

**DIRETRIZES DE DOENÇAS PULMONARES INTERSTICIAIS DA SOCIEDADE  
BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA**

**EDITORES**

**Bruno Guedes Baldi**

Médico Assistente da Divisão de Pneumologia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Carlos Alberto de Castro Pereira**

Coordenador do Curso de Pós Graduação de Doenças Pulmonares Intersticiais da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

**AUTORES**

**Adalberto Sperb Rubin**

Professor adjunto de Pneumologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Coordenador do Ambulatório de Doenças Intersticiais da Santa Casa de Porto Alegre

**Alfredo Nicodemos da Cruz Santana**

Médico Assistente Doutor, Supervisor da Residência Médica do Serviço de Doenças Torácicas, Hospital Regional da Asa Norte, SES, Brasília

**André Nathan Costa**

Médico Colaborador da Divisão de Pneumologia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Bruno Guedes Baldi**

Médico Assistente da Divisão de Pneumologia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Carlos Alberto de Castro Pereira**

Coordenador do Curso de Pós Graduação de Doenças Pulmonares Intersticiais da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

**Carlos Roberto Ribeiro Carvalho**

Professor Associado - Livre Docente, Diretor da Divisão de Pneumologia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Eduardo Algranti**

Chefe do Serviço de Medicina da FUNDACENTRO, São Paulo

**Eduardo Mello de Capitani**

Professor Associado da Disciplina de Pneumologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

**Eduardo Pamplona Bethlem**

Professor Associado de Pneumologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)

**Ester Nei Aparecida Martins Coletta**

Professora Adjunta do Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo  
Patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo

**Jaquelina Sonoe Ota Arakaki**

Médica Assistente da Disciplina de Pneumologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

**José Antônio Baddini Martinez**

Professor Associado do Departamento de Clínica Médica e Coordenador da Divisão de Pneumologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**Jozélio Freire de Carvalho**

Professor Colaborador do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Leila John Marques Steidle**

Professora Adjunta do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal de Santa Catarina

Coordenadora da Residência Médica em Pneumologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina

**Marcelo Jorge Jacó Rocha**

Médico Responsável pelo Ambulatório de Doenças Intersticiais do Hospital de Messejana, Fortaleza, Ceará

**Mariana Silva Lima**

Médica Responsável pelo Ambulatório de Doenças Intersticiais do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo

**Maria Raquel Soares**

Pneumologista do Ambulatório de Doenças Intersticiais do Hospital do Servidor Estadual de São Paulo

**Marlova Luzzi Caramori**

Médica Colaboradora do Grupo de Transplante Pulmonar do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Miguel Abidon Aide**

Professor Associado de Pneumologia da Universidade Federal Fluminense

**Rimarcs Gomes Ferreira**

Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

**Ronaldo Adib Kairalla**

Professor Assistente-Doutor da Disciplina de Pneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas da FMUSP  
Coordenador do Núcleo Avançado de Tórax do Hospital Sírio Libanês, São Paulo

**Rudolf Krawczenko Feitoza de Oliveira**

Pós-graduando da Disciplina de Pneumologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo

**Sérgio Jezler**

Pneumologista da Universidade Federal da Bahia

**Sílvia Carla Sousa Rodrigues**

Pneumologista Assistente do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo

**Suzana Pinheiro Pimenta**

Pneumologista do Hospital AC Camargo, São Paulo

## LINFANGIOLEIOMIOMATOSE

### Considerações iniciais

A linfangioleiomiomatose (LAM) é uma afecção degenerativa que afeta quase exclusivamente mulheres, comumente entre a 3ª e 4ª década de vida (1,2). Pode ocorrer associada à Esclerose Tuberosa (ET) ou na forma esporádica (LAM-E). As repercussões pulmonares na LAM-E são mais expressivas.

### Diagnóstico

Os sintomas e sinais mais freqüentes são dispneia e pneumotórax, porém tosse, hemoptise e derrame pleural quiloso também podem ocorrer (1,3-6).

O diagnóstico definitivo de LAM pode ser obtido por: 1) associação entre os cistos pulmonares na TCAR e uma biópsia pulmonar mostrando os achados patológicos de LAM. O diagnóstico por biópsia cirúrgica é preferido. 2) achados característicos na TCAR e qualquer um dos seguintes: angiomiolipoma renal, derrame pleural ou ascite quilosa, linfangioleiomioma ou envolvimento ganglionar por LAM, diagnóstico definitivo ou provável de esclerose tuberosa (1,7,8).

Recentemente, Young e colaboradores demonstraram a implicação da dosagem do VEGF-D (*vascular endothelial growth factor- D*) sérico no diagnóstico de LAM, sendo obtida sensibilidade de 60% e especificidade de 100% para valor de corte > 800 pg/mL em pacientes com achados tomográficos característicos (9). Aproximadamente um quarto das pacientes com LAM neste estudo apresentaram VEGF-D < 800 pg/mL. O método utilizado para a análise foi o *Quantikine Human VEGF-D Immunoassay (R&D*

*Systems; Minneapolis, MN*) limitando seu uso na prática clínica pela disponibilidade nos centros diagnósticos.

O material de biópsia deve ser examinado por patologista experiente na área. Quando os achados morfológicos não permitirem uma conclusão segura, imunohistoquímica para actina e HMB45 devem ser realizados. Todos os pacientes com LAM ou suspeita de LAM devem ser submetidos à TC abdominal e pélvica para identificação de angiomiolipomas e outras lesões abdominais (10).

As implicações diagnósticas e terapêuticas exigem que um diagnóstico seguro seja realizado por biópsia cirúrgica em casos indefinidos.

Em todo paciente com LAM deve ser feita uma história familiar e um exame físico cuidadoso, tendo em vista a possibilidade de ET; em especial achados de pele, retina e SNC devem ser procurados (11). Ressonância nuclear magnética cerebral deve ser realizada na avaliação inicial e antes do uso de progestágenos, se considerados, desde que meningiomas podem ser descobertos na LAM-E (12).

Tomografia de abdome deve ser solicitada de rotina. Um estudo mostrou que de 80 pacientes com LAM-E, 61 (76%) apresentavam achados abdominais positivos, sendo os mais comuns angiomiolipomas renais (AML) em 43 pacientes (54%), linfadenomegalias abdominais em 31 (39%) e linfangiomas em 13 (16%) (10). Na LAM associada à ET estes achados são ainda mais freqüentes.

Os cistos pulmonares estão presentes em todas as pacientes com LAM, são difusamente distribuídos, com paredes finas, podendo variar de milímetros a centímetros e devem ser avaliados, preferencialmente, através da TCAR de tórax (8,13,14). A gravidade da doença pulmonar pode ser graduada semiquantitativamente pela TC. Três níveis de cortes, superior, médio e inferior são selecionados e em cada corte a porcentagem de área julgada anormal é quantificada como segue: grau 0, ausente; grau 1, menos que 30% anormal; grau 2, 30%-60% anormal; grau 3, mais de 60% anormal. Um escore global é obtido para cada paciente realizando-se a média dos graus de todas as três zonas pulmonares (15).

Prova funcional completa, com medida de volumes pulmonares, antes e após broncodilatador, e medida da capacidade de difusão do monóxido de carbono (DCO) devem ser realizados. Os testes de função pulmonar mostram obstrução ao fluxo aéreo em 57%, valores normais em 34% e restrição nos restantes (1). Reversibilidade ao fluxo aéreo é mostrada em 25-30% dos casos (16). A DCO é reduzida em 82-97% dos casos.

O declínio na função pulmonar é muito variável, mas reduções de VEF<sub>1</sub> e DCO anuais acima de 5 a 10% do valor predito indicam doença rapidamente progressiva (2). A evolução da doença deve, portanto, ser avaliada por medidas seriadas de VEF<sub>1</sub> e

DCO a cada 3-6 meses em pacientes com doença progressiva e a cada 6-12 meses naqueles com doença mais estável.

Estudo utilizando ecocardiograma em pacientes com LAM demonstrou que a presença de hipertensão pulmonar (HP) ao repouso é rara, mas foi frequente durante o esforço (17). Avaliações futuras, inclusive com a perspectiva de utilização de medidas invasivas da pressão arterial pulmonar, são necessárias para se estabelecer com maior acurácia a prevalência de HP, e sua relevância, nessa doença.

O teste de exercício cardiopulmonar pode revelar alterações de troca gasosa, limitação ventilatória e hipoxemia, as quais podem ocorrer com função quase normal (18). O teste de caminhada de 6 minutos pode mostrar hipoxemia. Foi demonstrado em estudo recente que o desenvolvimento de hipoxemia durante o sono também é frequente nas pacientes com LAM, mesmo naquelas com SpO<sub>2</sub> normal quando acordadas (19).

### **Tratamento**

Atualmente existem poucos estudos clínicos direcionados para o tratamento da LAM. Devido o aparente gatilho hormonal presente na LAM, tendo em vista a piora clínica na gravidez e com uso de estrógenos, bem como a identificação de receptores de estrogênio e progesterona nas células de LAM, diversos estudos foram dirigidos para avaliar o efeito do bloqueio hormonal (5,20). Nenhum deles, porém, foi placebo-controlado.

Progesterona tem sido usada há vários anos. Algumas séries tem sugerido efeito favorável da progesterona em alguns pacientes, enquanto que outros estudos não mostraram efeito no declínio funcional (4,21-23). Igualmente os análogos de GnRh (*gonadotropin-releasing hormone*) como a goserelina se revelaram eficazes em estabilizar a queda do VEF<sub>1</sub>, enquanto outro estudo mostrou perda funcional na vigência de triptorelina (24,25). Outro tratamento utilizado foi a ooforectomia, sendo que não houve melhora em 15 de 30 pacientes submetidas à ooforectomia bilateral (4). As diretrizes da *European Respiratory Society* sugerem que a progesterona não deve ser usada rotineiramente em pacientes com LAM (8). Nos casos rapidamente progressivos ou graves pode ser feito um ensaio terapêutico por 6 a 12 meses.

Anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal devem ser evitados. As pacientes com doença grave devem ser desencorajadas da gravidez pelo risco de pneumotórax, parto prematuro e maior risco de sangramento de angiomiolipomas renais (26,27). Aconselhamento genético deve ser dado à pacientes com ET que desejam engravidar.

Devido ao risco aumentado de pneumotórax (66% no curso da doença) pacientes com LAM devem ser orientados sobre o risco e busca de tratamento de emergência na vigência de sintomas (5). Na presença de pneumotórax, a pleurodese pode ser realizada e não contra-indica eventual transplante pulmonar, apesar de aumentar a dificuldade técnica e o risco de sangramento no peri-operatório (28,29).

Pneumotórax em ou após viagens aéreas tem sido relatados (1,1 por 100 viagens aéreas), porém parece decorrer mais do risco intrínseco da doença do que da viagem em si. Em pacientes mais graves, o uso de O<sub>2</sub> suplementar pode ser necessário durante o vôo (30).

Reabilitação pulmonar pode ser oferecida em casos com dispneia. Broncodilatadores inalados devem ser tentados em pacientes com obstrução ao fluxo aéreo (31).

Algumas perspectivas novas de tratamento com base na patogenia da LAM são disponíveis. Pacientes com LAM apresentam intensa atividade tecidual e títulos elevados séricos de metaloproteinases (MMP) especialmente MMP-2 e MMP-9, sendo implicadas na formação dos cistos pulmonares (32,33). Baseado neste princípio, o uso de doxiciclina, um inibidor de metaloproteinase em dose subantimicrobiana mostrou-se efetivo em reduzir os níveis de MMP em uma coorte de pacientes com LAM, além de melhora funcional em um relato de caso (34,35).

Outro potencial alvo terapêutico é a mTOR (*mamalian target of rapamycin*). Nas células LAM, mutações nos genes TSC1 ou TSC2 resultam em perda da regulação da mTOR, uma proteína-quinase chave que media os fatores de estimulação do crescimento e o metabolismo celular (36). O sirolimo (Rapamicina<sup>®</sup>) forma um complexo que liga e inibe a mTOR. Um estudo não randomizado de 24 meses examinou o efeito do sirolimo no volume dos AML e função pulmonar de pacientes com LAM, seguidas posteriormente por 12 meses sem a droga. Os AML tiveram redução de 53% após 12 meses, tendo voltado a crescer após a cessação do tratamento, além de melhora funcional em um subgrupo de pacientes (37).

Em estudo mais recente com sirolimo, randomizado e placebo-controlado, as pacientes foram tratadas por 12 meses, seguidas por período de observação de 12 meses sem a medicação, sendo a dose inicial de 2 mg/dia, ajustada para nível sérico de 5 a 15 ng/mL. Os níveis de VEGF-D também foram dosados. As pacientes apresentavam VEF<sub>1</sub> e DCO basais de 48% e 43% do predito, respectivamente. Foi observado ganho ao final de 12 meses no VEF<sub>1</sub> e CVF do grupo sirolimo quando comparado à perda funcional no grupo placebo, com diferença significativa, além da redução expressiva dos títulos de VEGF-D do grupo tratado. No período observacional, houve queda semelhante do VEF<sub>1</sub> em ambos os grupos. Eventos adversos, incluindo

mucosite, diarreia, hipercolesterolemia e rash acneiforme foram mais freqüentes no grupo sirolimo, porém as infecções respiratórias ocorreram igualmente em ambos os grupos (38).

Ainda são necessários ensaios clínicos com pacientes funcionalmente menos graves para avaliar o benefício do sirolimo nesta população.

### **Recomendações**

- **O diagnóstico de LAM pode ser feito clinico-radiologicamente em mulheres com achados tomográficos de cistos difusos associados a achados extrapulmonares (angiomiolipoma renal ou acometimento linfático) (1C).**
- **As implicações diagnósticas e terapêuticas exigem que um diagnóstico seguro seja realizado por biópsia cirúrgica em casos indefinidos (1C).**
- **O uso de progesterona ou análogos de GnRh pode ser considerado em pacientes com doença rapidamente progressiva, devendo ser feito um ensaio terapêutico por 6 a 12 meses (1C).**
- **A indicação do sirolimo deve ser considerada em pacientes com doença mais avançada ou rapidamente progressiva (1A).**

### **Referências**

1. Ryu JH, Moss J, Beck GJ, Lee JC, Brown KK, Chapman JT, et al. The NHLBI lymphangioleiomyomatosis registry: characteristics of 230 patients at enrollment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(1):105-11.
2. Taveira-DaSilva AM, Pacheco-Rodriguez G, Moss J. The natural history of lymphangioleiomyomatosis: markers of severity, rate of progression and prognosis. *Lymphat Res Biol.* 2010;8(1):9-19.
3. Medeiros Jr P, Carvalho CRR. Linfangioleiomiomatose pulmonar. *J Bras Pneumol.* 2004;30(1):66-77.
4. Taylor JR, Ryu J, Colby TV, Raffin TA. Lymphangioleiomyomatosis. Clinical course in 32 patients. *N Engl J Med.* 1990;323(18):1254-60.
5. Johnson SR, Tattersfield AE. Clinical experience of lymphangioleiomyomatosis in the UK. *Thorax.* 2000;55(12):1052-7.
6. Baldi BG, Pimenta SP, Kawassaki Ade M, Bernardi Fdel C, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Pulmonary arterial involvement leading to alveolar hemorrhage in lymphangioleiomyomatosis. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(7):1301-3.



7. Kitaichi M, Nishimura K, Itoh H, Izumi T. Pulmonary lymphangiomyomatosis: a report of 46 patients including a clinicopathologic study of prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(2 Pt 1):527-33.
8. Johnson SR, Cordier JF, Lazor R, Cottin V, Costabel U, Harari S, et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis and management of lymphangiomyomatosis. *Eur Respir J*. 2010;35(1):14-26.
9. Young LR, Vandyke R, Gulleman PM, Inoue Y, Brown KK, Schmidt LS, et al. Serum vascular endothelial growth factor-D prospectively distinguishes lymphangiomyomatosis from other diseases. *Chest*. 2010;138(3):674-81.
10. Avila NA, Kelly JA, Chu SC, Dwyer AJ, Moss J. Lymphangiomyomatosis: abdominopelvic CT and US findings. *Radiology*. 2000;216(1):147-53.
11. Umeoka S, Koyama T, Miki Y, Akai M, Tsutsui K, Togashi K. Pictorial review of tuberous sclerosis in various organs. *Radiographics*. 2008;28(7):e32.
12. Moss J, DeCastro R, Patronas NJ, Taveira-DaSilva A. Meningiomas in lymphangiomyomatosis. *JAMA*. 2001;286(15):1879-81.
13. Muller NL, Chiles C, Kullnig P. Pulmonary lymphangiomyomatosis: correlation of CT with radiographic and functional findings. *Radiology*. 1990;175(2):335-9.
14. Avila NA, Chen CC, Chu SC, Wu M, Jones EC, Neumann RD, et al. Pulmonary lymphangiomyomatosis: correlation of ventilation-perfusion scintigraphy, chest radiography, and CT with pulmonary function tests. *Radiology*. 2000;214(2):441-6.
15. Avila NA, Kelly JA, Dwyer AJ, Johnson DL, Jones EC, Moss J. Lymphangiomyomatosis: correlation of qualitative and quantitative thin-section CT with pulmonary function tests and assessment of dependence on pleurodesis. *Radiology*. 2002;223(1):189-97.
16. Taveira-DaSilva AM, Steagall WK, Rabel A, Hathaway O, Harari S, Cassandro R, et al. Reversible airflow obstruction in lymphangiomyomatosis. *Chest*. 2009;136(6):1596-603.
17. Taveira-DaSilva AM, Hathaway OM, Sachdev V, Shizukuda Y, Birdsall CW, Moss J. Pulmonary artery pressure in lymphangiomyomatosis: an echocardiographic study. *Chest*. 2007;132(5):1573-8.
18. Taveira-DaSilva AM, Stylianou MP, Hedin CJ, Kristof AS, Avila NA, Rabel A, et al. Maximal oxygen uptake and severity of disease in lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(12):1427-31.

19. Medeiros P Jr, Lorenzi-Filho G, Pimenta SP, Kairalla RA, Carvalho CR. Sleep desaturation and its relationship to lung function, exercise and quality of life in LAM. *Respir Med.* 2012;106(3):420-8.
20. Brentani MM, Carvalho CR, Saldiva PH, Pacheco MM, Oshima CT. Steroid receptors in pulmonary lymphangiomyomatosis. *Chest.* 1984;85(1):96-9.
21. Johnson SR, Tattersfield AE. Decline in lung function in lymphangiomyomatosis: relation to menopause and progesterone treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(2):628-33.
22. Eliasson AH, Phillips YY, Tenholder MF. Treatment of lymphangiomyomatosis. A meta-analysis. *Chest.* 1989;96(6):1352-5.
23. Taveira-DaSilva AM, Stylianou MP, Hedin CJ, Hathaway O, Moss J. Decline in lung function in patients with lymphangiomyomatosis treated with or without progesterone. *Chest.* 2004;126(6):1867-74.
24. Baldi BG, Medeiros Jr P, Pimenta SP, Lopes RI, Kairalla RA, Carvalho CRR. Evolução da função pulmonar após tratamento com goserelina em pacientes com linfangioleiomiomatose. *J Bras Pneumol.* 2011;37(3):375-9.
25. Harari S, Cassandro R, Chiodini I, Taveira-DaSilva AM, Moss J. Effect of a gonadotrophin-releasing hormone analogue on lung function in lymphangiomyomatosis. *Chest.* 2008;133(2):448-54.
26. Cohen MM, Freyer AM, Johnson SR. Pregnancy experiences among women with lymphangiomyomatosis. *Respir Med.* 2009;103(5):766-72.
27. Morales JP, Georganas M, Khan MS, Dasgupta P, Reidy JF. Embolization of a bleeding renal angiomyolipoma in pregnancy: case report and review. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2005;28(2):265-8.
28. Boehler A, Speich R, Russi EW, Weder W. Lung transplantation for lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med.* 1996;335(17):1275-80.
29. Almoosa KF, Ryu JH, Mendez J, Huggins JT, Young LR, Sullivan EJ, et al. Management of pneumothorax in lymphangiomyomatosis: effects on recurrence and lung transplantation complications. *Chest.* 2006;129(5):1274-81.
30. Pollock-BarZiv S, Cohen MM, Downey GP, Johnson SR, Sullivan E, McCormack FX. Air travel in women with lymphangiomyomatosis. *Thorax.* 2007;62(2):176-80.
31. Taveira-DaSilva AM, Hedin C, Stylianou MP, Travis WD, Matsui K, Ferrans VJ, et al. Reversible airflow obstruction, proliferation of abnormal smooth muscle cells, and impairment of gas exchange as predictors of outcome in lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(6):1072-6.

32. Hayashi T, Fleming MV, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Moss J, Ferrans VJ, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM). *Hum Pathol.* 1997;28(9):1071-8.
33. Matsui K, Takeda K, Yu ZX, Travis WD, Moss J, Ferrans VJ. Role for activation of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of pulmonary lymphangiomyomatosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(2):267-75.
34. Pimenta SP, Baldi BG, Acencio MMP, Kairalla RA, Carvalho CRR. Doxíciclina em pacientes com LAM: estudo clínico avaliando segurança e eficácia no bloqueio de metaloproteínas *J Bras Pneumol.* 2011;37(4):424-30.
35. Moses MA, Harper J, Folkman J. Doxycycline treatment for lymphangiomyomatosis with urinary monitoring for MMPs. *N Engl J Med.* 2006;354(24):2621-2.
36. Glasgow CG, Steagall WK, Taveira-Dasilva A, Pacheco-Rodriguez G, Cai X, El-Chemaly S, et al. Lymphangiomyomatosis (LAM): molecular insights lead to targeted therapies. *Respir Med.* 2010;104 Suppl 1:S45-58.
37. Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, et al. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med.* 2008;358(2):140-51.
38. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, et al. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med.* 2011;364(17):1595-606.