ESTUDIO MULTICÉNTRICO RETROSPECTIVO SOBRE TRASPLANTE DE LIMBO

LIMBAL TRANSPLANTATION: MULTICENTER RETROSPECTIVE CASE SERIES ANALYSIS

TORRES J¹, FERNÁNDEZ I¹, QUADRADO MJ², MURTA J², HERRERAS J³, RODRÍGUEZ-ARES MT⁴, BENÍTEZ-DEL-CASTILLO JM⁵, ALIÓ J⁶, MUÑOZ MF⁷, CALONGE M¹

RESUMEN

Objetivo: Revisar el resultado de los trasplantes de limbo (TL) realizado en pacientes con Síndrome de insuficiencia límbica (SIL) en el contexto de varias enfermedades de la superficie ocular.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio retrospectivo y multicéntrico (cinco centros) de los TL realizados entre 1996 y 2004. Los datos fueron recogidos por el mismo investigador, en una base de datos especialmente diseñada para el estudio. Se consideró como «éxito» del TL a la ausencia de: defectos epiteliales, inflamación y recurrencia del pterigión cuando éste fue la causa del TL.

Resultados: Se analizaron un total de 72 TL realizados en 61 pacientes (65 ojos) con tiempo de seguimiento de 20,8 meses (DS 23,5; rango, 3-115). Hubo 33 hombres y 28 mujeres, con una media de 55,8 años (DS: 15,6; rango, 20-89). Se realizaron 58 (80.6%) TL autólogos (40 pterigión, 12 causticaciones, tres iatrogénicas, dos infecciones virales,

ABSTRACT

Purpose: To report the results of limbal transplantation (LT) in patients with limbal stem cell deficiency (LSCD) in the context of ocular surface diseases.

Materials and methods: A multicenter (5 centers) retrospective case series analysis of patients who underwent LT between 1996 and 2004 was performed. Data were collected by the same researcher using a customized database. Success was defined by the absence of a persistent corneal epithelial defect, on-going inflammation or recurrence of a pterygium.

Results: Data from 72 LT performed in 61 patients (65 eyes) with a mean follow-up of 20.8 months (SD 23.5; range, 3-115) were analyzed. There were 33 males and 28 females with a mean age of 55.8 years (SD: 15.6; range, 20-89). Fifty-eight (80.6%) LT were autografts (40 pterygia, 12 alkali burns, 3 iatrogenic cases, 2 viral infections, 1 neoplasia case) and 14 (19.4%) were allografts from cadave-

Recibido: 20/4/07. Aceptado: 26/5/08.

IOBA. Universidad de Valladolid. Valladolid. España.

¹ Grupo de Superficie Ocular, IOBA, Universidad de Valladolid. Valladolid. España.

² IBILI. Universidad de Coimbra. Portugal.

³ Grupo de Superficie Ocular, IOBA, Universidad de Valladolid. Valladolid. Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario de Valladolid. Valladolid. España.

⁴ Servicio de Oftalmología. CHUS. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. España.

⁵ Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo. Hospital Clínico San Carlos. Universidad Complutense. Madrid. España.

⁶ VISSUM. Alicante. España.

⁷ Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario de Valladolid. Valladolid. España.

Comunicación presentada en el LXXXI Congreso de la S.E.O. (Zaragoza 2005) y como póster en la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (Fort Lauderdale, USA, 2005).

Correspondencia:

Margarita Calonge

IOBA, Universidad de Valladolid.

Avda. Ramón y Cajal, 7

47005 Valladolid

España

E-mail: calonge@ioba.med.uva.es

una neoplasia) y 14 (19,4%) TL alogénicos de donante cadáver (siete inflamaciones inmunes, seis causticaciones, uno iatrogénico). Todos los pacientes a los que se les realizó TL alogénicos recibieron inmunosupresión sistémica. Al final del seguimiento, 48 (66,7%) TL se consideraron un éxito. Este porcentaje fue del 81,0% (47/58) en los TL autólogos y del 7,1% (1/14) en los TL alogénicos. El porcentaje de éxito también dependió de la etiología, siendo alto en los casos de pterigión (80,0%) y menor en las patologías inmunológicas (14,3%).

Conclusiones: El TL autólogo es preferible al alogénico, pues la tasa de fracasos disminuye notablemente y, además, se evita el uso de inmunosupresión oral mantenida. Además, el pronóstico es siempre peor en los casos de patología inflamatoria inmune. El TL autólogo parece ser una buena elección para el tratamiento del pterigión recurrente, aunque se necesitan estudios prospectivos que corroboren estos resultados.

Palabras claves: Trasplante de limbo, insuficiencia límbica, enfermedades de la superficie ocular, células madre del limbo.

ric donors (7 immune-based disorders, 6 alkali burns, 1 iatrogenic case); all patients receiving allografts also received systemic immunosuppression. Of the total number of LT, 48 (66.7%) were successful. This proportion increased to 81.0% (47/58) when autografts were used. However, only 7.1% (1/14) of all allografts were successful. The success rate was higher (80.0%) when performed for a pterygium and lower when done for immune-based inflammation (14.3%).

Conclusion: Autograft tissue for LT is always preferable to allografts to surgically treat LSCD, as clinical success is significantly higher, and systemic immunosuppression is avoided. As expected, immune-based disorders are the most difficult cases to treat. LT has been shown to be an excellent option for recurrent pterygium, although prospective studies need to be performed to further corroborate these results (*Arch Soc Esp Oftalmol* 2008; 83: 417-422).

Key words: Limbal transplantation, limbal deficiency, ocular surface diseases, limbal stem cells.

INTRODUCCIÓN

La localización de las células madres epiteliales de la córnea en el limbo ha sido un hallazgo trascendental (1). Numerosas enfermedades y agresiones externas pueden provocar la destrucción de estas células, dando lugar a una entidad que se define como síndrome de insuficiencia límbica (SIL). Esta situación conlleva a la pérdida parcial o total de las células madres del limbo, por lo que se altera la capacidad regenerativa del epitelio corneal (2). El SIL cursa clínicamente con inflamación crónica, ulceración recurrente, que puede hacerse persistente, vascularización corneal, y crecimiento del epitelio conjuntival hacia la córnea, fenómeno conocido como conjuntivalización, todos estos cambios alteran la calidad de vida del paciente y/o una importante disminución de la función visual (2-4).

El manejo de estos pacientes ha sido todo un desafío para los especialistas en patología de la superficie ocular. En su abordaje es fundamental en primer lugar determinar la etiología del proceso, para posteriormente dar inicio al tratamiento médico conservador que logre reducir la inflamación al mínimo posible (3,4). Una vez que se logra

«enfriar» el proceso inflamatorio y se confirma el diagnóstico de un SIL irreversible, con el subsecuente daño estructural de la superficie ocular, se plantea la realización de diversas técnicas como: epiteliectomía secuencial (5), trasplante de membrana amniótica y las diferentes variantes de trasplantes de limbo (TL), propuestas para su reconstrucción. Cuando el SIL es total y estrictamente unilateral, se propone trasplantar tejido limbar del ojo contralateral sano. Si la afectación es parcial y unilateral, como en el caso del pterigión, se toma limbo del mismo ojo. Ambos procedimientos se conocen como TL autólogo (6-10). Sin embargo, cuando hay una destrucción límbica total o parcial, pero bilateral, se ha de recurrir al TL alogénico, bien de un donante familiar (10-12) o de un cadáver (10-13).

Actualmente, la tasa de éxito referida para estos trasplantes es muy variable, ya que parece depender de muchos factores, como son: 1) la fuente donante del TL, 2) la etiología del SIL, 3) el estado inflamatorio previo del lecho receptor, 4) la asociación de otros trasplantes como el de córnea, 5) el número consecutivo de trasplantes realizados o 6) el tiempo de seguimiento considerado en cada serie (14).

El objetivo de este estudio es evaluar el resultado global de los TL realizados en pacientes con SIL, en algunos centros de la Península Ibérica, para averiguar las tasas de fracaso y sus principales causas en nuestro medio. Además, este trabajo pretende ser la base para la realización, ya en marcha, de estudios prospectivos multicéntricos.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio retrospectivo y multicéntrico en cinco centros, pertenecientes a la Red Temática de Investigación Cooperativa en Oftalmología (CO3/13) del Instituto de Salud Carlos III, en cuatro centros españoles y uno portugués: IOBA (Instituto de Oftalmobiología Aplicada) y el Hospital Universitario de Valladolid, Universidad de Valladolid, Valladolid; IBILI (Instituto Biomédico de investigación de luz y de imagen), Universidad de Coimbra, Portugal; CHUS (Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela; Instituto Castroviejo y Hospital San Carlos, Universidad Complutense de Madrid y VISSUM, Alicante.

Se revisaron todas las historias clínicas de los pacientes a quienes se les realizó TL por SIL en el período comprendido entre los meses de abril de 1995 a septiembre de 2004 y que tuvieran un tiempo de seguimiento mínimo de tres meses. Los datos fueron recogidos por el mismo investigador (JT), ajeno a las cirugías o al seguimiento de los pacientes y en una base de datos especialmente diseñada para este propósito por uno de los autores (MFM) (Microsoft Access 2000). Se analizaron las siguientes variables: edad, género, etiología del SIL, origen del material donante, cirugías previas concomitantes y posteriores, tiempo de seguimiento, agudeza visual (AV) previa y final; y éxito o fracaso del TL. Se consideró «éxito» del TL a la ausencia de todo lo siguiente: sintomatología inflamatoria de la superficie ocular como es: fotofobia, sensación de cuerpo extraño, o dolor; defectos epiteliales persistentes, o recurrencia del pterigión cuando éste fue la causa del TL. Todos los casos de pterigión provenían del mismo centro (Coimbra) y fueron operados por dos cirujanos (MJQ y JM) y con la misma técnica quirúrgica (TL autólogo, del ojo ipsilateral y sin membrana amniótica). En los demás centros, se hicieron TL tanto autólogos como alogénicos y por diversas patologías diferentes de pterigium. El

tiempo de los anillos de la fuente material donante cadáver, en los TL alogénicos fue de 24 horas desde la extracción hasta la implantación del mismo y la forma de conservación o medio fue mediante cámara húmeda, con solución de un colirio de antibiótico de tobramicina y a 4°C, hasta la realización del implante.

Ciclosporina A 5 mgrs/kg peso/día, vía oral fue administrado a los pacientes como tratamiento inmunomodulador.

La realización de dicho estudio fue aprobada por los Comités Éticos de cada uno de los centros implicados.

Para evaluar estadísticamente la relación entre variables cualitativas se utilizaron el contraste de Chi cuadrado de Pearson y la prueba de McNemar-Bowker cuando las muestras eran apareadas. Para variables cuantitativas, se compararon medias entre grupos utilizando el análisis de la varianza paramétrico cuando fue posible y el equivalente no paramétrico de Kruskal Wallis cuando no se verificó la hipótesis de normalidad. Para la comparación de dos grupos, se utilizó el contraste no paramétrico U de Mann Whitney. Se ajustó un modelo de regresión logística en el intento de explicar el éxito o fracaso del TL, relacionándolo con todas las variables recogidas. Para seleccionar el mejor modelo, se utilizó un algoritmo «forward». El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS versión 13.0 (SPSS for Windows, SPSS Inc., Chicago, USA), por otro de los autores (IF). Se consideraron significativos aquellos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se recogieron datos de 72 TL realizados en 61 pacientes (65 ojos), con un tiempo de seguimiento medio de 19,8 meses (DS: 23,5; rango, 3-115). Hubo 33 hombres y 28 mujeres, con una edad media de 55,8 años (DS: 15,6; rango, 20-89), siendo el grupo de hombres significativamente más joven que el grupo de mujeres (U de Mann-Whitney 255,5; $p < 0,0001$). De los 72 TL realizados, 34 (47,2%) fueron en mujeres y 38 (52,8%) en hombres.

Las enfermedades causantes del SIL fueron: 40 pterigia, 18 causticaciones, siete inflamaciones inmunes (cuatro síndromes Stevens-Johnson, una rosácea ocular, un penfigoide ocular cicatricial, y una queratoconjuntivitis atópica), cuatro iatrogénicas (dos medicamentosas y dos quirúrgicas), dos

infecciones virales y un ojo con neoplasia (fig. 1). La edad media en el caso de pacientes con SIL por causticaciones e iatrogénicas fue de menos de 45 años, significativamente menor que el resto de las etiologías en las que la edad media fue mayor de 55 años (Kruskal Wallis 17,53; $p=0,004$).

De los 72 TL realizados, 58 (80,6%) fueron autólogos y 14 (19,4%) alogénicos de donante cadáver (fig. 1). Las mujeres recibieron el 50,9% de los TL autólogos y el 33,3% de los TL alogénicos (Chi cuadrado 1,21; $p=0,270$).

El número medio de TL realizados en un mismo ojo fue de 1,1: se hizo 1 TL en 59 casos (90,8%), dos TL en 5 casos (7,7%) (de los cuales tres se les repitió TL autólogo por autólogo, obteniéndose éxito al segundo TL en dos de estos casos; un caso al que se le realizó primero TL autólogo seguido de uno alogénico, los cuales fracasaron; y por último un caso al que se le repitió TL alogénico, fracasando ambos) y por último tres TL en un solo caso (1,5%) los cuales fueron TL autólogos, fracasando dos de ellos y el tercero fue exitoso.

En 20 casos, se hizo otra cirugía asociada simultánea al TL: dos queratoplastias penetrantes (2,8%) y 18 trasplantes de membrana amniótica (25,0%).

En lo que se refiere al resultado final, de los 72 TL, 48 (66,7%) pudieron considerarse un éxito. El porcentaje de éxito se asoció con la enfermedad previa, siendo alto en los casos de pterigión (32 de 40; 80,0%) y escaso en las patologías inmunológicas (1 de 7; 14,3%) (Chi cuadrado 19,02; $p=0,002$) (fig. 1).

Fig. 1: Resultado de los TL al final del seguimiento según etiología causante del síndrome de insuficiencia límica (parte superior de la figura); y según la fuente de material donante (parte inferior de la figura). Además se indica el porcentaje de éxito en cada caso.

Existieron diferencias significativas en el porcentaje de éxito según el sexo del receptor: de los 48 TL exitosos, 27 TL (87,1%) se realizaron en mujeres y 19 (55,9%) en hombres (Chi cuadrado 7,63; $p=0,006$).

Al relacionar el éxito o fracaso de TL con todas las variables recogidas, se encontró que los únicos factores independientes asociados con el éxito del TL fueron la fuente de material donante (Odd Ratio 120,59; IC 95%; 8,03-1810,92) y el sexo (Odd Ratio 12,01; IC 95%; 1,40-103,37), de manera que el porcentaje de éxito fue mayor en TL de tipo autólogo y en mujeres. Estas dos variables fueron estadísticamente independientes entre sí (Chi cuadrado 1,22; $p=0,270$) y, en el caso del género, estadísticamente independiente respecto de la enfermedad previa (Chi cuadrado 4,20; $p=0,521$).

Los intervalos de valores de AV previa y final (en la última visita) observados según la enfermedad de base se resumen en la tabla I. Los pacientes con causticaciones e infecciones virales consiguieron mejorar su AV. Además, el número de pacientes que mejoraron su AV tras el TL fue significativamente menor en el caso de patologías de base inmunológica (Chi cuadrado 19,23; $p=0,037$).

DISCUSIÓN

La reconstrucción de la superficie ocular y el manejo de pacientes con SIL grave sigue siendo desafiante para los oftalmólogos. Desde que se conociera la existencia de las células madre del epitelio corneal en el nicho limbo-escleral y de que éstas fueran catalogadas como las responsables de regenerar el epitelio corneal (1), se planteó el TL como técnica quirúrgica para reconstruir la superficie ocular dañada. El TL autólogo es una técnica segura y efectiva para el manejo de pacientes con enfermedades de la

Tabla I. Intervalos de agudeza visual, en escala decimal, antes y después del trasplante de limbo, según la enfermedad de base

Enfermedad previa	AV pre TL	AV post TL
Pterigión	0,4 – 0,6	0,4 – 0,6
Causticaciones	CD	0,1 – 0,3
Iatrogénicas	0,05 – 0,125	CD /0,05 – 0,125
Infecciones virales	PL / MM	CD /0,05 – 0,125
Neoplasia	0,4 – 0,6	0,4 – 0,6
Inmunes	MM	MM

AV: agudeza visual; TL: trasplante de limbo; CD: cuenta dedos; PL: Percepción de luz; MM: movimiento de manos.

superficie ocular secundaria a traumatismos como quemaduras, térmicas o químicas, no siendo tan beneficiosa para pacientes con enfermedades inmunológicas o SIL bilaterales, en donde la fuente de material donante ha de ser alogénico (4). En 1989, Kenyon y Tseng fueron los pioneros en publicar resultados del TL autólogo, en una serie de 26 pacientes con SIL unilateral de componente no inflamatorio, en donde tras 6 meses de seguimiento, 20 de 21 pacientes habían obtenido una estabilidad del epitelio sin recurrencias ni defectos epiteliales (6). Un año mas tarde Copeland y Char utilizaron el TL autólogo para la reconstrucción en dos pacientes con carcinoma de células escamosas conjuntivales, refiriendo una estabilización de la superficie ocular y mejora de la agudeza visual en ambos pacientes (15). En este estudio retrospectivo realizado en 61 pacientes sometidos a 72 TL, se encontró que la mayoría de los TL autólogos fueron realizados en pterigión (unilateral) y los TL alogénicos fueron realizados en los pacientes con patología de base inflamatoria inmune (bilateral). La tasa de éxito en TL autólogo (81,0%) es muy parecida a las publicadas, aunque los períodos de seguimiento de estas publicaciones son menores que en este trabajo (entre de 6 meses y 14 meses) (6, 16-18). Cabe destacar que la mayoría de los éxitos del presente estudio son en pacientes que tienen un SIL parcial y unilateral, como es el caso del pterigión, por lo que la indicación es el TL autólogo. Este resultado ha llevado a la creación de un estudio prospectivo para corroborar estos resultados que, en estos momentos está llevándose a cabo. En casos graves de SIL bilateral la única opción (además de la expansión ex vivo del tejido) es el TL alogénico, que puede ser de fuente donante cadáver o familiar (10). La tasa de éxito de TL alogénicos en artículos publicados es muy diversa, ya que depende de factores tan variables, entre los diversos estudios, como la definición de éxito y fracaso o el tiempo de seguimiento considerado. Por ello resulta difícil poder comparar resultados, aunque en este trabajo aparece una tasa de éxito del 7,1% en TL alogénicos, que con respecto a otros estudios es baja. Shimazaki, en un estudio retrospectivo, de una serie de 32 casos con SIL total, causada por quemaduras químicas y térmicas, presentó un total de: 11 TL autólogo y 21 TL alogénico hechos y evaluados durante 67 semanas, en el que se consideró un éxito a la epitelización corneal, y así obtuvieron una tasa de epitelización corneal del 90,9% tras el primer TL autólogo y de 33,3% posterior al primer TL alogénico (17). Samson y colabo-

radores analizaron una serie de once ojos donde a diez se les realizó TL alogénicos donante familiar y a uno se le hizo TL autólogo en SIL de patologías inflamatorias, observando fracaso en cinco ojos (45%), en un seguimiento de 35 meses de promedio (19). Asimismo, se evidencian una mejoría clínica y de sintomatología cuando se comparan TL autólogo versus alogénico (16,18).

Los resultados del presente trabajo reflejan y corroboran aún más, la marcada diferencia entre el resultado del TL alogénico y autólogo, siendo este último más recomendable para casos de SIL unilaterales y parciales donde la población de células madre se puede recuperar, y por ende reconstruir exitosamente la superficie ocular.

El TL alogénico tiene la desventaja de la necesidad de medicar al paciente con tratamiento inmunosupresor por vía sistémica durante largos períodos de tiempo para evitar el rechazo.

Una vez correlacionadas todas las variables, se encontró que los factores significativamente asociados al éxito del TL fueron, la fuente de material donante y el sexo del paciente, siendo mayor el porcentaje de éxito entre mujeres a las que se les realizó TL autólogo. Pero el hecho sorprendente de que el sexo femenino estuviera independientemente ligado a un mayor éxito, plantea la posibilidad de diseñar un estudio clínico prospectivo controlado en el que la única variable a controlar sea el sexo del receptor, para poder corroborar estos resultados.

En conclusión, este estudio retrospectivo en TL sugiere que: 1) el éxito general de estos TL (66,7%) aumentó a (81,0%) en TL autólogo y disminuyó al (7,1%) cuando han de hacerse TL alogénicos; 2) el éxito es menor (14,3%) en patología inflamatoria de base inmune y mayor en (80,0%) pterigión; 3) el mayor porcentaje de éxito se observó en los TL autólogos y en mujeres.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos a Marta Abad, Rosario Touriño Peralta y Pedro Fonseca por su colaboración en los casos procedentes de Alicante, Santiago de Compostela y Coimbra, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schermer A, Galvin S, Sun TT. *Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in*

- culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986; 103: 49-62.
2. Puangsricharn V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995; 102: 1476-1485.
 3. Akpek EK, Foster CS. Limbal stem-cell transplantation. *Int Ophthalmol Clin* 1999; 39: 71-82.
 4. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000; 44: 415-425.
 5. Dua HS. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 1407-1411.
 6. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; 96: 709-723.
 7. Jenkins C, Tuft S, Liu C, Buckley R. Limbal transplantation in the management of chronic contact-lens-associated epitheliopathy. *Eye* 1993; 7: 629-633.
 8. Morgan S, Murray A. Limbal autotransplantation in the acute and chronic phases of severe chemical injuries. *Eye* 1996; 10: 349-354.
 9. Rao SK, Rajagopal R, Sitalakshmi G, Padmanabhan P. Limbal autografting: comparison of results in the acute and chronic phases of ocular surface burns. *Cornea* 1999; 18: 164-171.
 10. Holland EJ, Schwartz GS. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. *Cornea* 1996; 15: 549-556.
 11. Holland EJ. Epithelial transplantation for the management of severe ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1996; 94: 677-743.
 12. Daya SM, Ilari L. Living related conjunctival limbal allograft for the treatment of the stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2001; 108: 126-134.
 13. Tsai RJF, Tseng SC. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 1994; 13: 389-400.
 14. Santos MS, Gomes JA, Hofling-Lima AL, Rizzo LV, Romano AC, Belfort R Jr. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* 2005; 140: 223-230.
 15. Copeland RA Jr, Char DH. Limbal autograft reconstruction after conjunctival squamous cell carcinoma. *Am J Ophthalmol* 1990; 110: 412-415.
 16. Tan DT, Ficker LA, Buckley RJ. Limbal transplantation. *Ophthalmology* 1996; 103: 29-36.
 17. Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Donor source affects the outcome of ocular surface reconstruction in chemical or thermal burns of the cornea. *Ophthalmology* 2004; 111: 38-44.
 18. Ozdemir O, Tekeli O, Ornek K, Arslanpence A, Yalcindag NF. Limbal autograft and allograft transplantations in patients with corneal burns. *Eye* 2004; 18: 241-248.
 19. Samson CM, Nduaguba C, Baltatzis S, Foster CS. Limbal stem cell transplantation in chronic inflammatory eye disease. *Ophthalmology* 2002; 109: 862-868.