



■ Artículo original

# Expresión de la interleucina (IL-10) con función inmunorreguladora en mucosa de pacientes con colitis ulcerosa crónica idiopática

Fonseca-Camarillo G,<sup>1</sup> Furuzawa-Carballeda J,<sup>2</sup> Martínez-Benítez B,<sup>3</sup> Barreto-Zúñiga R,<sup>4</sup> Yamamoto-Furusho K<sup>1</sup>

- 1 Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Departamento de Gastroenterología.
  - 2 Departamento de Reumatología e Inmunología.
  - 3 Departamento de Anatomía Patológica.
  - 4 Departamento de Endoscopia.
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México, D. F.

Recibido el 15 de diciembre de 2010; aceptado el 30 de marzo de 2011

■ Resumen

**Introducción:** La IL-10 es una importante citocina inmunorreguladora que actúa en las células presentadoras de antígeno mediante la inhibición tanto de la síntesis de citocinas como de moléculas co-estimuladoras y moléculas HLA clase II.

**Objetivo:** Determinar la expresión génica y proteica de interleucina 10 (IL-10) en mucosa de pacientes con colitis ulcerativa crónica idiopática (CUCI).

**Métodos:** Se estudiaron 40 pacientes con CUCI confirmado por histopatología y 18 controles sanos que no presentaran ningún tipo de colitis

**Palabras clave:** Citocinas, interleucina 10, colitis ulcerativa, reacción en cadena de polimerasa, inmunohistoquímica, México.

■ Abstract

**Background:** Interleukin-10 (IL-10) is an important immunoregulatory cytokine that acts on antigen presenting cells by the inhibiting both the synthesis of cytokines, co-stimulatory and HLA class II molecules.

**Objective:** To study the gene and protein expression of IL-10 in the mucosa from patients with ulcerative colitis (UC). **Methods:** We studied 40 patients with UC and 18 controls without endoscopic evidence of intestinal inflammation. From rectal biopsies was determined the gene expression of IL-10 by real time polymerase chain

**Keywords:** Cytokines, interleukin-10, ulcerative colitis, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, Mexico.

(infecciosa, posradiación, isquémica). A partir de las biopsias de mucosa rectal se extrajo el ácido ribonucleico (ARN) total, se obtuvo ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena complementaria mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la cuantificación relativa de la expresión se realizó a través de PCR en tiempo real para el gen de IL-10.

**Resultados:** Los pacientes con CUCI en remisión presentaron de manera significativa mayor expresión del gen IL-10 en la mucosa comparado con el grupo de pacientes con CUCI activo ( $p = 0.01$ ) y con el grupo control ( $p = 0.05$ ). Todos los pacientes con CUCI activo presentaron pancolitis, mientras que de los pacientes en remisión de inflamación distal, 16 presentaron mayor frecuencia de manifestaciones extra intestinales y 23 un cuadro activo con inflamación de leve a moderada y posteriormente inactivo con menos de una recaída al año. Conclusiones: La expresión proteica y del gen de IL-10 está aumentada en la mucosa colónica de pacientes con CUCI en remisión, lo cual confirma que es una citocina inmunorreguladora que favorece la remisión en pacientes con CUCI.

*reaction (PCR). The detection of the protein in tissue was performed by immunohistochemistry.*

**Results:** patients with UC in remission had significantly higher expression of il-10 gene in mucosa compared to the group of patients with active UC ( $p = 0.01$ ) and the control group ( $p = 0.05$ ). All patients with active UC had pancolitis, while patients in remission from distal inflammation, 16 had extra-intestinal manifestations and 23 had mild to moderate inflammation with less than one relapse within a year. Patients with UC in remission had significantly higher expression of IL-10 gene in mucosa compared with the group of patients with active UC ( $p = 0.01$ ) or the control group ( $p = 0.05$ ).

**Conclusions:** The expression of IL-10 gene is increased in colonic mucosa from patients with UC in remission, confirming that it is an immunoregulatory cytokine that promotes remission in patients with UC.

## ■ Introducción

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) incluye la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI) y la enfermedad de Crohn (EC) que son padecimientos autoinmunes crónicos. Si bien la etiología de la EII aún se desconoce, se han involucrado varios factores genéticos, ambientales e inmunológicos que contribuyen en su patogénesis.<sup>1</sup> En el desarrollo de la EII, la pérdida de la tolerancia inmunológica es un componente fundamental.<sup>2</sup> En la CUCI existen trastornos en la regulación de la mucosa y del sistema inmunológico propiciando una respuesta pro-inflamatoria a los componentes intraluminales generando autoinmunidad a los antígenos de la mucosa colónica, por lo que se ha observado incremento de los mediadores bioquímicos pro-inflamatorios como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  así como

disminución de mediadores anti-inflamatorios tales como el TGF- $\beta$ , la IL-4 y la IL-10.<sup>3</sup>

A nivel de la barrera intestinal es poco lo que se sabe, mientras que a nivel inmunológico, se han señalado evidencias de que el factor desencadenante puede ser una respuesta exagerada frente a la microbiota intestinal generándose un proceso de hipersensibilidad aunque también se sugiere el proceso contrario (hiposensibilidad) frente a la misma. Al respecto, diferentes estudios han encontrado evidencias para ambas condiciones, aunque siempre en combinación con predisposición genética y con factores ambientales.<sup>3</sup>

Cabe resaltar que las distintas moléculas que participan en la inmunobiología de la CUCI son fundamentales para el desarrollo de esta enfermedad: moléculas de adhesión, quimiocinas, citocinas

y sus receptores, son las principales señales en esta compleja red celular que parece darse como respuesta a la incapacidad del organismo para defenderse adecuadamente ante el daño y a otros factores, como la disbiosis. En la CUCI se pierde la capacidad de regulación de la producción y la función de las células características de los procesos de inflamación crónica, las cuales acumulan una memoria dañina para el organismo.

La interleucina (IL-10) es una importante citocina inmunorreguladora que actúa en las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos y células T) mediante la inhibición tanto de la síntesis de citocinas como de moléculas co-estimuladoras y moléculas HLA clase II.<sup>4-5</sup> Asimismo, actúa directamente en la proliferación y diferenciación de las células T responsables de la respuesta inmune tipo Th2 característica de la CUCI y los tipos Th1 y Th17 presentes en la enfermedad de Crohn. Existen estrategias en el tratamiento de la EII que incluyen la administración de IL-10 recombinante y microesferas de gelatina que contienen IL-10.<sup>4</sup>

El objetivo del presente trabajo es determinar la expresión génica y proteica de la IL-10 en la mucosa intestinal de pacientes con CUCI, en las diferentes condiciones de la enfermedad (actividad y remisión) y compararla con controles. Además, determinar la asociación de la expresión génica con el grado de actividad histológico y endoscópico de la enfermedad con algunas variables clínicas.

## ■ Métodos

**Pacientes:** Se realizó un estudio prospectivo de casos y controles que incluyó un total de 40 casos con CUCI (25 activos y 15 en remisión) y 18 controles sin datos clínicos ni endoscópicos de inflamación intestinal o de alguna otra enfermedad sistémica (cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad diverticular, colitis medicamentosa, colitis pos-radiación, colitis infecciosa, colitis isquémica). Los controles fueron individuos que acudieron por pérdida de peso y anemia en estudio. Todos los sujetos con CUCI pertenecen a la Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y firmaron su consentimiento informado antes de participar en el estudio. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del INCMNSZ. La evaluación de la actividad de CUCI

en la mucosa se basó en hallazgos endoscópicos e histológicos, según la puntuación MAYO e índice de Riley<sup>6</sup> respectivamente (**Tabla 1**). El diagnóstico de CUCI se confirmó por criterios histopatológicos.

**Tejido:** Para la cuantificación de la expresión génica de IL-10 se obtuvieron 58 biopsias de mucosa rectal. Las biopsias de intestino se colocaron en tubos crioviales con 1 mL de preservador de ácidos nucleicos (RNA later®), se mantuvieron a temperatura ambiente por un periodo de seis a ocho horas, posteriormente fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de la extracción del ácido ribonucleico (ARN).

**Extracción de ARN total:** A partir de las biopsias de recto se obtuvo el ARN total empleando un kit de extracción de ARN (High Pure RNA Tissue Kit, Roche) según la metodología sugerida por el fabricante. Las biopsias se mezclaron usando el homogeneizador durante un minuto con amortiguador de lisis, se lavó con etanol al 100%, empleando las columnas de purificación, se centrifugó la mezcla a 13 000 xg durante 15 segundos, lavándose con amortiguador de lavado a 13 000 xg durante 15 segundos, finalmente se agregó 100 µL de *elution buffer* para diluir el ARN total.

**Transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real:** El ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena complementaria se obtuvo por transcripción reversa. La reacción se llevó a cabo con 20 µL de la siguiente forma: Preincubación: 25°C por 10 minutos, incubación: 55°C por 30 minutos, seguida de la desnaturalización: 85°C por cinco minutos en un termociclador (Perkin-Elmer).

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó empleando como sustrato el ADN complementario que resultó de la retrotranscripción. Para la amplificación de las regiones de interés, la reacción fue llevada a cabo en 10 µL. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: un programa de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos de amplificación (95°C-10 segundos, alineación 60°C 10 segundos, extensión 40°C 30 segundos) y un ciclo de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos. Para determinar la expresión relativa del gen IL-10 y GAPDH (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, como gen de referencia) se utilizó el termociclador (Light Cycler 2.0 Roche®) empleando ensayos validados en nuestro laboratorio para la cuantificación (reproducibilidad y linealidad), con iniciadores sentido y antisentido

■ **Tabla 1.** Índices de actividad endoscópica e histológica.

Índices de actividad endoscópica e histológica			
Actividad Endoscópica (MAYO) (Características macroscópicas)		Actividad Histológica (Riley) (Características microscópicas)	
0	Normal	0	Normal
1	Leve: Eritema leve, disminución del patrón vascular.	1	Incremento del infiltrado inflamatorio crónico (linfocitos y células plasmáticas), no hay destrucción del tejido.
2	Moderado: Sangrado al ligero contacto.	2	Incremento importante del infiltrado inflamatorio, no hay destrucción del tejido.
3	Grave: Sangrado espontáneo y ulceraciones	3	Incremento abundante del infiltrado inflamatorio, destrucción del tejido.

de Invitrogen® y sondas Taq Man para cada gen (Universal Probe Library Set, Human de Roche®); como se muestra en la **Tabla 2**.

**Inmunohistoquímica:** La detección de IL-10 *in situ* en tejido intestinal se realizó por inmunohistoquímica por el método de la peroxidasa y avidina-biotina con anticuerpos específicos (Santa Cruz, CA). Se eliminó la parafina de las muestras de tejido intestinal en el horno a 54°C durante 45 min y se hidrataron en xileno, alcohol al 100%, alcohol al 96%, alcohol al 50% y agua destilada durante tres minutos y en agitación. Posteriormente las laminillas se incubaron con una solución de peróxido al 3% en metanol absoluto (1:9 volumen/volumen) durante 20 minutos, para eliminar la actividad de peroxidasa endógena. Los sitios de pegado inespecífico se bloquearon con anticuerpos provenientes del Kit ABC *staining system* (Santa Cruz, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los tejidos se incubaron

por 24 horas a 4°C con el anticuerpo monoclonal IgG<sub>2b</sub> de ratón anti IL-10 humana (Santa Cruz, CA) diluido a una concentración de 10 µg/mL en albúmina al 3%.

Los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario biotinado correspondiente durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se empleó el complejo avidina-peroxidasa, con el que se incubó por una hora a temperatura ambiente. La reacción se desarrolló empleando una solución de 6 mg de diaminobencidina en 10 mL de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6 y 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 10 minutos. Esta reacción produjo un precipitado de color sepia en las células inmunoreactivas. Las muestras se contra-tiñeron con hematoxilina de Harris y se deshidrató el tejido con alcohol al 96%, alcohol absoluto, solución de alcohol absoluto/xileno (vol/vol), xileno y se montaron con resina. Para el control negativo, se sustituyó el anticuerpo primario por uno no relacionado, mientras que para el blanco de reactivos el anticuerpo primario se sustituyó por albúmina. Las laminillas fueron analizadas a 160 y 320 aumentos.

**Análisis estadístico:** Se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 17.0. La comparación de los datos de grupos independientes se analizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. La asociación de la expresión génica de IL-10 con las variables clínicas se realizó con la correlación de Spearman y se consideró como significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## ■ Resultados

Se estudiaron un total de 40 pacientes con CUCI (14 hombres y 26 mujeres con una edad media de 41 años) y 18 controles (10 hombres y ocho mujeres con una edad media de 44 años). Las características clínicas y demográficas se presentan en la **Tabla 3**.

**Expresión del gen de IL-10 en mucosa y detección de la proteína en pacientes con CUCI y controles:**

■ **Tabla 2.** Iniciadores de los genes empleados en la PCR en tiempo real.

GEN	INICIADOR SENTIDO	INICIADOR ANTISENTIDO	Sondas de Universal Probe Library Set, de ROCHE
IL-10	5'cataaattagaggtctccaaaatcg3'	3'aaggggctgggtcagctat5'	Sonda N°45
GAPDH	5agccacatcgctcagacac'3'	3'gcccaatagaccaaattcc'5'	Sonda N° 60

■ **Tabla 3.** Características demográficas y clínicas de los pacientes con CUCI.

	Control N = 18	CUCI remisión N = 15	CUCI activa N = 25
<b>Edad promedio</b>	44.30	41.86	39.65
<b>Sexo</b>			
Femenino	8	9	17
Masculino	10	6	8
<b>Tratamiento</b>			
5-ASA		15	25
Prednisona			8
Azatioprina			4
<b>Curso Clínico</b>			
-Cuadro inicial activo y después inactivo.		9	6
-Actividad intermitente leve <1 recaída/año.		6	14
-Actividad intermitente intensa >1 recaída/año.		--	2
-Actividad continua (refractario a tratamiento).		--	3
<b>Extensión</b>			
Pancolitis		8	16
Distal		7	9
<b>Manifestaciones extraintestinales</b>			
Presente		4	11
Ausente		11	14
<b>Respuesta al tratamiento</b>			
Si		13	14
No		2	11

La expresión génica de IL-10 fue mayor en mucosa rectal de pacientes con CUCI remisión en comparación con los pacientes con CUCI activo ( $p = 0.001$ ) y con el grupo control ( $p = 0.05$ ). Además, se observó diferencia significativa en los pacientes con CUCI en remisión comparado con el grupo control ( $p = 0.005$ ) (**Figura 1**).

Las biopsias de los pacientes con CUCI presentaron infiltrados inflamatorios abundantes, predominantemente de células mononucleares, los cuales se extendían desde la capa serosa hasta la mucosa, siendo más abundantes en el epitelio y en la serosa. En todos los casos se observó una destrucción importante de la mucosa.

En lo referente a la producción de la proteína de IL-10, se observó una correlación histomorfológica de la síntesis de esta citocina con las células mononucleares, predominantemente de estirpe

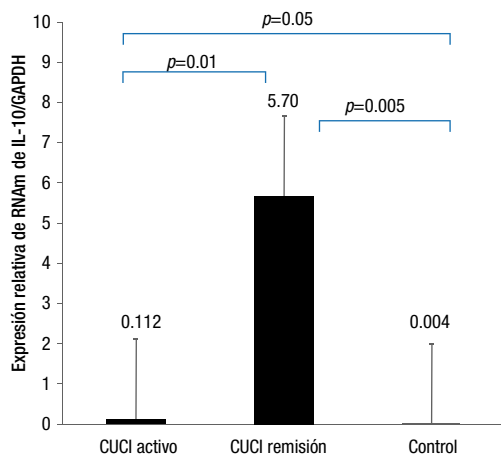
macrofágica, siendo incipiente en los linfocitos, no sólo de infiltrados perivasculares, sino también de los distribuidos en el parénquima principalmente en los sitios de ulceración en la lámina propia (**Figura 2**).

*Asociación de la expresión de IL-10 y las características clínicas:* Todos los pacientes con CUCI activo presentaron pancolitis, mientras que los pacientes en remisión inflamación distal, 16 presentaban mayor frecuencia de manifestaciones extra intestinales y 23 tenían un cuadro activo con inflamación de leve a moderada y posteriormente inactivo con menos de una recaída al año.

## ■ Discusión

En el presente trabajo se demostró que la expresión génica y proteica de IL-10 están aumentadas en mucosa de pacientes con CUCI en remisión al compararse con CUCI activo y los controles sin inflamación.

■ **Figura 1.** Los pacientes con CUCI en remisión presentaron de manera significativa mayor expresión del gen IL-10 en la mucosa comparado con el grupo de pacientes con CUCI activo y grupo control.



Los hallazgos obtenidos de la expresión del gen de IL-10 en los diferentes grupos de estudio, mostró que la expresión en biopsias de recto en pacientes con CUCI en remisión estuvo aumentada comparada con CUCI activo y el grupo control sano.

La interleucina-10 aumenta su expresión en el grupo en remisión debido a que es una citocina con efecto anti-inflamatorio en el intestino, posee propiedades anti-inflamatorias ya que inhibe tanto la presentación de antígenos y la posterior liberación de citocinas pro-inflamatorias.<sup>7</sup> El papel de la IL-10 en el sistema inmunitario de las mucosas ha sido ampliamente estudiado, en ratones knockout para la IL-10 los cuales desarrollaron enterocolitis crónica y la administración de IL-10 previno su aparición.<sup>8</sup> Si la IL-10 se administra cuando la enfermedad, está establecida, se produce mejoría del cuadro pero no la curación completa. Al suprimir la expresión del gen de la IL-10 en estos ratones genera un aumento en la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$ .<sup>9, 10</sup>

Nuestros hallazgos confirman los resultados obtenidos por Melgar y colaboradores<sup>11</sup> que reportaron un aumento muy significativo en la expresión génica de IL-10 en los linfocitos T y células positivas a IL-10 en colon de pacientes con CUCI.

La disminución en la expresión génica de IL-10 en el grupo de los pacientes con CUCI activo

■ **Figura 2.** Expresión de la IL-10 en el tejido intestinal de pacientes con CUCI activo y controles. A. Muestra representativa de un control a 160X. B. Tejido del mismo control a un aumento de 320X. C. Muestra de un paciente con CUCI a 160X. El infiltrado inflamatorio crónico se encuentra constituido principalmente por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. D. Tejido del mismo paciente a 320X. Las flechas señalan las células inmunorreactivas a IL-10 presentes en la mucosa. E. Muestra representativa de un paciente con CUCI a 160X. F. Tejido del mismo paciente a 520X. Las flechas señalan las células perivasculares productoras de IL-10.



podría explicarse por el hecho de que existe una disminución en las poblaciones de células específicas, tales como células epiteliales o T reguladoras, una respuesta anormal a estímulos específicos, o una disminución de la afinidad de la IL-10 a sus receptores.

Otras células reguladoras que pueden participar en la inmunopatogénesis de la CUCI a través de la producción de IL-10 es un subtipo de células B (Bregs).<sup>12</sup> Mizoguchi y colaboradores<sup>13</sup> demostraron que las células B pueden ser responsables de la supresión inmunológica por mecanismos que incluyen a la IL-10 y TGF- $\beta$ 1 en la EII.

El descubrimiento de receptores para la IL-10 en las células entéricas ha planteado la posibilidad de utilizar esta interleucina por vía tópica, ya que de esta forma se lograría aumentar sus concentraciones en la mucosa colónica y mejorar su eficacia.<sup>6</sup> En animales de experimentación, la administración de IL-10 en forma de enemas (mediante un vector adenoviral o contenida en microesferas de gelatina) ha mostrado resultados alentadores.<sup>4</sup>

Por otro lado, se ha estudiado que la IL-22 es un miembro de la familia de IL-10 que posee propiedades inmunorreguladoras, en los pacientes con CUCI activo se observa un incremento en la

expresión del gen de IL-22, dicho incremento se explica como un mecanismo inmunorregulador ya que induce la restitución del epitelio intestinal por la producción aumentada de moco por las células calciformes.<sup>14</sup>

Un mayor conocimiento de los mediadores implicados en la inflamación intestinal ha abierto nuevas líneas de investigación basadas en la manipulación de la respuesta inmunitaria con fines terapéuticos, como son la administración de IL-10, que es una citocina anti-inflamatoria, cuando ésta se administra, produce una mejoría del cuadro pero no la cura; sin embargo, el descubrimiento de receptores para IL-10 en las células entéricas ha planteado la posibilidad de utilizar esta interleucina por vía tópica, ya que de esta forma se lograría aumentar sus concentraciones en la mucosa colónica y mejorar su eficacia.

Este tipo de estudios básicos permite identificar marcadores bioquímicos de inflamación para su aplicación en clínica y su potencial uso, en la administración de terapias biológicas. En este trabajo se confirman observaciones previas de la función inmunorreguladora de la IL-10 y se apoya un aspecto en la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria con potencial terapéutico. El diseño sólo permite confirmar este hecho en CUCI ya que aún no ha sido explorada en otros tipos de colitis. Por lo anterior, es importante considerar el papel que pueden desarrollar citocinas con propiedades inmunorreguladoras en las diferentes condiciones de enfermedad (actividad y remisión), con el fin de desarrollar nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos.

## ■ Conclusión

La expresión génica y proteica de IL-10 está aumentada en la mucosa colónica de pacientes con CUCI en remisión, lo cual confirma que es una citocina inmunorreguladora que favorece la remisión en pacientes con CUCI.

## Referencias

1. Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:5577-5580.
2. Podolsky, D. K. Inflammatory Bowel Disease. *N England J Med* 2002;347:417-429.
3. Cho J H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2008;8:458-466.
4. Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004;10:620-5.
5. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, et al. Comparison of delayed-release 5-aminosalicylic acid (mesalazine) and sulfasalazine as maintenance treatment for patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1988;94:1383-1389.
6. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 2009;361:2033-45.
7. Sánchez-Muñoz F, Domínguez-López A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:4280-4288.
8. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1073-1083.
9. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-274.
10. Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10<sup>-/-</sup>) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G829-G833.
11. Melgar S, Yeung MM, Bas A, et al. Overexpression of interleukin 10 in mucosal T cells of patients with active ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003;134:127-137.
12. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006;176:705-710.
13. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 2002;16:219-230.
14. Yamamoto-Furusho JK, Miranda-Pérez E, Fonseca-Camarillo G, et al. Colonic epithelial upregulation of Interleukin 22 in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1823.