Actualizaciones

Beneficios no anticonceptivos del sistema de liberación intrauterino de levonorgestrel

Non-contraceptive benefits of levonorgestrel intrauterine system

Dres. Enrique Pedro Bagnati; Eugenia Cualli de Trumper

E-mail: ebagnati@gmail.com

Resumen

El sistema intrauterino liberador de levonorgestrel (SIU-LNG) es un dispositivo intrauterino en forma de T con un reservorio hormonal que contiene 52 mg de levonorgestrel.

Es un anticonceptivo altamente eficaz (0,1% de embarazo en el primer año de uso), similar a la ligadura tubaria. Está aprobado para brindar anticoncepción durante 5 años, pero hay evidencias de que su efectividad puede alcanzar los 7 años de uso continuo.

Produce una reducción muy importante en el sangrado menstrual y en el 15-20% de los casos las usuarias permanecen en amenorrea. Este dispositivo liberador de LNG ejerce una fuerte acción local sobre el endometrio que redundará en beneficios en varias patologías benignas ginecológicas, tales como hipermenorrea, dismenorrea, miomatosis uterina, adenomiosis y endometriosis. También está comprobada su acción en la protección endometrial durante la terapia hormonal de reemplazo con estrógenos en mujeres posmenopáusicas y en el tratamiento de la hiperplasia endometrial.

Palabras clave: sistema intrauterino levonorgestrel, SIU-LNG, Mirena.

Abstract

The levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) is a T-shaped IUD with steroid reservoir containing 52 mg of levonorgestrel.

It is highly effective, with a typical-use first year pregnancy rate of 0.1%, similar to surgical tubal occlusion. It is approved for 5 years of contraceptive use, and there is evidence that it can be effective for up to 7 years of continuous use.

Most of the users experienced a dramatic reduction in menstrual bleeding, and about 15-20% of them became amenorrheic after one year of LNG-IUS insertion. The strong local effects at endometrium improved several gynecological conditions such as menorrhagia, dysmenorrhea, miomatosis, adenomyosis and endometriosis. There is also evidence to support its role on endometrial protection during postmenstrual estrogen replacement therapy

and during the treatment of endometrial hyperplasia.

Key words: *intrauterine system, LNG-IUS, Mirena.*

Introducción

La progesterona es la hormona clave en la regulación del proceso reproductivo.

Los progestágenos son activos por diferentes vías de administración: oral, parenteral, implantes subdérmicos, parches transdérmicos y sistemas intrauterinos de liberación.

El progestasert, en la década de los 70, fue el primer sistema liberador intrauterino de progesterona. El sistema intrauterino de liberación de levonorgestrel (SIU-LNG) fue lanzado al mercado con el nombre de Mirena® por Bayer Health Care y en algunos países europeos, con el nombre de Levonova®. En 1990 fue introducido en Finlandia, para luego ser aprobado en más de 100 países y llegó a ser utilizado por 10 millones de mujeres.

Los primeros estudios se enfocaron sobre su acción anticonceptiva y posteriormente dirigidos a sus beneficios no anticonceptivos.

El SIU-LNG es un dispositivo en forma de T de polietileno de 32 mm de largo por 32 mm de ancho.

El principio activo (LNG) está disperso en un reservorio de polidimetilsiloxano, que contiene 52 mg de LNG. La liberación inicial es de aproximadamente 20 µg por día, que disminuye gradualmente a 10 µg/día a los 5 años de uso.

El mecanismo de acción del SIU-LNG es mayoritariamente local, ingresa por los capilares endometriales a la circulación sistémica y alcanza un nivel máximo de valores plasmáticos (400 pg/ml) a las dos horas posinserción, con una meseta de 150-200 pg/ml dentro de las primeras semanas.

Un estudio demostró la importante acción local de este dispositivo con niveles de 808 ± 511 ng/g (gramo de tejido) comparado con 3,5 ng/g en mujeres a las que se les había suministrado 250 µg de LNG por vía oral. Comparativamente, las concentraciones plasmáticas fueron de 202 ± 102 pg/ml con SIU-LNG vs. 559 ± 209 pg/ml con LNG oral (1).

El SIU-LNG tiene una eficacia anticonceptiva con un índice de Pearl de 0,0 a 0,2 por 100 mujeres por año, similar a la de la ligadura tubaria.

Beneficios no anticonceptivos

Sumado a su eficacia como anticonceptivo, el SIU-LNG brinda la posibilidad de ser utilizado como variante terapéutica en diversas patologías ginecológicas, necesiten o no las pacientes su acción anticonceptiva.

Si bien los beneficios de la anticoncepción hormonal combinada son reconocidos en diversas patologías (2), se debe considerar que algunas usuarias tienen contraindicado el uso de estrógenos, o presentan intolerancia a los gestágenos por vía oral.

El SIU-LNG ha demostrado que por sus beneficios constituye una buena elección en diversas patologías ginecológicas, tales como hipermenorrea, metrorragias, endometriosis, adenomiosis, hiperplasia endometrial y miomatosis uterina. Además ejerce efecto protector sobre el endometrio durante la terapia hormonal en mujeres posmenopáusicas (3).

La aplicación clínica sobre estas patologías no se encuentra aún aprobada en todos los países.

Cambios en los patrones del sangrado menstrual

El SIU-LNG actúa sobre el endometrio produciendo inhibición de la síntesis de receptores a estrógenos y progesterona, alteración en la expresión de citoquinas, factores de crecimiento, enzimas y un aumento de la apoptosis celular. Este efecto se traduce en atrofia glandular, decidualización del estroma, supresión de arterias espiraladas y anomalías vasculares, inflamación y necrosis, lo que da lugar a un endometrio atrófico con insensibilidad a los estrógenos (hipomenorrea/amenorrea) (4).

El volumen de sangrado menstrual se ve reducido en el 82-96%.

Durante este proceso frecuentemente puede presentarse un sangrado escaso durante los 4-6 primeros ciclos posinserción, pasado este período en mujeres con ciclos menstruales normales se observa una reducción tanto en la cantidad de días como en el volumen (5).

La amenorrea se presenta en el 15-20% de las usuarias durante el primer año de uso y se incrementa en el 30-40% en los años posteriores (6, 7).

Anemia

La hipermenorrea en mujeres fértiles conduce a una anemia ferropénica.

La reducción del sangrado posinserción de un SIU-LNG incrementa rápidamente los niveles de hemoglobina, hematocrito y ferritina plasmática (8).

Un estudio a largo plazo en usuarias sanas de SIU-LNG demostró un incremento favorable en la concentración

de hemoglobina con un aumento de 1,6 g/dl después de 5 años de uso y 1,44 g/dl a los 7 años (3,9).

Hipermenorrea

El SIU-LNG está aprobado actualmente en más de 100 países para el tratamiento de la hipermenorrea y mostró una eficacia mayor a la de cualquier otra terapéutica tanto hormonal como no hormonal (10-12).

En una investigación realizada en 34 mujeres asiáticas en quienes fracasaron los tratamientos convencionales, se observó el 98% de reducción del sangrado menstrual a los 2 años posinserción, y un tercio de la población estudiada presentó amenorrea a los 6 meses de su colocación (13).

Numerosos estudios avalan su efectividad, ya que preserva la actividad reproductiva, disminuye los riesgos quirúrgicos y reduce los mayores costos de otras terapéuticas.

Un estudio randomizado a 5 años que comparó mujeres portadoras de SIU-LNG con mujeres histerectomizadas demostró el mismo índice de satisfacción y calidad de vida, con una relación costo-beneficio significativamente mayor (14).

Un estudio comparativo entre SIU-LNG y la resección endometrial o ablación mediante balón térmico arrojó iguales resultados con una significativa reducción del sangrado y similar satisfacción de las pacientes (15,16).

En una revisión Cochrane que incluye 5 trabajos randomizados, que comparó ablación endometrial vs. SIU-LNG para el tratamiento de la hipermenorrea, dos de ellos encontraron mejores resultados con la ablación después de un año de su realización y tres de ellos no demostraron diferencias en los controles a 1 y 3 años (17).

Otro estudio randomizado realizado en Nueva Zelanda en 83 mujeres obtuvo menores patrones de sangrado después de los 2 años comparado con la ablación endometrial (18,19).

Todos los estudios que han evaluado costo-beneficio comparándolo con la cirugía han demostrado los mayores beneficios del SIU-LNG.

Protección endometrial durante la terapia hormonal de reemplazo en mujeres posmenopáusicas

La utilización del SIU-LNG para proveer protección endometrial en mujeres que reciben tratamiento de reemplazo con estrógenos está aprobada en más de 90 países (10).

Un estudio randomizado en 40 mujeres perimenopáusicas que recibieron 2 mg de estradiol por vía oral y SIU-LNG o 250 µg de levonorgestrel por vía oral durante 10 días por ciclo no observó proliferación endometrial ni atipias en las tomas biópsicas realizadas en ninguno de los dos grupos. Estos hallazgos favorables

se observaron también en usuarias de SIU-LNG con parches transdérmicos (20, 21).

Otros estudios también avalan la efectividad de la protección endometrial con la utilización del SIU-LNG (22,23).

Miomatosis uterina

Se ha demostrado que el SIU-LNG provoca una reducción del sangrado menstrual en mujeres portadoras de una miomatosis uterina pero sin evidencia suficiente que demuestre la reducción de su tamaño y, en consecuencia, del volumen uterino (24).

En un estudio realizado en Rusia en 67 mujeres con miomatosis con un volumen uterino del tamaño de una gestación de 12 semanas y cavidad endometrial normal, el SIU-LNG redujo sustancialmente el sangrado menstrual a los 12 meses y también disminuyó el volumen uterino y el tamaño de los miomas (25).

En un estudio realizado en Turquía, 32 mujeres con hipermenorrea (380 ml) por miomas submucosos que ocupaban el 50% de la cavidad uterina fueron monitoreadas durante 12 meses. Los patrones de sangrado y niveles de hemoglobina se compararon con los de mujeres tratadas a través de una ablación endometrial; la mejoría en los patrones de sangrado y los niveles de hemoglobina fueron similares en ambos grupos (6).

Tratamiento del dolor pelviano asociado a endometriosis o adenomiosis

La endometriosis es el crecimiento del endometrio fuera de la cavidad endometrial.

Los niveles de LNG en el fluido peritoneal podrían favorecer su efecto sobre las lesiones endometrióticas alterando la expresión de los receptores a esteroides, lo que afecta la actividad macrofágica del fluido peritoneal, modificando así la producción de varias citoquinas y factores responsables del mantenimiento de las lesiones y de los síntomas (26).

Siendo la clínica de la endometriosis expresada según su localización por hipermenorrea, dismenorrea o dolor pelviano, la acción del SIU-LNG se traduce en una sensible mejoría de estos síntomas.

Diversos estudios avalan la utilización del SIU-LNG para el tratamiento del dolor pelviano asociado a la endometriosis y la adenomiosis (27,28), ya que se observó la disminución del dolor en estas mujeres, diagnosticadas y tratadas por vía laparoscópica (29,30).

Otro estudio randomizado halló una reducción del dolor y mejor calidad de vida con el SIU-LNG en relación con el uso de análogos de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en mujeres con un estadio III/IV de endometriosis (31).

En pacientes con adenomiosis, diversas investigaciones señalan una mejoría en las metrorragias y el dolor asociado a esta patología (32,33).

En un estudio realizado en Brasil en 29 mujeres con adenomiosis se demostró por resonancia nuclear magnética una reducción de ésta en la zona de unión del endometrio con el miometrio, pero no acompañada de una disminución del volumen uterino (34).

Tratamiento de la hiperplasia endometrial y cáncer

Numerosos estudios demuestran la disminución del riesgo de cáncer de endometrio en usuarias de dispositivo intrauterino (DIU) comparado con no usuarias, aunque muchos de estos estudios no especifican el tipo de dispositivo utilizado (35).

Un reciente metaanálisis también señaló una disminución del riesgo asociado en usuarias de DIU con un *odds ratio* de 0,54 (95%CI 0,47-0,63) (36).

El mecanismo por el cual los DIU con cobre ofrecen protección aún no se ha elucidado. La liberación de levonorgestrel por intermedio del SIU-LNG oponiéndose al estímulo estrogénico podría explicar la disminución del riesgo de hiperplasia y cáncer (37).

Los progestágenos administrados por vía oral pueden ser mal tolerados por algunas mujeres, por lo cual la utilización de LNG local constituye una buena alternativa.

Existen evidencias de una completa regresión histológica de la hiperplasia endometrial en mujeres bajo tratamiento con SIU-LNG (38).

Un estudio randomizado realizado recientemente en Noruega en 370 mujeres portadoras de hiperplasia simple o atípica, que comparó SIU-LNG con progestágenos orales, demostró una mejor resolución en las usuarias de SIU-LNG y no se halló, en 106 meses de uso, ningún caso que evolucionara a carcinoma (39).

En otro estudio realizado en 27 mujeres portadoras de un carcinoma inicial de endometrio (Grado I), se observó una regresión en un rango del 25-75% luego de su exposición al SIU-LNG (40,41).

No obstante la evidencia hallada hasta el presente, serán necesarios más estudios para determinar la utilidad y seguridad del SIU-LNG en el tratamiento del carcinoma de endometrio.

Tratamiento adyuvante con tamoxifeno

El tamoxifeno, por su acción estrogénica, ejerce su efecto sobre el útero aumentando el riesgo de desarrollar pólipos endometriales, miomas, hiperplasia y cáncer de endometrio (42,43).

Estudios randomizados demostraron que el SIU-LNG previene el desarrollo de pólipos o hiperplasia en pacientes bajo tratamiento con tamoxifeno después de un año de uso (44).

Conclusiones

El SIU-LNG no solo constituye una excelente opción anticonceptiva cuya efectividad es comparable con la de la ligadura tubaria, con la ventaja de su segura reversibilidad, sino que además ha demostrado sus beneficios en el campo de diversas patologías ginecológicas, tales como hipermenorrea, dismenorrea, miomatosis uterina, adenomiosis y endometriosis. También está comprobada su acción en la protección endometrial durante la terapia hormonal de reemplazo con estrógenos en mujeres posmenopáusicas, en el tratamiento de la hiperplasia endometrial, como terapia adyuvante con tamoxifeno y, de acuerdo con los últimos estudios, en estadios iniciales del carcinoma de endometrio.

Los resultados terapéuticos obtenidos hasta el presente estimulan y abren nuevas líneas de investigación sobre los beneficios no anticonceptivos del SIU-LNG.

Referencias

1. Nilsson CG, Haukkamaa M, Vierola H, et al. Tissue concentrations of levonorgestrel in women using a levonorgestrel-releasing IUD. *Clinic Endocrinol.* 1982;17:529-536.
2. Burkman R, Schlesselman JJ, Ziemann M. Safety concerns and health benefits associated with oral contraception. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190:S5-S22.
3. Anderson K, Odland V, Rybo G. Levonorgestrel-releasing and copper-releasing (Nova T) IUD's during five years of use a randomized comparative trial. *Contraception.* 1994;49:57-72.
4. Silverberg SG, Haukkamaa M, Arko H, Nilsson CG, Luukkainen T. Endometrial morphology during long-term use of levonorgestrel-releasing intrauterine device. *Int J Gynecol Pathol.* 1986;5:235-241.
5. Suvisaari J, Lahteenmaki P. Detailed analysis of menstrual bleeding patterns after postmenstrual and postabortal insertion of copper IUD or a levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Contraception.* 1996;54:201-208.
6. Sivin I, Stern J. Health during prolonged use of levonorgestrel 20 micrograms/d and copper Tcu380 Ag intrauterine contraceptive device: a multicenter study International Committee for Contraception Research (ICCR). *Fertil Steril.* 1994;61:70-77.
7. Hidalgo M, Bahamondes L, Perrotti M, Diaz J, Dantas-Montero C, Petta C. Bleeding patterns and clinical performance of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (Mirena) up to two years. *Contraception.* 2002;65:129-132.
8. Ronnerdag M, Odland V. Health effects of long-term use of the intrauterine levonorgestrel-releasing system: a follow-up study over 12 years of continuous use. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1999;78:716-721.
9. Sivin I, Stern J, Coutinho E, et al. Prolonged intrauterine contraception a seven years randomized study of the levonorgestrel 20 mcg/d (LNg20) and the copper T380Ag IUD's. *Contraception.* 1991;44:473-480.
10. MacIsaac L, Espey E. Intrauterine contraception: The Pendulum Swings Back. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2007;34:91-111.
11. Irvine GA, Campbell-Brown MB, Lumsden MA, Heikkila A, et al. Randomized comparative trial of the levonorgestrel intrauterine system and norethisterone for treatment of idiopathic menorrhagia. *Br J Obstet Gynecol.* 1998;105:592-598.
12. Milson I, Andersson K, Andersch B, Rybo G. A comparison of furbiprofen, tranexamic acid, and levonorgestrel-releasing intrauterine contraceptive device in the treatment of idiopathic menorrhagia. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164:879-883.
13. Xiao B, Wu SC, Chong J, Zeng T, Han LH, Luukkainen T. Therapeutic effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system in the treatment of idiopathic menorrhagia. *Fertil Steril.* 2003;79:963-969.
14. Hurskainen R, Teperi J, Rissanen P, et al. Clinical outcomes and costs with levonorgestrel-releasing intrauterine system or hysterectomy for treatment of menorrhagia: randomized trial 5-years follow-up. *JAMA.* 2004;291:1456-1463.
15. Clegg JP, Guest JF, Hurskainen R. Cost-utility of levonorgestrel intrauterine system compared with hysterectomy and second generation endometrial ablative techniques in managing patients with menorrhagia in the UK. *Curr Med Res Opin.* 2007;23:1637-1648.
16. Marjoribanks J, Lethaby A, Farquhar C. Surgery versus medical therapy for heavy menstrual bleeding. *Cochrane Database of Syst Rev.* 2006;CD003855.
17. Soysal M, Soysal S, Ozer S. A randomized controlled trial of levonorgestrel releasing IUD and thermal balloon ablation in the treatment of menorrhagia. *Zentral Gynakol.* 2002;124:213-219.
18. Busfeld RA, Farquhar CM, Sowter MC, et al. A randomized trial comparing the levonorgestrel intrauterine system and thermal balloon ablation for heavy menstrual bleeding. *Br J Obstet Gynecol.* 2006;113:257-263.
19. Kaunitz AM, Meredith S, Inki P, Kubba A, Sanchez Ramos L. Levonorgestrel-releasing intrauterine system and endometrial ablation in heavy menstrual bleeding: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2009;113:1104-1116.
20. Anderson K, Stadberg E, Mattsson LA, Rybo G, Samsioe G. Intrauterine or oral administration of levonorgestrel in combination with estradiol to perimenopausal women-effects on lipid metabolism during 12 months of treatment. *Int J Fert Menopausal Stud.* 1996;41:476-483.

21. Raudaskoski TH, Lahti EI, Kauppila AJ, Apaja-Sarkinen MA, Laatikainen TJ. Transdermal estrogen with levonorgestrel-releasing intrauterine device for climacteric complaints: clinical and endometrial responses. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172:114-119.
22. Hampton NR, Rees MC, Lowe DG, Rauramo I, Barlow D, Guillebaud J. Levonorgestrel intrauterine system (LNG-IUS) with conjugated oral equine estrogens: a successful regimen for THR in perimenopausal women. *Hum Reprod.* 2005;20:2653-2660.
23. Suvanto-Luukkonen E, Kauppila A. The levonorgestrel intrauterine system in menopausal hormone replacement therapy five-year experience. *Fertil Steril.* 1999;72:161-163.
24. Kaunitz A. Progestin-releasing intrauterine system and leiomyoma. *Contraception.* 2007;75:S130-S133.
25. Grigorieva V, Chen-Mok M, Tarasova M, Mikhailov A. Use of levonorgestrel-releasing intrauterine system to treat bleeding related to uterine leiomyomas. *Fertil Steril.* 2003;79:1194-1198.
26. Lockhat FB, Ememboul J, Konje JC. The evaluation of effectiveness of an intrauterine administered progestogen (levonorgestrel) in the symptomatic treatment of endometriosis and the staging of the disease. *Hum Reprod.* 2004;19:179-184.
27. Fedele L, Bianchi S, Zanconato G, Portuese A, Raffaelli R. Use of a levonorgestrel-releasing device in the treatment of rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril.* 2001;75:485-488.
28. Sheng J, Zhang WY, Shang LD. The LNG-IUS study on adenomyosis: a 3-years follow-up study on the efficacy and side effects of the use of levonorgestrel intrauterine system for the treatment of dysmenorrhea associated with adenomyosis. *Contraception.* 2009;79:189-193.
29. Vercellini P, Frontino G, De Giorgi O, Aimi G, Zaina B, Crosignani PG. Comparison of levonorgestrel-releasing intrauterine device versus expectant management after conservative surgery for symptomatic endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril.* 2003;80:305-309.
30. Lockhat FB, Ememboul JO, Konje JC. The efficacy, side effects and continuation rates in women with symptomatic endometriosis undergoing treatment with an intrauterine administered progestagen (levonorgestrel): a 3-years follow-up. *Hum Reprod.* 2005;20:789-793.
31. Petta CA, Ferriani RA, Abrao MS, et al. Randomized clinical trial of levonorgestrel-releasing intrauterine system and depot GnRH analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2005;20:1993-1998.
32. Maia H Jr, Maltez A, Coelho G, Athayde C, Coutinho EM. Insertion of Mirena after endometrial resection in patients with adenomyosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2003;10:512-516.
33. Fong YF, Shing K. Medical treatment of a grossly enlarged adenomyotic uterus with the levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Contraception.* 1999;60:173-175.
34. Bragheto AM, Caserta N, Bahamondes L, Oetta CA. Effectiveness of levonorgestrel-releasing intrauterine system in the treatment of adenomyosis diagnosed and monitored by resonance imaging. *Contraception.* 2007;76:195-199.
35. Hubacher D, Grimes DA. Noncontraceptive health benefits of intrauterine device: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2002;57:120-128.
36. Beining RM, Dennis LK, Smith EM, Dokras A. Meta-analysis of intrauterine device use and risk of endometrial cancer. *Ann Epidemiol.* 2008;18:492-499.
37. Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P. Role of exogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives. *Ann NY Acad Sci.* 2001;943:296-315.
38. Bahamondes L, Ribeiro-Hughes P, de Andrade KC, Leo-Martins O, Petta CA. Levonorgestrel-releasing intrauterine system (Mirena) as a therapy for endometrial hyperplasia and carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82:580-582.
39. Orbo A, Arnes M, Hancke C, Vereide AB, Pettersen I, Larsen K. Treatment results of endometrial hyperplasia after prospective D-score classification: a follow-up study comparing effect of LNG-IUD and oral progestins versus observation only. *Gynecol Oncol.* 2008;111:68-73.
40. Dhar KK, Needhi Rajan T, Koslowski M, Woolas RP. Is levonorgestrel intrauterine system effective for treatment of early endometrial cancer? Report of four cases and review of the literature. *Gynecol Oncol.* 2005;97:924-927.
41. Signorelli M, Caspani G, Bonazzi C, Chiappa V, Perego P, Mangioni C. Fertility-sparing treatment in young women with endometrial cancer or atypical complex hyperplasia: a prospective single-institution experience of 21 cases. *BJOG.* 2009;116:114-118.
42. Kedar RP, Bourne T, Powles TJ, et al. Effects of tamoxifen on uterus and ovaries of postmenopausal women in randomized breast cancer prevention trial. *Lancet.* 1994;343:1318-1321.
43. Van Leeuwen FE, Benraadt J, Coebergh JW, et al. Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer. *Lancet.* 1994;343:448-452.
44. Gardner FJ, Konge JC, Abrams KR, et al. Endometrial protection from tamoxifen stimulated changes by levonorgestrel-releasing intrauterine system: a randomized controlled trial. *Lancet.* 2000;356:1711-1717.