

As alterações fisiológicas do glúten em indivíduos celíacos

The physiological alteration of gluten in celiac individuals

La alteración fisiológica del gluten en celíacos

Cristiane Metzker Santana de Oliveira¹, Laís Cabral Crisóstomo², Sandy Sales Bomfim².

RESUMO

Objetivo: Analisar as repercussões gástricas em celíacos que se alimentam a base de glúten, entender o mecanismo do glúten em indivíduos celíacos, identificar o desenvolvimento de processos alérgicos em pessoas celíacas que utilizam o glúten na alimentação e citar os medicamentos que podem conter glúten e o impacto na vida de celíaco. **Revisão bibliográfica:** É notório como a doença interfere na vida de celíacos, pois é a doença intestinal crônica mais comum tendo o glúten presente na maior parte das refeições. Além dos sintomas mais comuns, como dor abdominal, diarreia e vômito, medicamentos com excipientes com gliadina podem interferir na dieta restrita a glúten. **Considerações finais:** O glúten é um vilão para pessoas com doença celíaca, o mais comum são as repercussões gástricas relacionadas com alterações gastrointestinais que o glúten causa na vida desses indivíduos, por isso é de suma importância uma dieta rigorosa.

Palavras-chave: Glúten, Celíaco, Doença Celíaca, Repercussões Gástricas, Alergia.

ABSTRACT

Objective: To analyze the gastric repercussions in celiac people who eat gluten, understand the mechanism of gluten in celiac individuals, identify the development of allergic processes in celiac people who use gluten in their diet and cite the medications that may contain gluten and the impact on the life of celiac. **Bibliographic review:** It is notorious how the disease interferes in the lives of celiac patients, as it is the most common chronic intestinal disease, with gluten present in most meals. In addition to the more common symptoms, such as abdominal pain, diarrhea, and vomiting, medications with gliadin excipients can interfere with a gluten-restricted diet. **Final considerations:** Gluten is a villain for people with celiac disease, the most common are the gastric repercussions related to gastrointestinal changes that gluten causes in the lives of these individuals, so a strict diet is of paramount importance.

Keywords: Gluten, Celiac, Celiac Disease, Gastric Repercussions, Allergy.

RESUMEN

Objetivo: Analizar las repercusiones gástricas en celíacos que ingieren gluten, comprender el mecanismo del gluten en celíacos, identificar el desarrollo de procesos alérgicos en celíacos que utilizan gluten en su dieta y citar los medicamentos que pueden contener gluten y la repercusión en la vida del celíaco. **Revisión bibliográfica:** Es notorio cómo la enfermedad interfiere en la vida de los celíacos, ya que es la enfermedad intestinal crónica más común, con gluten presente en la mayoría de las comidas. Además de los síntomas más comunes, como dolor abdominal, diarrea y vómitos, los medicamentos con excipientes de gliadina pueden interferir con una dieta restringida en gluten. **Consideraciones finales:** El gluten es un villano para las personas celíacas, las más comunes son las repercusiones gástricas relacionadas con los cambios

¹ Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador – BA.

² Universidade Salvador (UNIFACS), Salvador – BA.

gastrointestinales que el gluten provoca en la vida de estos individuos, por lo que una dieta estricta es de suma importancia.

Palabras-clave: Gluten, Celíaco, Enfermedad Celíaca, Repercusiones Gástricas, Alergia.

INTRODUÇÃO

Em 1888, Samuel Gee, um reconhecido médico teve uma abordagem onde contribuiu e deu início para os estudos sobre a doença celíaca, onde descreveu a doença, compreendeu sobre os sinais e sintomas da mesma e colaborou para o avanço dos estudos (ORTIGOSA DEL CASTILLO L, 2008). A descoberta do glúten foi em 1728, pelo professor de Química, Jacopo Bartholomew Beccari. Por meio do ato de lavar à mão a uma massa de farinha, percebeu-se que era um material gelatinoso, com propriedades físicas únicas e não conseguia se misturar a água (FLORES RV, 2014).

O glúten foi estudado em 1823 por Osborne e Voorhees, que desenvolveram o procedimento de fracionamento que usamos hoje. Usando quatro solventes no sistema clássico, as proteínas do glúten são divididas em quatro frações correspondentes a albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, com base em sua solubilidade em cada solvente (FLORES RV, 2014). Por Balls e Hale (1936), a degradação do glúten foi descrita após a adição de agentes redutores, o que possibilitou a compreensão do glúten. Com cisteína e glutatona presentes, os autores examinaram como a integridade do glúten pode ser perdida (FLORES RV, 2014).

As proteínas que compõem o glúten podem se unir de acordo com a solubilidade ou massa molecular (MM). Na primeira categoria encontram-se as prolaminas caracterizadas por serem solúveis em soluções alcólicas essas proteínas monoméricas possuem uma grande quantidade de prolina, ainda nessa categoria constam as proteínas poliméricas insolúveis, as gluteínas. As prolaminas variam de acordo com o tipo de grão, exemplificando, no trigo vemos gliadinas, no centeio encontramos secalinas, na cevada, hordeínas (CICLITIRA P, et al., 2005).

Há 10.000 anos com o início da agricultura, ocorreu a introdução de grãos contendo glúten. A partir disso, criou-se circunstâncias para efemeridades humanas referentes à exposição ao glúten, tendo alergia ao trigo e doença celíaca conciliadas pelo sistema imunológico adaptativo e se tornando as mais conhecidas (SAPONE A, et al., 2012).

De início, a Doença Celíaca (DC) era considerada como um distúrbio infantil raro devido ao fato de ter um diagnóstico reduzido a sintomas gastrointestinais juntamente com validação por biópsia no intestino delgado. Como o glúten está presente em quase todas as refeições, indivíduos que portam a Doença Celíaca e fazem o uso dele em sua dieta acabam sofrendo com as consequências (SOUSA DE, 2015).

O glúten é uma proteína, formada por dois grupos proteicos: a gliadina e a glutenina é encontrada em cereais, como a cevada, o trigo, o malte e o centeio. Nele certifica-se a plasticidade, elasticidade, adesividade, consentindo a qualidade e desenvolvimento de um bolo, por exemplo (FLORES RV, 2014). As gliadinas (cadeia simples) e gluteninas (cadeias ramificadas) são polímeros naturais sintetizados pela condensação de aminoácidos, sendo gerado por um grupo amina e um grupo carboxílico. A gliadina tem atribuição pela viscosidade e consistência das massas, porém apontam pouca resistência à extensão. Já as gluteninas tem a responsabilidade pela firmeza, força e extensibilidade da massa (FLORES RV, 2014).

Como doença multifatorial, a DC é caracterizada por inflamação crônica no intestino em reação do consumo de glúten. Isso leva à inflamação intestinal, perda de vilosidades intestinais e, portanto, uma maior capacidade de absorção de nutrientes devido a uma combinação de genética, ambiente e imunidade (CASTILHOS A, et al., 2015).

Faz-se como característica de uma pessoa celíaca não portar enzima peptidase, que tem por função quebrar o glúten em seu corpo. Desta forma, ocasiona a resposta autoimune no intestino delgado as próprias proteínas, a partir do momento em que induzem uma inflamação quando ligados às células T. Sem importar-

se com sexo e faixas etárias essa doença autoimune obteve uma maior incidência nos últimos tempos, acometendo cerca de 1% da população mundial (BINICIER OB e TOSUN F, 2020). De uma forma mais resumida e técnica, a existência de indivíduos celíacos é categorizada por uma forte associação genética com o alótipo MHC-II e cerca de 95% dos pacientes portadores de alótipos HLA- DQ2, e os 5% restantes carregando HLA-DQ8. Pacientes com DC não tratados apresentam expressão mucosa aumentada de interferon (IFN)-gama, que é classicamente medicado por TH1 (NEJAD ROSTAMI M, 2015).

Alguns dos efeitos gástricos mais frequentes em celíacos que se alimentam a base de glúten são: inchaço, dor abdominal e diarreia crônica, além do fator emocional que alteram o estado psicológico e a qualidade de vida dos indivíduos celíacos. O diagnóstico e tratamento oportunos podem prevenir complicações como desnutrição, infertilidade, câncer e osteoporose (CASTILHOS A, et al., 2015). Para além dos efeitos gástricos, existe uma sucessibilidade para o indivíduo celíaco que está relacionada a uma associação positiva entre a presença de DC e o desenvolvimento de dermatite atópica e asma que pode ser esclarecida pela existência de um fundo genético comum (CABRERA CM, 2022).

No que se refere a pessoas celíacas que utilizam glúten na alimentação, o desenvolvimento de processos alérgicos pode ser expresso como mais uma consequência de quem mantém essa proteína em sua dieta. A exemplo, a Dermatite Herpetiforme (DH), ou doença de Duhring Brocq que ganha destaque, é um processo alérgico que afeta cerca de 15 e 25 % destes doentes sendo constituída por uma manifestação cutânea (FARINHA S, et al., 2018).

Uma doença inflamatória associada à hipersensibilidade ao glúten, a dermatite herpetiforme ocorre como uma doença rara, recorrente, benigna, crônica, inflamatória. A doença é caracterizada por erupções cutâneas intensamente pruriticais, cíclicas, pápulas eritêmicas, vesículas ou bolas tensas ao redor das superfícies extensoras (FARINHA S, et al., 2018). Até os dias atuais a dieta isenta de glúten acaba sendo o tratamento mais eficaz e mais utilizado por pessoas celíacas. Apesar dos seus benefícios quando aderida a dieta, o tratamento afeta na qualidade de vida e pode desencadear um desequilíbrio entre os nutrientes de que o corpo precisa e os nutrientes que o corpo obtém. Ademais, ainda há preocupação em relação a contaminação cruzada que pode ocorrer em produtos alimentícios (SOUSA DE, 2015).

Este artigo teve como objetivo geral abordar e compreender as alterações fisiológicas em indivíduos celíacos. Dentre seus objetivos específicos, temos: entender o mecanismo do glúten em indivíduos celíacos; analisar as repercussões gástricas em celíacos que se alimentam a base de glúten; identificar o desenvolvimento de processos alérgicos em pessoas celíacas que utilizam glúten na alimentação; citar os medicamentos que podem conter glúten e o impacto na vida de celíacos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sendo considerada como doença intestinal crônica mais frequente que existe atualmente, a doença celíaca caracterizada como patologia multissistêmica do mecanismo imunológico, eclodida pelo glúten, tem como foco indivíduos geneticamente suscetíveis. Com prevalência elevada e sintomas muito variados é expressa por indicativos tanto digestivos quanto extra digestivos (JIMENEZ ORTEGA AI, et al., 2016).

Com a capacidade de estimular uma resposta imune em pessoas com DC (doença celíaca), o termo “glúten” compete a todos os pró-mineiros, que são caracterizados por elevados níveis de resíduos de prolina e glutamina (JIMENEZ ORTEGA AI, et al., 2016).

As características histológicas típicas associadas a doença se desenvolvem na pequena mucosa intestinal, representando um acréscimo de linfócitos intraepiteliais, achatamento do vili intestinal, hiperplasia cripta e uma importante infiltração de células inflamatórias (WAHAB P, et al., 2002).

A expressão da doença celíaca depende estritamente de dois fatores, sendo eles: ambientais, que envolvem o contato do sujeito ao glúten e proteínas similares e genético (genes HLA e não-HLA) (LANDAETA N, et al., 2008).

No início a doença celíaca foi classificada como enteropatia, em virtude de sintomas caracterizados como

problemas intestinais. Todavia, com os avanços da medicina e dos métodos de diagnóstico, descobriu-se que, para além dos sinais e sintomas intestinais, surgem anticorpos serológicos IgA, denominada anti-transglutaminase tecidual, bem como anticorpos anti-endomísio e anti-gliadina. Devido a esta descoberta, a DC deixou de ser apenas uma doença intestinal e passou a ser considerada uma doença sistêmica imunomediada (WIESER e KOEHLER, 2008).

O risco de adquirir DC está motivado a peptídeos específicos do glúten que estão presentes nas células T CD4+ desempenharão um papel importante no desenvolvimento da DC posteriormente e dependerão dos riscos de alótipo que estão presentes, incluindo o DQ7.5. Além disso, outros fatores de risco HLA e/ou não-HLA podem contribuir para a herdabilidade da DC e modular o risco observado (MARTINEZ-OJINAGA E, et al., 2018).

Peptídeos de glúten desamidados às células CD4+T tornam-se uma preferência para heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8. A partir disso, manifesta-se a resposta imunológica que caracteriza a DC (MARTINEZ-OJINAGA E, et al., 2018).

Ainda não está claro como o glúten exerce seus efeitos tóxicos. Embora a molécula DQ2 tenha demonstrado ligar fragmentos de glúten (peptídeos gliadina) e apresentá-los aos linfócitos T CD4+, o principal mecanismo envolve essa ligação e apresentação. A molécula DQ2 estimula as células da mucosa intestinal e ativa a lise celular, além de desencadear eventos inflamatórios (com auxílio de citocinas pró-inflamatórias), bem como o desenvolvimento de autoanticorpos (com auxílio de células T auxiliares e células B) (LANDAETA N, et al., 2008).

Apresentando 3 tipos de manifestações clínicas, a doença celíaca pode ser classificada em: clássica ou típica, não clássica ou atípica e assintomática ou silenciosa. Um caso clássico apresenta diarreia, vômito, distensão abdominal, entre outros, enquanto um caso atípico apresenta sintomas extraintestinais na ausência de sintomas digestivos. A forma silenciosa não apresentava manifestações clínicas (RIBEIRO P, et al., 2017). Um estudo realizado em 33 pacientes com DH encaminhados ao gastroenterologista revelou uma alta frequência de queixas gastrointestinais e sistêmicas. Constatou-se na biópsia duodenal alterações em todos os pacientes, dentre as queixas mais frequentes relacionadas a problemas gastrointestinais, observou-se: distensão abdominal (78,8%), flatulência (75,7%) e refluxo gastroesofágico (51,5%) (SILVA KOTZE LM, et al., 2021).

Uma pesquisa feita com pacientes que utilizavam glúten na sua dieta foram acometidos à endoscopia digestiva alta com duas ou três biópsias do bulbo e quatro a cinco fragmentos da segunda porção da mucosa duodenal. Os resultados não diferiram com a idade ou sexo dos pacientes, porém todos apontaram enteropatia na biópsia duodenal (SILVA KOTZE LM, et al., 2021). A apresentação clássica da DC possui alguns sintomas específicos que englobam diarreia, formação de fezes volumosas, dor abdominal, inchaço e perda de peso. Além de outros sintomas que derivam principalmente da má digestão e má absorção associada à atrofia villosa intestinal. Entretanto, alguns indivíduos possuem outras sintomatologias (prisão de ventre, vômito recorrente ou azia) que, muitas vezes, tem seu diagnóstico confundido com uma desordem funcional ou síndrome do intestino irritável (THERRIEN A, et al., 2020).

Definida como ativação imunológica persistente, sintomas de má absorção e atrofia villosa a Doença Celíaca Refratária (DCR) possui dois tipos, o tipo 1 é caracterizado por ser indistinguível da doença celíaca ativa, já o tipo 2 possui células T aberrantes e reagrupamento do gene do receptor de células T clonal (THERRIEN A, et al., 2020).

Além de enfrentar deveras complicações, o alto risco de desnutrição é algo presente na vida de indivíduos com DCR. Para os que sofrem de DCR tipo 2 sangramentos gastrointestinais, obstrução ou perfuração como resultado de jejunita ulcerativa são manifestações clínicas frequentes. Estudos recentes comprovaram que paciente portadores de DCR (doença celíaca refratária) tratados com budesonida oral relatou que 72% tinham uma apresentação clássica (ou seja, diarreia) e 18% apresentaram dermatite herpetiformis (THERRIEN A, et al., 2020). Para o diagnóstico da Doença Celíaca é necessário uma biópsia do intestino delgado e os testes sorológicos são eficientes para constatar o início da DC. Os testes sorológicos demonstraram os seguintes

resultados: Crianças e adultos participaram de um estudo através de IgA-EMA e IgA-tTG e 90% apresentam sensibilidades e especificidades. Em adultos a especificidade combinada de EMA foi de 100% usando EMA-ME ou EMA-HU e, a especificidade combinada de tTG-GP e tTG-HR foi de 95% e 98%. Em crianças, a particularidade da EMA utilizando esses 2 substratos foi de 97% e 95% (ROSTOM A, et al., 2005). Como já relatado anteriormente o quadro clínico da doença celíaca é muito amplo tendo manifestações gastrointestinais mais evidentes, não anula a existência manifestações extraintestinais que devem levar a suspeita desta doença (RIBEIRO ME, 2018).

É de suma importância que profissionais, como gastroenterologistas, pediatras e internistas hajam de forma multidisciplinar, com o intuito de fazer um diagnóstico precoce das manifestações extraintestinais da DC, que podem ser dermatológicas, neurológicas, ginecologias, hematológicas e orais. Conseguem ligar-se à DC diabetes mellitus, doença de tireoide, dermatite herpetiforme, estomatite aftosa recorrente, alergias, entre outras reações (ROSTOM A, et al., 2005). Uma das manifestações da Doença Celíaca é a DH que afeta diretamente a pele, seus sintomas melhoram a partir da dieta sem glúten (DSG), tendo recaída se ingerido. Na doença celíaca o autoantígeno é a transglutaminase tecidual TG2, enquanto na Dermatite Hepertiforme é a transglutaminase epidérmica (TG3), porém as duas apresentam autoanticorpos específicos para TG2 no soro e na mucosa do intestino delgado pacientes com DH têm IgA-TG3 na pele (COLLIN P, et al., 2017).

Uma das características clínicas bucais de declaração da DC são os defeitos do esmalte dentário ou algumas lesões na mucosa oral, como glossite atrófica atraso na erupção dentária e estomatite aftosa recorrente. Foi determinado que os defeitos de esmalte dos dentes foram classificados de grau I a IV com base na classificação de Aine, mas atenção especial foi dada às características da hipoplasia do esmalte, como simetria e coerência cronológica, para determinar o atraso nas fases de formação do dente. Fotografias radiográficas e tabelas específicas de erupção dentária foram utilizadas para realizar este estudo (COSTACURTA M, et al., 2010).

Indivíduos que tem a DC, portam um estilo de vida um pouco diferente dos demais, referente a dieta isenta de glúten, presente na maioria dos pães, bolos, massas etc. Com tudo, o glúten pode estar presente como excipiente nas cápsulas, comprimidos e suspensões orais de medicamentos. Dois estudos publicados no século XX nos Estados Unidos da América (EUA), evidenciaram através da técnica "dot-blotting" com anticorpo policlonal presença de gliadina em medicamentos. Dos 59 medicamentos apresentados nos estudos, 71,2% apontaram gliadina em seus resultados. Também se mostrou presente no estudo realizado na Iugoslávia, representando cerca de 31,9% dos 47 medicamentos analisados. Recomendada pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) o método do inglês "Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay" (ELISA) para identificação de gliadina e as demais protalaminas utiliza do emprego do anticorpo monoclonal, apesar de existirem outras técnicas de identificação como, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) dessa proteína a ELISA continua sendo a mais utilizadas (SDEPANIAN VL, et al., 2001).

A partir de um outro estudo, utilizando o método ELISA, incluindo características como: nome comercial, laboratório farmacêutico, grupo farmacológico, componente ativo, forma de apresentação e resultado da análise quanto à presença de gliadina, 78 medicamentos foram colocados em análise. Tendo como resultado de detecção negativo caso inferior a 4 mg de gliadina/100 g de medicamento e positivo se superior. Constatou-se que apenas 1,3% positivaram para presença de gliadina. Com relação a saldo restante, não foi detectada a existência da proteína. Até os dias atuais, a presença de gliadina em medicamentos comercializados no Brasil não foi analisada por nenhum estudo, por isso é importante o médico saber se os medicamentos prescritos apresentam glúten em sua composição, muitas vezes a orientação é de evitar uso de comprimidos e cápsulas. Diante disso o acompanhamento farmacológico com pacientes celíacos é de suma importância, para evitar possíveis contaminação pelo glúten (SDEPANIAN VL, et al., 2001).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como exposto anteriormente, existem alguns aspectos relacionados as alterações fisiológicas em indivíduos celíacos que merecem um estudo mais aprofundado. Até o presente momento, nenhum estudo

analisou a presença de gliadina em medicamentos comercializados no Brasil. Visto que, o aprofundamento em relação a tais aspectos pode representar potenciais mudanças na vida dessas pessoas ajudando no tratamento de todas as patologias mencionadas. Já que, até então, o único tratamento existente consiste em uma rigorosa dieta sem glúten, ou sem trigo no caso da alergia ao trigo.

REFERÊNCIAS

1. BINICIER OB e TOSUN F. Evaluation of adult celiac disease from a tertiary reference center: a retrospective analysis, *Revista da Associação Médica Brasileira* [online], 2020; 66(1): 55-60.
2. CABRERA CM. Association Between Allergic Conditions and Celiac Disease in Pediatric Patients, *Turk J Gastroenterol*, 2022; 33(7): 625-626.
3. CASTILHOS A, et al. Quality of life evaluation in celiac patients from southern brazil, *Arquivos de Gastroenterologia*, 2015; 52(3): 171-175.
4. CICLITIRA P, et al. Gluten-free diet--what is toxic?. Best practice & research, *Clinical gastroenterology*, 2005; 19(3): 359-371.
5. COLLIN P, et al. Dermatitis herpetiformis: a cutaneous manifestation of coeliac disease, *Ann Med*, 2017.
6. COSTACURTA M, et al. Oral manifestations of coeliac disease: A clinical- statistic study, *Oral Implantol (Rome)*, 2010; 3(1): 12-9.
7. FARINHA S, et al. Dermite herpetiforme. Caso clínico. *Rev Port Imunoalergologia*, Lisboa, 2018; 26(2): 127-131.
8. FLORES RV. El gluten del trigo y su rol en la industria de la panificación, *Ingeniería industrial*, 2014; 32: 231-246.
9. JIMENEZ ORTEGA AI, et al. Enfermedad celíaca y nuevas patologías relacionadas con el gluten. *Nutr. Hosp.*, Madrid, 2016; 33(4): 44-48.
10. LANDAETA N, et al. Polimorfismo HLA-DQ em pacientes pediátricos com doença celíaca. *Gen*, Caracas, 2008; 62(2): 92-95.
11. MARTINEZ-OJINAGA E, et al. Distribuição de HLA-DQ e avaliação de risco da doença celíaca em um centro espanhol. *Rev. esp. enferm. dig.*, Madrid, 2018; 110(7): 421-426.
12. NEJAD ROSTAMI M, Immunology of Celiac Disease by Focused on Vaccine Therapy. *International Journal of Celiac Disease*, 2015; 3(4): 115-117.
13. ORTIGOSA DEL CASTILLO L. Historia de la enfermedad celíaca (1): Samuel Gee, *Canarias Pediátrica*, 2008; 32(1): 57-60.
14. ROSTOM A, et al. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: A systematic review, *Gastroenterology*, 2005; 128: 38-46.
15. RIBEIRO EM. Novos avanços no desenvolvimento de terapias não dietéticas para a doença celíaca, 2018; Tese de Doutorado.
16. RIBEIRO P, et al. Nutritional status variation and intestinal and extra intestinal symptomatology in patients with celiac disease and non-celiac gluten sensitivity given specialized dietary advice. *Revista de Nutrição* [online], 2017; 30(1): 57-67.
17. SAPONE A, et al. Espectro de transtornos relacionados ao glúten: consenso sobre nova nomenclatura e classificação. *BMC Med*, 2012; 10: 13.
18. SDEPANIAN VL, et al. Pesquisa de gliadina em medicamentos: informação relevante para a orientação de pacientes com doença celíaca. *Arquivos de Gastroenterologia* [online], 2001; 38(3): 176-182.
19. SOUSA DE, A problemática do glúten na dieta humana. Tese de Doutorado, 2015.
20. SILVA KOTZE LM, et al. The management of dermatitis herpetiformis by the gastroenterologist. A series of cases. *Arquivos de Gastroenterologia* [online], 2021; 58: 04.
21. THERRIEN A, et al. Doença Celíaca: Manifestações Extraintestinal e Condições Associadas. *J Clin Gastroenterol*, 2020; 54(1): 8-21.
22. WAHAB P, et al. Histologic Follow-up of People With Celiac Disease on a Gluten-Free Diet: Slow and Incomplete Recovery, *American Journal of Clinical Pathology*, 2002; 118: 459-463.