 807 pacientes adultos ambulatorios seronegativos, sin diagnóstico de alteración tiroidea, con un promedio de 52 años de edad (en hombres 53 años), conformado por 68,3% (n: 551) mujeres y 31,7% (n: 256) hombres, la prevalencia de TSH en el rango > 4 µUI/mL y < 10 µUI/mL de TSH fue de 24,4% y en el rango > 10 µUI/mL fue de 7,4%. El 32,4% de la población con TSH en rangos de hipotiroidismo subclínico correspondió a mujeres mayores de 50 años. Respecto a la población masculina, 34,38% (88/256) presentó niveles elevados de TSH (>4 µUI/mL de TSH).

De estos 88 pacientes, 25,1% se encontró en el rango de 60 a 70 años; el rango de 30 a 40 años fue uno de los con menor prevalencia: 9% (8/88). A pesar que este estudio presentó una considerable prevalencia de TSH elevado, no se informa los antecedentes patológicos relacionados y hay un predominio de población mayor de 60 años, por lo cual este dato no es representativo de la prevalencia de hipotiroidismo para la población general colombiana y no es posible la comparación con otros resultados. Se conoce por otra parte, que los valores promedios en la población de Bogotá, Colombia, corresponden al rango de 1 a 3 µUI/mL, similares a lo reportado en la población mundial^{3,4}.

Los pacientes con infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tienen una mayor prevalencia de alteración de las pruebas de función tiroidea, comparada con la población general; el síndrome del eutiroideo enfermo, la enfermedad de Graves y el hipotiroidismo subclínico son las manifestaciones descritas con mayor frecuencia⁵. En los pacientes recibiendo terapia anti-retroviral de gran actividad (TARGA) se ha reportado una prevalencia de hipotiroidismo subclínico de 3,5 a 12,2%⁶. En el síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), las alteraciones de la función tiroidea se pueden asociar a infecciones oportunistas por citomegalovirus, *Mycobacterium* spp, *Cryptococcus* spp, *P. jirovecii*, o por co-infección por hepatitis C y su tratamiento con interferon alfa. Además de las infecciones agudas graves,

el síndrome consuntivo y la desnutrición se han asociado a reducción en los niveles séricos de T3⁷⁻⁹.

La relación del uso de TARGA y la prevalencia de alteraciones tiroideas ha sido reportada en varias cohortes^{10,11}. Estos estudios sugieren una relación entre el hipotiroidismo y el uso de inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa (INTRs) en particular estavudina (d4T) y el inhibidor no nucleósido de la transcriptasa reversa (INNTR) efavirenz (EFV)¹¹⁻¹³. Otros factores que se han asociado con la función tiroidea son los trastornos del perfil lipídico, la estabilidad del peso corporal y el estado clínico del paciente^{12,14,15}. Por otra parte, algunos resultados demuestran que no existe un factor específico relacionado con la presencia de hipotiroidismo clínico o subclínico¹⁶. Esto no ha permitido realizar una clara recomendación sobre tamización de rutina de la función tiroidea en pacientes con infección por VIH.

El objetivo de este estudio fue evaluar la frecuencia de alteración de la función tiroidea a través de una pesquisa con medición de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) sérica y la relación de factores asociados, en un grupo de pacientes que hacen parte de un programa de atención a pacientes con VIH/SIDA.

Pacientes y Métodos

Desde junio de 2007 hasta junio de 2008, a 636 pacientes con diagnóstico de infección por VIH, asistentes a un programa de atención de un hospital universitario de Bogotá, Colombia, se les hizo medición de TSH para establecer la función tiroidea. Se registró niveles

séricos de TSH, síntomas clínicos, otras alteraciones metabólicas presentes, parámetros inmunológicos, carga viral y tratamiento anti-retroviral. Por definición, hipotiroidismo bioquímico se entiende como niveles séricos de TSH mayores o iguales a 4,6 $\mu\text{UI/mL}$. Se realizó técnica de inmunoensayo de micropartículas para detección de TSH de tercera generación (MEIA) (AxSYM-Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois U.S.A.), (TSH normal: 0,47-4,64 $\mu\text{UI/mL}$). Se realizó un análisis descriptivo de la población incluyendo proporciones, medias y desviaciones estándares.

El riesgo relativo fue calculado en un análisis independiente para la asociación de las diferentes variables y el desenlace de hipotiroidismo. Se realizó un análisis multivariable con un modelo de regresión logística y los riesgos relativos (RR) con un intervalo de confianza de 95% fueron ajustados desde razones de probabilidad (OR) en el modelo de regresión. El análisis estadístico fue hecho mediante el programa STATA versión 9.0. (StataCorp LP, College Station, Texas U.S.A.). Este trabajo fue aprobado por el comité de ética institucional y cada paciente incluído firmó un consentimiento informado.

Resultados

De los 636 pacientes 85,5% eran varones. La prevalencia global de hipotiroidismo bioquímico fue 15,7% (100/636), de los cuales 15% (15/100) tuvieron síntomas clínicos; (14 depresión y 1 caso de estreñimiento). En la Tabla 1 se presentan los resultados del estudio y la distribución de los casos. De los pacientes con hipotiroidismo

Tabla 1. Características demográficas de pacientes con infección por VIH incluidos en el estudio (n: 636)

Característica	%	(n)	rango	media (DS)
Pacientes hombres	85,5	544		
Edad	-	-	17-65	37,6 (9,4)
Recuento de linfocitos CD4 (cél/mm ³)*	-	-		307
Pacientes con linfocitos CD4 < 200 células/mm ³ *	36,1	230		
Pacientes con carga viral < 50 copias ARN/mL*	33,1	211		
Pacientes recibiendo TARGA	89,9	572		
Regímenes de TARGA con d4T	18,3	117		
Regímenes de TARGA con NVP	23,4	149		
Hipotiroidismo bioquímico (TSH > 4,6 $\mu\text{UI/mL}$)	15,7	100		
Hipotiroidismo bioquímico (TSH > 10 $\mu\text{UI/mL}$)	2,3	15		
Hipotiroidismo bioquímico en pacientes con TARGA	14,6	(93/100)		
Hipotiroidismo bioquímico en pacientes sin TARGA	1,1	(7/100)		
Hipotiroidismo bioquímico en pacientes en estadio SIDA*	25,0	(25/100)		
Hipotiroidismo bioquímico en hombres	92,0	(92/100)		
Hipotiroidismo bioquímico en mujeres	8,0	(8/100)		
Pacientes con síntomas de hipotiroidismo	15,0	(15/100)		
TARGA: tratamiento anti-retroviral de gran actividad. d4T: estavudina. NVP: nevirapina. *(al momento diagnóstico).

Tabla 2. Pacientes infectados por VIH con TSH elevado

Edad en años	TSH > 4 < 10 μ UI/mL Mujeres	TSH > 10 μ UI/mL Mujeres	TSH > 4 < 10 μ UI/mL Hombres	TSH > 10 μ UI/mL Hombres	Total
18-30	0	2	12	0	14
31-40	2	0	33	2	37
41-50	1	1	18	1	21
51-60	1	0	15	7	23
61-70	0	1	3	1	5
Total	4	4	81	11	100

bioquímico 92% fueron hombres; de ellos, 34% tenían un rango de edad de 31 a 41 años (Tabla 2).

Las asociaciones de hipotiroidismo en el análisis independiente demostró relación significativa sólo para el uso de nevirapina (NVP) (RR 1,6; IC 95% 1,1-2,3) y d4T (RR 1,5; IC 95% 1,2-2,3) (Tabla 3).

Se ajustó un modelo de regresión logística para estas dos variables (NVP y d4T), controlando edad y recuento de linfocitos CD4. El modelo final demostró asociación significativa entre hipotiroidismo y el uso de NVP (RR 1,5; IC 95% 1,03-2,2; OR 1,7; IC 95% 1,04-2,7). La interacción entre NVP y d4T no fue significativa en el modelo. Otras variables como la carga viral y el uso de inhibidores de proteasa (IP) no se tuvieron en cuenta para el modelo.

El estudio presenta, adicionalmente, la distribución porcentual de otras alteraciones metabólicas (Figura 1).

Tabla 3. Riesgo relativo de hipotiroidismo en pacientes recibiendo terapia anti-retroviral

Anti-retroviral	RR	IC (95%)
NVP	1,6	(1,1-2,34)
d4T	1,5	(1-2,3)
ddl	1,10	(0,6-1,8)
ABC	0,8	(0,4-1,3)
EFV	0,97	(0,6-1,4)

NVP: nevirapina; d4T: estavudina; ddl: didanosina; ABC: abacavir; EFV: efavirenz.

Discusión

La incidencia, tanto de hipotiroidismo como de hipertiroidismo, estaría en aumento en personas con infección por VIH que están recibiendo TARGA. La literatura médica es escasa sobre este tema y los datos encontrados son contradictorios; por lo tanto, no es claro si se debe explorar los desórdenes tiroideos en el conjunto de pesquisas de laboratorio rutinarias que se le practican a los pacientes infectados por VIH.

Dos estudios llevados a cabo en el Hospital de Chelsea y Westminster de Londres evaluaron la presencia de hipertiroidismo o hipotiroidismo, no solamente en pacientes infectados con VIH, sino también la asociación con TARGA. El primer estudio fue presentado en el año 2005 en "Third Conference on HIV Pathogenesis and Treatment"¹⁷. Éste demostró, según los investigadores, que el hipotiroidismo en pacientes con infección por VIH varió de 0,9 casos a 10,7 casos por 10.000 personas/año, antes y después de la introducción de la TARGA

Figura 1. Distribución porcentual de las alteraciones metabólicas de la cohorte.

respectivamente, y el hipertiroidismo aumentó de 0,4 a 3,4 casos por 10.000 personas/año. Una de las conclusiones de este estudio fue que el desarrollo del hipertiroidismo se asociaba con el uso de IP y que el hipotiroidismo era más prevalente con los regímenes basados en INNTRs. Por otra parte, surgió otro posible concepto y es que la producción de anticuerpos tiroideos observados en algunos pacientes podrían estar relacionados con reconstrucción inmune posterior al inicio de TARGA, pero no encontraron relación con daño en el sistema inmune ni con el número de linfocitos CD4. Sin embargo, en un análisis multivariado, los pacientes que recibieron d4T o con un bajo recuento de linfocitos CD4 tenían una mayor asociación con hipotiroidismo¹⁸.

Posteriormente, estos mismos autores en el 2009 publicaron nuevos datos y encontraron nuevamente que el hipertiroidismo se asociaba más a IP y que el hipotiroidismo a INNTRs, pero añadiendo que estaba más asociado al uso de EFV¹. En otro estudio realizado en Inglaterra en el 2007, los investigadores llegaron a la conclusión que no hay ninguna diferencia entre la prevalencia de la enfermedad tiroidea en pacientes con infección por VIH, así estén recibiendo TARGA, y la población general; además anotan que no hay evidencia que el hipertiroidismo o hipotiroidismo subclínico deban ser tratados. Por lo tanto, no aconsejan practicar pruebas tiroideas rutinarias a pacientes infectados por VIH, con o sin TARGA².

Debido a la controversia que existe sobre la asociación entre TARGA y el desarrollo de alteraciones tiroideas, no se ha podido definir con seguridad un mecanismo causal. Desde las primeras descripciones se han manejado varias hipótesis, como por ejemplo la relación entre los IP sobre la señalización del ácido retinoico y la regulación de la TSH, así como la asociación entre lipodistrofia y la disminución de los niveles de leptina, inhibiendo así la producción de glucocorticoides en las glándulas suprarrenales y, de esta forma, produciendo un efecto sobre las células del núcleo paraventricular con la consecuente reducción de los niveles de hormona liberadora de tirotropina (TRH)^{19,20}. En cuanto a los INTRs, se ha relacionado, en especial, el tiempo de uso de d4T con el desarrollo de toxicidad mitocondrial en las células foliculares tiroideas y la aparición de tiroiditis autoinmune debida a la alteración de la regulación y el aumento de la producción de citoquinas, interleuquina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral α (FNT- α) y la presencia de receptores para éstos en las células tiroideas^{11,18}. Los INNTRs como EFV y la NVP se han asociado al aumento de anticuerpos tiroideos anti-tiroglobulina (anti-TG) y anti-peroxidasa (anti-TPO), pero los estudios más recientes sugieren que el mecanismo fisiopatológico está en relación con el rol de éstos en la inhibición de la proliferación, diferenciación y reprogramación de las células tiroideas, como se ha evi-

denciado en el carcinoma anaplásico de tiroides^{18,21}. Otras teorías relacionan la co-infección por virus de hepatitis C como factor de riesgo para el desarrollo de anticuerpos anti tiroideos, así como recuentos bajos de linfocitos CD4 y una asociación con el aumento del colesterol durante el inicio de la terapia^{18,22}.

Las recomendaciones acerca de la tamización de la función tiroidea para la población en general como para los pacientes con infección por VIH son controversiales, dado que la prevalencia de hipotiroidismo subclínico es mayor en esta población y la fisiopatología de ésta se desconoce; pensamos que la tamización tiene un beneficio clínico para la búsqueda de explicaciones que sustenten esta mayor prevalencia y que planteen posibles intervenciones. Sugérimos que los pacientes con infección por VIH/SIDA, con o sin tratamiento, reciban un monitoreo inicial de TSH con repetición de la prueba para descartar errores de laboratorio o hipotiroidismo transitorio. Si ésta se encuentra $> 4,6$ μ UI/mL con síntomas de hipotiroidismo, o asintomático con TSH > 10 μ UI/mL, se debe solicitar T4 libre (T4L) y anti-TPO; el diagnóstico confirmatorio por laboratorio o por criterio clínico es indicativo para el inicio de terapia de reemplazo con levotiroxina²³. Los pacientes con claras manifestaciones clínicas de hipotiroidismo, dislipidemia de difícil control, o polineuropatía podrían beneficiarse de la terapia de sustitución tiroidea en este grupo de pacientes con cualquier nivel de TSH elevada por encima del punto de corte. En ausencia de evidencia suficiente que asocie d4T, NVP u otro anti-retroviral como factores de riesgo para el desarrollo de hipotiroidismo subclínico y que su interrupción revierta el cuadro de hipotiroidismo, no se justifica la suspensión del tratamiento.

Una limitación de nuestro estudio es la no disponibilidad en el seguimiento de una prueba de TSH confirmatoria y posterior correlación con T4L, triyodotironina libre (T3L), anticuerpos anti-TG y anti-TPO. La falta de determinaciones de hormonas tiroideas libres T3, T4 y tiroglobulina se pueden traducir en un sesgo con un posible sobre diagnóstico de hipotiroidismo.

Conclusión

En este estudio encontramos una alta prevalencia de hipotiroidismo en pacientes con infección por VIH, el cual sorpresivamente fue asociado al uso de NVP en pacientes sin enfermedades oportunistas ni co-infectados; éste es el primer reporte en la literatura científica de la asociación de este no nucleósido con hipotiroidismo. Sin embargo, estos hallazgos deben ser validados en otros estudios.

Agradecimientos: A todas las personas involucradas en la atención y cuidado de los pacientes del programa especial de VIH y SIDA del Hospital Universitario de San Ignacio de Bogotá, Colombia.

Resumen

Objetivos: Evaluar la frecuencia de alteración tiroidea y los factores asociados en los pacientes con VIH/SIDA de un hospital universitario en Colombia. **Pacientes y Métodos:** Estudio tipo corte transversal de pacientes con VIH/SIDA durante el periodo de 2007 a 2008. Se registró niveles hormonales, inmunológicos,

carga viral y tratamiento anti-retroviral. **Resultados:** En 636 pacientes la prevalencia de hipotiroidismo (TSH > 4,6 μ UI/mL) fue de 15,5% (100/636). El análisis independiente demostró relación significativa para el uso de nevirapina (RR 1,6; IC 95% 1,1 - 2,3) y estavudina (RR 1,5; IC 95% 1 - 2,3). **Conclusiones:** La prevalencia de hipotiroidismo fue alta y se relacionó con el uso de nevirapina.

Referencias

- 1.- Nelson M, Powles T, Zeitlin A, Sen P, Scourfield A, Bower M, et al. Thyroid dysfunction and relationship to antiretroviral therapy in HIV-positive individuals in the HAART era. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 50 (1):113-4.
- 2.- Koutkia P, Canavan B, Breu J, Grinspoon S. Growth hormone (GH) responses to GH-releasing hormone-arginine testing in human immunodeficiency virus lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90 (1): 32-8.
- 3.- Builes C A, Rosero B O, García J. TSH levels in the evaluation of thyroid dysfunction in a population group in Bogota. *Acta Med Colomb* 2006; 31: 66-70.
- 4.- U.S Preventive Services Task Force. Screening for thyroid disease: Recommendation Statement. *Ann Intern Med* 2004; 140: 125-7.
- 5.- Hoffmann C J, Brown T T. Thyroid function abnormalities in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 2007;45: 488-94.
- 6.- Beltrán S, Lescure F X, El Esper I, Schmit J L, Desaillood R. Subclinical hypothyroidism in HIV-infected patients is not an autoimmune disease. *Horm Res* 2006; 66 (1): 21-6.
- 7.- LoPresti J S, Fried J C, Spencer C A, Nicoloff J T. Unique alterations of thyroid hormone indices in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann Intern Med* 1989; 110 (12): 970-5.
- 8.- Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Jensen P, Shimizu L, Feingold K R, et al. Indices of thyroid function and weight loss in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Metabolism* 1993; 42 (10): 1270-6.
- 9.- Wartofsky L, Burman, K D. Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: the "euthyroid sick syndrome". *Endocr Rev* 1982; 3 (2): 164-217.
- 10.- Ketsamathi C, Jongjaroenprasert W, Chailurkit L O, Udomsubpayakul U, Kiertiburanakul S. Prevalence of thyroid dysfunction in Thai HIV-infected patients. *Curr HIV Res* 2006; 4 (4): 463-7.
- 11.- Madeddu G, Spanu A, Chessa F, Calia G M, Lovigu C, Solinas P, et al. Thyroid function in human immunodeficiency virus patients treated with highly active antiretroviral therapy (HAART): a longitudinal study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64 (4): 375-83.
- 12.- Bongiovanni M, Adorni F, Casana M, Tordato F, Tincati C, Cicconi P, et al. Subclinical hypothyroidism in HIV-infected subjects. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58 (5): 1086-9.
- 13.- Nelson M, Powles T, Zeitlin A, Sen P, Scourfield A, Bower M, et al. Thyroid dysfunction and relationship to antiretroviral therapy in HIV-positive individuals in the HAART era. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 50 (1): 113-4.
- 14.- Hommes M J, Romijn J A, Godfried M H, Schattenkerk J K, Buurman W A, Endert E, et al. Increased resting energy expenditure in human immunodeficiency virus-infected men. *Metabolism* 1990; 39 (11): 1186-90.
- 15.- Lambert M. Thyroid dysfunction in HIV infection. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1994; 8 (4): 825-35.
- 16.- Madge S, Smith C J, Lampe F C, Thomas M, Johnson M A, Youle M, et al. No association between HIV disease and its treatment and thyroid function. *HIV Med* 2007; 8 (1): 22-7.
- 17.- Sen P, Scourfield A, Smythe J, Stefanovich M, Jones R, Mandalia S, et al. Thyroid dysfunction in individuals with HIV infection: the effect of HAART. In: *AIDS Education Global Information System (AEGIS) Proceedings of the 3rd Conference on HIV Pathogenesis and Treatment*; 2005 July 24-27; Rio de Janeiro, Brazil. Abstract Tupe2.3C09; 2005. Disponible en: <http://www.aegis.com/conferences/iashivpt/2005/Tupe2-3C09.pdf> [consultada 31 agosto 2009].
- 18.- Beltrán S, Lescure F X, Desaillood R, Douadi Y, Smail A, El Esper I, et al. Increased prevalence of hypothyroidism among human immunodeficiency virus-infected patients: a need for screening. *Clin Infect Dis* 2003; 37 (4): 579-83.
- 19.- Hypothyroidism from HAART [Antiviral Briefs]. *AIDS patient care and STDS*. 2000; 14 (12): 671-2.
- 20.- Sheneberger R, Schneider S. An impact of protease inhibitors on thyroid stimulating hormone regulation?. In: *Education Global Information System (AEGIS) Proceedings of the 13th International AIDS Conference*.; 2000 July 9-14;13: Durban, South Africa. Abstract no. WePeB4270. Disponible en: <http://www.aegis.com/conferences/iac/2000/WePeB4270.html> [consultada 31 agosto 2009].
- 21.- Landriscina M F, Fabiano A, Lombardi V, Santodirocco M, Piscazzi A, Fersini A, et al. Nevirapine toxicity in non-HIV cancer patients. *Chemotherapy* 2008; 54 (6): 475-8.
- 22.- Bongiovanni M, Adorni F, Casana M, Tordato F, Tincati C, Cicconi P, et al. Subclinical hypothyroidism in HIV-infected subjects. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58 (5): 1086-9.
- 23.- Col NF, Surks MI, Daniels GH. Subclinical thyroid disease: clinical applications. *JAMA* 2004; 291 (2): 239-43.