

IL SUCCESSO DEL TRAPIANTO DI RENE DIPENDE ANCHE DA UNA TERAPIA EFFICACE A BASSA TOSSICITÀ

M.P. Scolari, G. La Manna, G. Comai, M.L. Cappuccilli, P. Todeschini, A. Ciavatti, E. Persici, G. Feliciangeli, S. Stefoni

U.O. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Policlinico S. Orsola, Bologna

Low-toxicity immunosuppressive therapy in renal transplant

Introduction. Renal allograft loss in the long term may be due to the death of a patient with a functioning graft or to chronic allograft nephropathy. One of the most important factors in the development of chronic allograft nephropathy is drug nephrotoxicity. The term nephrotoxicity comprises two distinct forms of renal injury: acute and chronic. Immunosuppressive drugs, and in particular calcineurin inhibitors, have a variety of side effects including nephrotoxicity. The nephrotoxicity associated with calcineurin inhibitors is well known; this association has also been described for the newer agents.

Methods. We reviewed a large number of recent studies that attempted to reduce the toxicity of immunosuppressive regimens.

Results. A number of low-toxicity protocols have been developed. Encouraging results have been obtained with regimens that reduce or eliminate nephrotoxicity-inducing calcineurin inhibitors and with regimens that reduce or eliminate steroids, which are responsible for many diseases that may lead to the death of the patient, even with a functioning graft.

Conclusion. All immunosuppressive drugs may be nephrotoxic, even if they act through different mechanisms. Combining different drugs at low dosage would therefore seem the best solution. It is not yet clear which regimens will be the most effective from the point of view of maximizing patient and graft survival, minimizing rejection, and minimizing adverse events. (*G Ital Nefrol* 2007; 24: (Suppl. S38) S44-8)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Calcineurin inhibitors, Chronic allograft nephropathy, Immunosuppressive therapy, mTOR inhibitors, Nephrotoxicity

PAROLE CHIAVE:

Inibitori della calcineurina, Nefropatia cronica da trapianto, Terapia immunosoppressiva, Inibitori di mTOR, Nefrotossicità

✉ Indirizzo degli Autori:

Prof.ssa Maria Piera Scolari
U.O. Nefrologia, Dialisi
e Trapianto Renale
Policlinico S. Orsola
Via G. Massarenti, 9
40138 Bologna
e-mail: mariapiera.scolari@unibo.it

L'introduzione di nuovi farmaci immunosoppressori nel trattamento del paziente sottoposto a trapianto renale ha ridotto in maniera significativa l'incidenza del rigetto acuto ed ha migliorato nettamente la sopravvivenza del rene a 1 anno, attualmente dell'ordine dell'85-90%. Non altrettanto soddisfacente è la sopravvivenza del *graft* nel lungo termine. La perdita a distanza dell'organo trapiantato è dovuta sostanzialmente a due cause: la morte del paziente, anche con rene funzionante e la nefropatia cronica da trapianto (CAN).

La CAN è una condizione anatomo-clinica caratterizzata da una progressiva e irreversibile perdita della

funzione renale, accompagnata in genere da proteiuria e ipertensione, dovuta a fattori immunologici e non immunologici. Dal punto di vista istologico la CAN è caratterizzata da fibrosi interstiziale cronica, atrofia tubulare, alterazioni vascolari di tipo occlusivo e glomerulosclerosi. Le cause sono molteplici: la "qualità" del rene trapiantato, le lesioni legate al periodo perioperatorio (fra cui il danno da ischemia ripercussione), le lesioni di tipo immunologico (il rigetto acuto o cronico), la non *compliance* del paziente alla terapia immunosoppressiva, la presenza, nel ricevente, l'ipertensione o di fattori metabolici quali iperdislipidemia o diabete, la comparsa di lesioni di tipo nefrotossico indot-

te dalla terapia immunosoppressiva. Ed è la nefrotossicità che tratteremo brevemente, considerando le forme da inibitori della calcineurina e da inibitori del mTOR.

NEFROTOSSICITÀ DA INIBITORI DELLA CALCINEURINA

Classicamente la nefrotossicità in corso di trapianto è riferita agli inibitori della calcineurina (CNI) e in particolare alla Ciclosporina A (CsA). Tale farmaco, che dagli anni '80 è ampiamente utilizzato e che ha portato ad un considerevole incremento della sopravvivenza degli organi, ha paradossalmente accresciuto l'incidenza di complicanze, relative sia al *graft* che al paziente: la disfunzione acuta e cronica del rene, l'ipertensione, le alterazioni elettrolitiche, l'acidosi tubulare, ecc.

La nefrotossicità da CsA (1) comprende due forme particolari e distinte di quadri clinici: la forma acuta e la forma cronica. La nefrotossicità acuta è un fenomeno emodinamico funzionale, legato ad una vasocostrizione intrarenale che provoca riduzione del flusso ematico, aumento delle resistenze vascolari e riduzione variabile della filtrazione glomerulare. Tale forma acuta è spesso dipendente dalla sensibilità individuale ed è dose correlata; clinicamente asintomatica, è caratterizzata da un aumento della creatinina sierica, in genere con livelli elevati di farmaco nel sangue. Il quadro istologico renale è generalmente normale o presenta, a livello tubulare, una vacuolizzazione isomerica e la presenza di mitocondri giganti. Tali lesioni possono regredire con la sospensione del farmaco. La patogenesi sembra dovuta ad una interazione della CsA con il sistema renina-angiotensina aldosterone (2), con la iperproduzione di endotelina, la formazione in eccesso di trombosano e la stimolazione del sistema nervoso simpatico.

La forma di nefrotossicità cronica è una entità anato-clinica spesso insidiosa, associata alla progressiva e irreversibile perdita della funzione renale dovuta alla persistente vasocostrizione dell'arteriola afferente e ad alterazioni cellulari a livello tubulare e interstiziale, legate a loro volta all'aumento della espressione della Angiotensina II e all'aumentata produzione di citochine, in particolare TGF-beta e citochine pro-infiammatorie. L'analisi di biopsie renali seriate, effettuata da Nankivell et al. (3), ha dimostrato che la nefrotossicità da CNI insorge precocemente e che, nel tempo, è un reperto comune, essendo presente nell'80-100% dei casi; essa è caratterizzata da aumento della ialinosi arteriolare, dovuta a vacuolizzazione e necrosi delle cellule endoteliali e muscolari lisce, con essudazione proteica nella parete vascolare, formazione di depositi ialini e nodulari, ispessimento della parete dei piccoli vasi e glomerulosclerosi progressiva. La fibrosi a strisce

della corticale e l'atrofia dei tubuli adiacenti, un tempo considerate patognomiche della tossicità da inibitori della calcineurina, sono attualmente ritenute meno specifiche, soprattutto quando vi è una fibrosi diffusa (4). Altre alterazioni, quali l'iperplasia iuxtaglomerulare o la vacuolizzazione isomerica tubulare, sono meno comuni e di incerto significato. D'altra parte, in rapporto proprio alla sua azione più o meno marcata (4), la terapia immunosoppressiva influenza l'insorgenza delle lesioni dovute al rigetto acuto o cronico subclinico (alterazioni tubulari e fibrosi interstiziale); l'insorgenza di un rigetto subclinico, ad esempio, è secondo alcuni Autori rallentata dall'introduzione in terapia del Tacrolimus (TAC) rispetto a CsA e dall'uso contemporaneo di Micofenolato Mofetile (MMF), farmaco quest'ultimo che sembra essere il più attivo nel ridurre precocemente la fibrosi interstiziale cronica e la sua evoluzione nel tempo.

Vista la concreta azione negativa della nefrotossicità sull'*outcome* del trapianto di rene, da tempo si propongono strategie terapeutiche che, utilizzando farmaci alternativi, riducano al minimo l'uso degli inibitori della calcineurina o non ne prevedano del tutto l'uso. Studi al riguardo sono stati effettuati da vari Autori, utilizzando ad esempio il MMF (inibitore della sintesi delle purine). In pazienti stabili da almeno 10-12 mesi, in trattamento con CsA e steroidi, veniva introdotto MMF a 2 g/die (5); dopo 3 mesi un gruppo di pazienti veniva randomizzato alla progressiva riduzione della CsA, fino alla sospensione nei successivi 3 mesi. A tale variazione terapeutica faceva seguito un significativo miglioramento della funzione renale. Maggiore il numero di rigetti, che tuttavia non provocavano aumento di perdita del rene trapiantato.

In un altro *trial* randomizzato (6), in presenza di nefropatia cronica da trapianto, in un gruppo di pazienti già in terapia con inibitori della calcineurina e steroidi, dopo l'introduzione di MMF, si toglievano progressivamente gli inibitori della calcineurina; l'evoluzione di tali pazienti veniva confrontata con quella di altri che invece mantenevano gli inibitori della calcineurina. Anche in questo studio la sospensione degli inibitori della calcineurina portava ad un significativo miglioramento della funzione renale a distanza di tempo, senza variazioni significative dell'incidenza di episodi di rigetto acuto.

L'impiego relativamente più recente della Rapamicina (Sirolimus), inibitore della mTOR con un meccanismo immunosoppressivo pertanto differente da quello degli inibitori della calcineurina, ha permesso di effettuare trials con sospensione della CsA a 3 mesi dal trapianto. In effetti, i dati riportati da Kreis (7) nel *Rapamune Maintenance Regimen Trial*, in pazienti con lieve o moderato rischio immunologico, confermano che la precoce, progressiva e completa sospensione

della CsA, nell'ambito di trattamenti che prevedano Sirolimus (SRL), CsA e Steroidi, è sicuro ed efficace e porta ad un significativo e stabile miglioramento del filtrato glomerulare con significativo aumento della sopravvivenza del rene a distanza di 3 anni. Una conferma sulla riduzione delle lesioni croniche CsA-indotte è stata riportata da Mota (8) con dati su biopsie, programmate in base ad uno specifico protocollo, nello studio *Rapamune Maintenance Regimen*. Le biopsie venivano effettuate al momento del trapianto, a 12 e a 36 mesi di distanza e veniva utilizzato, come parametro confrontabile, uno score per il danno cronico sul rene trapiantato: il CADI score (*Chronic Allograft Damage Index*). In 63 pazienti che avevano completato il protocollo istologico a 36 mesi, il CADI score era significativamente più basso (4.70 vs 3.20, $p = 0.003$) nei pazienti che erano in terapia con SRL e Steroidi senza CNI. Lo stesso comportamento si osservava per lo score relativo alla atrofia tubulare (0.77 vs 0.32, $p < 0.001$).

Schemi di terapia hanno successivamente previsto l'impiego di Sirolimus per evitare completamente, fin dal momento del trapianto, l'uso dei CNI. I risultati non sono stati sempre univoci e in parte contraddicono le osservazioni precedenti. In uno studio di pazienti trapiantati in trattamento con steroidi, MMF e Tacrolimus, confrontati con un gruppo in trattamento con Steroidi, MMF e Sirolimus, Larson et al. (9), non osservavano significative differenze per quanto concerneva l'incidenza di rigetti acuti ed i livelli di filtrato glomerulare, a un anno e a due anni. Inoltre, biopsie seriate non mostravano alcuna differenza circa la presenza di lesioni fibrose interstiziali o atrofiche a livello tubulare, né lesioni a livello glomerulare. Veniva osservata, invece, una significativa ($p < 0.03$) minore incidenza di lesioni vascolari (23%) nel gruppo con SRL rispetto al gruppo con TAC (43%). Nonostante queste differenze, la sopravvivenza del rene trapiantato a distanza di 3 anni era sovrapponibile nei due gruppi considerati.

NEFROTOSSICITÀ DA INIBITORI DI mTOR

Sempre maggiore attenzione è stata rivolta ultimamente ai possibili effetti collaterali degli inibitori di mTOR, attraverso osservazioni di tipo sperimentale e clinico e con specifiche indagini sui possibili effetti tossici sul rene trapiantato. Studi sperimentali su animali hanno documentato che il trattamento con SIR rallenta la regressione delle lesioni tubulari prodotte dall'ischemia/riperfusion. Lieberthal (10) attribuisce questo effetto alla marcata inibizione della risposta rigenerativa cellulare e all'aumento della apoptosi delle cellule tubulari renali. Usato in associazione a CsA o a TAC, Sirolimus ne potenzia gli effetti nefrotossici (ritar-

data ripresa funzionale dopo trapianto); inoltre il Sirolimus sembra indurre un peggioramento della funzione renale e la formazione di cilindri intratubulari con quadri di insufficienza renale acuta in pazienti con proteinuria (11). È anche segnalata la comparsa di proteinuria, fino al range nefrosico, in pazienti con CAN convertiti a Sirolimus (12), sia per la comparsa di una glomerulopatia post-trapianto (13) sia per una compromissione del riassorbimento proteico tubulare (14).

Una forma particolare di tossicità legata ai farmaci immunosoppressori è la microangiopatia trombotica post-trapianto (TMA), non scatenata da eventi di natura immunologica quali ad esempio il rigetto acuto vascolare. Tale patologia si presenta "de novo", ha una prevalenza che varia dal 2.8 al 3.5% dei casi in pazienti con trapianto renale ed è associata ad una perdita del trapianto nel 20-25% dei pazienti colpiti. Oltre che riferibile a specifici fattori di rischio, quali la giovane età ed il sesso femminile del ricevente, l'anzianità del donatore, la ritardata ripresa funzionale, il rigetto acuto, ecc., l'insorgenza di TMA è stata associata all'uso di Ciclosporina, di Tacrolimus e di ATG o OKT3.

Evidenze recenti hanno documentato che anche Rapamicina può provocare lo sviluppo di una TMA; a livello internazionale i primi casi sono stati notati in pazienti che utilizzavano Sirolimus associato ad inibitori della calcineurina (15-17). Un'analisi riportata dal Registro Americano (USRDS) aveva identificato il Sirolimus come concreto fattore di rischio per l'insorgenza di TMA; più recentemente sono stati descritti altri casi in cui Sirolimus veniva utilizzato senza i CNI (18). Una valutazione effettuata da Fortin (19), su 368 pazienti trapiantati di rene o rene e pancreas aveva evidenziato lo sviluppo di una TMA non immunologica, confermata istologicamente, in 13 pazienti (3.5%) entro 6 mesi dal trapianto. L'incidenza della patologia era differente a seconda del trattamento immunosoppressivo effettuato: 20.7% nei pazienti in trattamento con CsA e SRL; 3.7% in quelli in trattamento con CsA e MMF; 6.1% in quelli in trattamento con TAC e SRL; 1.3% in quelli con TAC e MMF. Il rischio relativo di sviluppare una TMA era quindi nettamente superiore nei pazienti che effettuavano CsA e SRL. Gli stessi Autori hanno valutato, in un modello di colture cellulari, i possibili meccanismi responsabili dell'insorgenza della microangiopatia trombotica: il danno sulle cellule endoteliali microvascolari renali si è rivelato un momento cruciale nella formazione di microtrombi piastrinici e nello sviluppo di una TMA. La necrosi e l'apoptosi delle cellule endoteliali sono state implicate nel danno vascolare. È stato dimostrato che CsA presenta una attività pro-necrotica indipendente dal meccanismo di inibizione della calcineurina e che SRL non

induce apoptosi e non favorisce la necrosi cellulare endoteliale; Sirolimus tuttavia inibisce la proliferazione delle cellule endoteliali e l'attività angiogenetica soprattutto se in concentrazioni rilevanti e soprattutto se in associazione alla CsA. Tutto ciò potrebbe, anche se solo in parte, spiegare l'elevata incidenza di TMA in pazienti in trattamento con CsA e SRL in quanto da un lato verrebbe favorita la morte cellulare endoteliale e dall'altro verrebbe inibita la riparazione cellulare.

Un farmaco recentemente entrato nella pratica clinica, analogo di Sirolimus, è Everolimus. La presenza di un gruppo idrossietilico in posizione 40, modifica alcune caratteristiche farmacocinetiche dell'Everolimus rispetto a Sirolimus, giustificandone le differenti modalità di impiego e forse, in parte, anche gli effetti collaterali. Dopo i primi *trial* in cui Everolimus veniva utilizzato con CsA a dosi standard, si era osservato che, a fronte di un ottimo controllo della incidenza del rigetto acuto, si aveva un non soddisfacente recupero della funzionalità renale, verosimilmente legato al potenziamento, da parte di Everolimus della nefrotossicità indotta da CsA (20). Essendo stato dimostrato, d'altro canto, che sono i livelli elevati di CsA nel sangue e non quelli di Everolimus a determinare la nefrotossicità, i *trial* successivi hanno utilizzato Everolimus a dosaggio controllati, con dosi molto ridotte di CsA (21). Tali risultati, ancora preliminari, sembrano incoraggianti, ma sono necessari studi molto più ampi e a lungo termine.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le manifestazioni renali derivanti dalla tossicità farmacologica degli immunosoppressori sono un capitolo in espansione nel campo del trapianto renale. Le ultime evidenze cliniche non limitano alla sola ciclosporina, o agli inibitori della calcineurina in generale, il ruolo di farmaci potenzialmente nefrotossici; la totalità dei farmaci antirigetto risulta infatti potenzialmente in grado di determinare alterazioni renali che possono comprendere la glomerulosclerosi ischemica, la progressiva ialinosi arteriolare, la fibrosi interstiziale, la microangiopatia trombotica oltre a varie nefropatie proteinuriche in via di definizione.

Poiché l'azione nefrotossica sembra spesso dose-correlata, le ricerche attuali si basano anche sull'impiego di più farmaci utilizzati a dosi ridotte, sfruttando le caratteristiche peculiari di ciascuno; ciò garantirebbe un adeguato effetto immunosoppressivo limitando nel contempo la nefrotossicità nel lungo termine. Questa strategia permetterebbe inoltre di sfruttare al meglio specifici effetti positivi, che sono prerogativa di alcuni

farmaci; ad esempio l'azione antiproliferativa sulla parete vascolare, ben documentata per Everolimus nel trapianto di cuore e la inibizione della proliferazione delle cellule neoplastiche, soprattutto per quanto riguarda il sarcoma di Kaposi, collegata all'uso di Sirolimus.

RINGRAZIAMENTI

Fondi provenienti da finanziamento "Ricerca Fondamentale Orientata" (ex quota 60%): Studio sul sangue periferico e nel sedimento urinario di markers molecolare di nefropatia cronica da trapianto.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

RIASSUNTO

Introduzione. La perdita del rene trapiantato, nel lungo termine, è dovuta sostanzialmente a due cause: la morte del paziente con rene funzionante e la nefropatia cronica da trapianto (CAN). Uno dei fattori responsabili della CAN è la tossicità da farmaci.

La nefrotossicità può essere acuta o cronica ed è dovuta a diversi fattori.

I farmaci maggiormente responsabili sono gli inibitori della calcineurina. Altri farmaci di più recente impiego sembrano avere effetti tossici a livello parenchimale renale con meccanismi differenti.

Metodi. Abbiamo analizzato l'esperienza degli ultimi anni, che grazie anche all'utilizzazione di nuovi farmaci sempre più efficaci e mirati, suggerisce che vi sono molti schemi terapeutici che possono mirare ad una immunosoppressione adeguata, minimizzando gli effetti collaterali.

Risultati. Le principali strategie per raggiungere una adeguata immunosoppressione, mantenendo una bassa tossicità, sono le seguenti: ridurre o eliminare i farmaci inibitori della calcineurina (che manifestano in maggior grado una specifica nefrotossicità) e ridurre o eliminare i corticosteroidi (che sono responsabili di molte patologie che possono portare alla morte del paziente, con rene funzionante).

Conclusione. Tutti i farmaci immunosoppressori, pur con meccanismi diversi, presentano nefrotossicità, per cui le associazioni di farmaci a bassi dosaggi sembrano essere la soluzione migliore.

Tuttavia non è ancora oggi possibile definire il migliore schema terapeutico in termini di efficacia, tollerabilità e scarsa o nulla tossicità.

BIBLIOGRAFIA

1. Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Remuzzi G. Nephrotoxic Aspects of Cyclosporine. *Transplant Proc* 2004; 36 (Suppl. 2): S234-9.
2. Lee BD. Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. *Kidney Int* 1997; 52: 248.
3. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen R, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-33.
4. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Delta analysis of posttransplantation tubulointerstitial damage. *Transplantation* 2004; 15; 78(3): 434-41.
5. Abramowicz D, Manas D, Lao M, et al; Cyclosporine Withdrawal Study Group. Cyclosporine withdrawal from a mycophenolate mofetil-containing immunosuppressive regimen in stable kidney transplant recipients: a randomized, controlled study. *Transplantation* 2002 Dec 27; 74(12): 1725-34.
6. Suwelack B, Gerhardt U, Hohage H. Withdrawal of cyclosporine or tacrolimus after addition of mycophenolate mofetil in patients with chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant* 2004;4(4): 655-62.
7. Kreis H, Oberbauer R, Campistol JM et al; Rapamune Maintenance Regimen Trial. Long-term benefits with sirolimus-based therapy after early cyclosporine withdrawal. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(3): 809-17.
8. Mota A, Arias M, Taskinen EI et al; Rapamune Maintenance Regimen Trial. Sirolimus-based therapy following early cyclosporine withdrawal provides significantly improved renal histology and function at 3 years. *Am J Transplant* 2004; 4(6): 953-61.
9. Larson TS, Dean PG, Stegall MD et al. Complete avoidance of calcineurin inhibitors in renal transplantation: a randomized trial comparing sirolimus and tacrolimus. *Am J Transplant* 2006; 6(3): 514-22.
10. Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC et al. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281(4): F693-706.
11. Coombes JD, Mreich E, Liddle C, Rangan GK. Rapamycin worsens renal function and intratubular cast formation in protein overload nephropathy. *Kidney Int* 2005; 68(6): 2599-607.
12. Boratyńska M, Banasik M, Watorek E et al. Conversion to sirolimus from cyclosporine may induce nephrotic proteinuria and progressive deterioration of renal function in chronic allograft nephropathy patients. *Transplant Proc* 2006; 38(1): 101-4.
13. Dittrich E, Schmaldienst S, Soleiman A, Hörl WH, Pohanka E. Rapamycin-associated post-transplantation glomerulonephritis and its remission after reintroduction of calcineurin-inhibitor therapy. *Transpl Int* 2004;17(4): 215-20. Epub 2004 Apr 27.
14. Straathof-Galema L, Wetzels JF, Dijkman HB, Steenbergen EJ, Hilbrands LB. Sirolimus-associated heavy proteinuria in a renal transplant recipient: evidence for a tubular mechanism. *Am J Transplant* 2006; 6(2): 429-33.
15. MacDonald AS. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001; 71: 271-80.
16. Robson M, Cote I, Abbs I, Koffman G, Goldsmith D. Thrombotic micro-angiopathy with sirolimus-based immunosuppression: potentiation of calcineurin-inhibitors-induced endothelial damage? *Am J Transplant* 2003; 3: 324-7.
17. Saikali JA, Truong LD, Suki WN. Sirolimus may promote thrombotic microangiopathy. *Am J Transplant* 2003; 42: 202-6.
18. Barone GW, Gurley BJ, Abul-Ezz SR, Gokden N. Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy in a renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 202-6.
19. Fortin MC, Raymond MA, Madore F, et al. Increased risk of thrombotic microangiopathy in patients receiving a cyclosporin-sirolimus combination. *Am J Transplant* 2004; 4: 946-52.
20. Nashan B. Review of the proliferation inhibitor everolimus. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11: 1845-57.
21. Viitko S, Margreiter R, Weimar W, et al. Three-year efficacy and safety results from a study of everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. *Am J Transplant* 2005; 5: 2521-30.