



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

STEFANE MARIANO REGO CRISPIM
MARIA LUIZA PEREIRA RODRIGUES
AMANDA RIBEIRO ALVES

INFLUÊNCIA DA OZONIOTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE
ÚLCERAS DO PÉ DIABÉTICO

BRASÍLIA
2019



**STEFANE MARIANO REGO CRISPIM
MARIA LUIZA PEREIRA RODRIGUES
AMANDA RIBEIRO ALVES**

**INFLUÊNCIA DA OZONIOTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS DO PÉ
DIABÉTICO.**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Márcio Rabelo Mota

**BRASÍLIA
2019**

**INFLUÊNCIA DA OZONIOTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS DO PÉ
DIABÉTICO.**

Stefane Mariano Rego Crispim – UniCEUB, PIC Institucional, aluno voluntário
stefanemariano@sempreceub.com

Maria Luiza Pereira Rodrigues – UniCEUB, PIC Institucional, aluno voluntário
maria.lr@sempreceub.com

Amanda Ribeiro Alves– UniCEUB, PIC institucional, aluno colaborador
amanda.ribeiro@sempreceub.com

Márcio Rabelo Mota – UniCEUB, professor orientador
marcio.mota@ceub.edu.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: Úlcera do pé diabético é uma das complicações de diabetes mellitus que ocorre por causas multifatoriais. A abordagem multidisciplinar e multiprofissional do paciente com pé diabético é recomendada, uma vez que a afecção possui alta prevalência e que as ações de prevenção e controle das lesões são potencialmente eficazes. Há um crescente interesse da comunidade científica e boa aceitação do tratamento com ozônio pelas revistas acadêmicas, apesar de o número de pesquisas acerca do assunto não ser amplo. Desse modo, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a influência da ozonioterapia em pacientes com feridas do pé diabético.

METODOLOGIA: Tratou-se de revisão narrativa de literatura acerca da terapia com ozônio para tratamento de ferida do pé diabético. Foram utilizados os termos “ozônio”, “ozonioterapia”, “ozonização”, “pé diabético”, “úlceras do pé diabético”, bem como suas traduções para o inglês “ozone”, “ozonotherapy”, “diabetic foot”, “diabetic foot ulcer”. Foram consultadas as bases acadêmicas PubMed, Scielo, Lilacs e EBSCOhost.

RESULTADOS/DISCUSSÃO: Muitas vezes o tratamento convencional para feridas é ineficiente devido à multiplicação de bactérias resistentes. Para feridas infectadas, primeiramente pode-se empregar o ozônio como desinfetante, pois o gás é tanto bactericida como fungicida, e para se obter uma ferida livre de patógenos; posteriormente, pode-se aplicar doses baixas da mistura gasosa oxigênio-ozônio para acelerar a cicatrização da lesão. Dentre as formas de tratamento com ozônio estão a utilização de óleo ozonizado sobre a ferida e a aplicação local de uma mistura de gases ozônio e oxigênio diretamente sobre a úlcera. Além disso, o ozônio funciona bem quando insuflado em microambiente controlado (saco plástico). a ozonização, quando comparada ao uso de antibióticos convencionais, pode reduzir o tamanho das lesões e abreviar o tempo de internação dos pacientes a curto prazo, mas aparentemente não promove a cura total da úlcera nem reduz o número de complicações. Há um crescente interesse pela comunidade científica e boa aceitação do tratamento com ozônio pelas revistas acadêmicas, apesar de o número de pesquisas acerca do assunto não ser grande.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: Haja vista a impossibilidade de acompanhar longitudinalmente pacientes portadores de úlcera do pé diabético durante pelo menos 12 semanas, conforme constava no projeto original, apresentou-se a revisão de literatura acerca do tratamento de úlcera do pé diabético com ozônio discutindo suas diversas modalidades. O projeto será revisto e readequado para contemplar os objetivos propostos inicialmente na linha de pesquisa com ozonioterapia, pois evidenciou-se com a presente revisão o potencial adjuvante do ozônio no tratamento de úlceras do pé diabético.

Palavras-Chave: Ozonioterapia. Pé diabético. Polineuropatia diabética.

SUMÁRIO

| | | |
|---|-----------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 6 |
| 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 7 |
| 3 | MÉTODO..... | 10 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 10 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 11 |
| 6 | REFERÊNCIAS:..... | 12 |

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é um distúrbio metabólico no qual há hiperglicemia persistente, por deficiência na produção de insulina ou por falha na sua ação, ou devido a ambos os mecanismos, provocando complicações em longo prazo. Pé diabético é um conceito que abrange a presença de alterações como infecção, ulceração e/ou destruição de tecidos moles associadas a alterações neurológicas e vários graus de doença arterial periférica nos membros inferiores⁽¹⁾.

Úlcera do pé diabético é uma das complicações de diabetes mellitus que ocorre por causas multifatoriais, como: o risco aumentado de desenvolver neuropatias periféricas; a doença vascular periférica; a pressão nos pés alterada; e a menor resistência a contornar infecções⁽²⁾. A abordagem multidisciplinar e multiprofissional do paciente com pé diabético é recomendada, uma vez que a afecção possui alta prevalência e que as ações de prevenção e controle das lesões são potencialmente eficazes^(3,4,18).

O tratamento convencional do pé diabético se baseia em alguns princípios básicos gerais: controle metabólico e tratamento de comorbidades; intervenções cirúrgicas ortopédicas para corrigir a hiperpressão sobre a área ulcerada; limpeza; melhoria da irrigação cutânea; educação do doente e familiares⁽⁵⁾. Um dos tratamentos não convencionais em pesquisa é a ozonização das lesões⁽⁶⁾.

Há um crescente interesse da comunidade científica e boa aceitação do tratamento com ozônio pelas revistas acadêmicas, apesar de o número de pesquisas acerca do assunto não ser amplo⁽⁷⁾ e de o mecanismo exato de atuação do ozônio na melhora das feridas ainda ser desconhecido⁽²⁾. A ozonioterapia faz parte, desde de 2018, das modalidades de práticas integrativas e complementares em saúde incluídas pela Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), no Sistema Único de Saúde (SUS)⁽⁸⁾.

Sendo assim, o ozônio recebe o papel de potencial tratamento complementar para úlceras do pé diabético, dentre outras lesões de base isquêmica e/ou infecciosa, pois, além de eliminar patógenos, aumenta a oxigenação tecidual, desencadeando sucessivos processos de liberação de citocinas para reparação tecidual^(7,9-11).

Desse modo, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a influência da ozonioterapia em pacientes com feridas do pé diabético.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Pé diabético é o termo relacionado a infecção, ulceração ou destruição de tecidos do pé associadas a neuropatia e/ou doença arterial periférica em extremidades inferiores de uma pessoa com história de diabetes mellitus⁽¹⁹⁾, sendo a úlcera do pé diabético a conjunção entre polineuropatia, deformidade da estrutura anatômica e traumas, conforme ilustra a Imagem 01⁽²¹⁾.

A polineuropatia diabética acarreta insensibilidade por dano às fibras nervosas finas (tipo C e delta) pela exposição prolongada à hiperglicemia, associada a fatores cardiovasculares e deformidades estruturais dos pés, por meio do comprometimento das fibras grossas (beta A, alfa). O comprometimento das fibras simpáticas (finas) provoca diminuição ou ausência de sudorese e ressecamento da pele, o que predispõe a rachaduras e fissuras na pele dos pés⁽²¹⁾.

No paciente com polineuropatia diabética é frequente observar deformidades neuropáticas típicas, como dedos em garra, proeminências de metatarsos e acentuação do arco, o que gera áreas de pressão anormal ao caminhar⁽²¹⁾.

O traumatismo repetitivo do caminhar não é percebido, devido à perda da sensibilidade protetora plantar e da sensibilidade dolorosa, ocasionando a formação de hiperqueratose e calos.

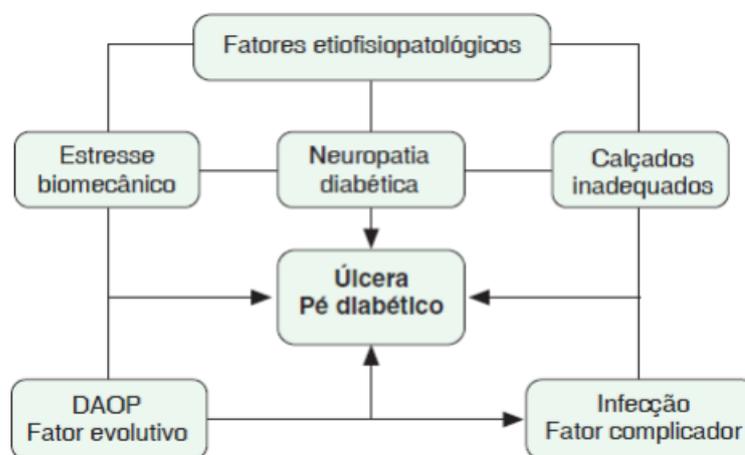


Figura 01. Fatores etiofisiopatológicos da úlcera do pé diabético⁽²¹⁾.

Após a determinação do mecanismo causador da lesão, a limpeza pelo debridamento é obrigatória e deve ocorrer em até 24 horas para a retirada do tecido infectado, pois a demora no manejo da lesão favorece a disseminação da infecção para os compartimentos do pé⁽²¹⁾.

A maioria das infecções são polimicrobianas, sendo o *Staphylococcus aureus* o patógeno mais isolado⁽²⁰⁾ e a multirresistência bacteriana é um fato comum, sendo que história prévia de hospitalização, procedimentos cirúrgicos e terapia prolongada com antibióticos de amplo espectro podem favorecer a colonização por bactérias resistentes⁽²¹⁾.

O tratamento convencional do pé diabético se baseia em alguns princípios básicos gerais: controle metabólico e tratamento de comorbidades; intervenções cirúrgicas ortopédicas para corrigir a hiperpressão sobre a área ulcerada; limpeza; melhoria da irrigação cutânea; educação do doente e familiares⁽⁵⁾. A abordagem multidisciplinar do paciente com pé diabético é recomendada, uma vez que a afecção possui alta prevalência e que as ações de prevenção e controle das lesões são potencialmente eficazes^(3,4).

A eficácia da terapia com ozônio após a tentativa de tratamento convencional sem sucesso é realidade em doenças isquêmicas e infecciosas crônicas, afecções ortopédicas e na odontologia, além de não haver efeitos adversos e de a maioria dos pacientes relatar sensação de bem-estar⁽²³⁾.

Diversos trabalhos obtiveram resultados encorajadores da utilização de ozônio como adjuvante da terapia convencional para úlceras do pé diabético, uma vez que concluíram que a ozonioterapia é uma ferramenta terapêutica complementar que auxilia na melhora da qualidade de vida de pacientes com pé diabético^(6,9,12,13) e reduz a necessidade de amputação do membro acometido⁽¹³⁾.

Nos dias atuais, há grande versatilidade de usos do ozônio como terapia adjuvante para várias afecções, visto que diversos efeitos da ozonioterapia são conhecidos: aumento da entrega de oxigênio ao tecido isquêmico, redução da síntese de prostaglandinas, aumento da circulação sanguínea, regulação de enzimas antioxidantes, ativação branda do sistema imune, liberação de fatores de crescimento, estimulação do sistema neuroendócrino e redução da dor^(22,24).

A literatura relata a descoberta do ozônio como terapia desde meados do século XIX, quando foi utilizado durante a 1ª Guerra Mundial para tratar soldados acometidos por infecções anaeróbicas de *Clostridium sp.*, sensíveis ao O₃^(11,25). Em um dos primeiros artigos sobre o assunto publicado na revista *The Lancet*, Stoker (1916)⁽²⁸⁾ refere algumas propriedades do ozônio, como o aumento do fluxo sanguíneo

no local da lesão e o efeito microbicida do gás, após a observação de 21 casos de lesões de tíbia e fêmur de soldados após a guerra. A ozonioterapia começou a ser utilizada na medicina há mais de 20 anos como complemento de terapias estéticas e como potencial agente no tratamento de doenças raras⁽¹⁶⁾.

O processo de ozonização da água consiste em borbulhar o gás ozônio na concentração de 20 a 100µg/mL em água duplamente destilada, por um tempo médio de 5 a 20 minutos, de forma a atingir a concentração final da solução de 5 a 25µg/mL^(11,27). Sabe-se que a molécula de O₃ pode permanecer estável por até dois anos a 4 °C em azeite de oliva ozonizado, sendo um veículo ideal para uso tópico em pele e mucosas, apesar de as condições de borbulhamento do gás não estarem padronizadas^(11,25).

O termo “ozonizado” deve ser usado em associação à concentração de peróxidos presentes na solução, pois os compostos que reagem com o ozônio possuem a capacidade de oxigenar as lesões sem causar irritações na pele quando em concentrações adequadas⁽¹¹⁾. Atualmente, sabe-se que o gás, em períodos de exposição e concentrações adequados, possui efeitos benéficos, com a vantagem de a administração poder ser realizada utilizando diversos veículos⁽²⁵⁾, sendo que a dosagem deve ser avaliada de acordo com a indicação médica e com a condição do paciente⁽²⁶⁾.

O ozônio atua modulando os sistemas oxidantes e antioxidantes do organismo⁽¹⁰⁾. As moléculas oxidativas, dentre as quais está o oxigênio, possuem papel importante em processos fisiológicos: as espécies reativas de oxigênio, também conhecidas como radicais livres, provocam estresse oxidativo nas células. No entanto, quando isso ocorre de forma controlada, observa-se aumento de importantes mediadores dos efeitos terapêuticos da aplicação de ozônio⁽⁷⁾, como interleucinas e interferon⁽²⁶⁾.

O gás ozônio é produzido durante a formação do complexo antígeno-anticorpo. Assim, na ozonioterapia tópica, a molécula contribui acelerando a formação de tecido de granulação e diminuindo o tempo de cicatrização, além de ser um meio de adaptação ao estresse oxidativo⁽⁶⁾. A ação do ozônio se baseia nas reações e interações do O₃ dissolvido na água corporal com moléculas inorgânicas e orgânicas, pois há geração de diversos radicais livres⁽²⁴⁾.

Foi demonstrado que diversas feridas, como escaras de decúbito, abscessos e úlceras apresentam melhora rápida quando há utilização de autohemoterapia com ozônio associada ao tratamento tópico com ozonização direta da lesão ou com água ozonizada tanto com objetivo de limpeza como de efeito estimulante da molécula. Além disso, o aumento do metabolismo e das respostas imunológicas contribuem com os resultados⁽²³⁾.

É importante ressaltar que o ozônio pode ser utilizado como adjuvante na terapia convencional, já que sua função principal não é substituir os fármacos, mas sim, melhorar os resultados do tratamento clínico e farmacológico^(15,16).

3 METODOLOGIA

Tratou-se de revisão narrativa de literatura acerca da terapia com ozônio para tratamento de ferida do pé diabético. Foram utilizados os termos “ozônio”, “ozônioterapia”, “ozonização”, “pé diabético”, “úlceras do pé diabético”, bem como suas traduções para o inglês “ozone”, “ozonotherapy”, “diabetic foot”, “diabetic foot ulcer”. Foram consultadas as bases acadêmicas PubMed, Scielo, Lilacs e EBSCOhost. Não foi delimitado período para datas de publicação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prevalência de pacientes diabéticos com risco de desenvolver úlceras nos pés foi de aproximadamente 25% em estudo recente conduzido em um ambulatório interdisciplinar especializado em diabetes no Brasil⁽⁴⁾.

Numerosos artigos tem sugerido relação entre o diabetes mellitus e o estresse oxidativo^(10,11). A hiperglicemia acarreta a geração de espécies reativas de oxigênio, que podem superar a capacidade de defesa das enzimas antioxidantes. Esses acontecimentos estão associados às complicações do diabetes tais como as doenças microvasculares na retina, nos rins e nos nervos periféricos.

Muitas vezes o tratamento convencional para feridas é ineficiente devido à multiplicação de bactérias resistentes a meticilina em microambientes hipóxicos, como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*⁽¹¹⁾. Para feridas infectadas, primeiramente pode-se empregar o ozônio como desinfetante, pois o gás é tanto bactericida como fungicida, e para se obter uma ferida livre de patógenos;

posteriormente, pode-se aplicar doses baixas da mistura gasosa oxigênio-ozônio para acelerar a cicatrização da lesão⁽²⁶⁾.

Dentre as formas de tratamento com ozônio estão a utilização de óleo (de girassol ou de oliva) ozonizado sobre a ferida e a aplicação local de uma mistura de gases ozônio e oxigênio diretamente sobre a úlcera⁽²⁾. Solovastru et al. (2015)⁽¹⁴⁾ testaram a formulação em spray de óleo de girassol ozonizado combinado com alfa-bisabolol, um composto presente na camomila, e obtiveram resultados positivos na cicatrização de úlceras do pé diabético, sobretudo pela combinação dos efeitos antimicrobianos e imunológicos do ozônio com os anti-inflamatórios do composto fitoterápico.

Travagli et al. (2010)⁽¹¹⁾ ressalta que o ozônio funciona bem quando insuflado em microambiente controlado (saco plástico) porque se dissolve na água presente na superfície lesionada e nas secreções exsudativas, ao passo que não interage com a pele íntegra e hídida.

Em revisão sistemática sobre a utilização de ozônio em terapia adjuvante em úlceras do pé diabético, Liu et al. (2015)⁽²⁾ concluíram que a ozonização, quando comparada ao uso de antibióticos convencionais, pode reduzir o tamanho das lesões e abreviar o tempo de internação dos pacientes a curto prazo, mas aparentemente não promove a cura total da úlcera nem reduz o número de complicações.

Há um crescente interesse pela comunidade científica e boa aceitação do tratamento com ozônio pelas revistas acadêmicas, apesar de o número de pesquisas acerca do assunto não ser grande⁽⁷⁾. Dessa forma, o ozônio ressurgiu como potencial tratamento complementar para úlceras do pé diabético, dentre outras lesões de base isquêmica e/ou infecciosa, pois, além de eliminar patógenos, aumenta a oxigenação tecidual, desencadeando sucessivos processos de liberação de citocinas para reparação tecidual^(7,9-11,26).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Haja vista a impossibilidade de acompanhar longitudinalmente pacientes portadores de úlcera do pé diabético durante pelo menos 12 semanas, conforme constava no projeto original, devido a diversos fatores, como a morosidade e a necessidade de ajustes metodológicos para aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa, além da dificuldade de recrutar candidatos a receber a terapia

complementar pretendida, apresentou-se a revisão de literatura acerca do tratamento de úlcera do pé diabético com ozônio discutindo suas diversas modalidades.

Não obstante, o projeto será revisto e readequado para contemplar os objetivos propostos inicialmente na linha de pesquisa com ozonioterapia, pois evidenciou-se com a presente revisão o potencial adjuvante do ozônio no tratamento de úlceras do pé diabético.

6 REFERÊNCIAS:

1. (SBD) Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. Sao Paulo: Editora Clannad; 2017.
2. Liu J, Zhang P, Tian J, Li L, Li J, Jh T, et al. Ozone therapy for treating foot ulcers in people with diabetes (Review). 2015.
3. Caiafa JS, Castro AA, Fidelis C, Santos VP, Simão E, Jr CJS. Atenção integral ao portador de Pé Diabético. *J Vasc Bras*. 2011;10(4):Supp 2.
4. Thomazelli FCS, Machado CB, Dolçan KS. Análise do risco de pé diabético em um ambulatório interdisciplinar de diabetes. *Rev da AMRIGS*. 2015;59(1):10–4.
5. Duarte N, Gonçalves A. Pé diabético. *Angiol e Cir Vasc*. 2011;7(2):65–79.
6. Cardoso CC, Filho ED, Pichara NL, Campos EGC, Pereira MA, Fiorini JE. Ozonoterapia como tratamento adjuvante na ferida de pé diabético. *Rev Méd Minas Gerais*. 2010;20:442–5.
7. Ozler M, Akay C, Oter S, Ay H, Korkmaz A. Similarities and differences of hyperbaric oxygen and medical ozone applications. *Free Radic Res*. 2011;45(December):1267–78.
8. Lemos S, Gabriela A, Rodrigues L. Práticas integrativas e complementares em saúde no tratamento de feridas crônicas : revisão integrativa da literatura. *Aquichan*. 2018;18:327–42.
9. Anupunpisit V, Chuanchaiyakul S, Petchpiboolthai H, Jungudomjaroen S, Stapanavatr W. Characterization of infected diabetic wound after ozonated water therapy. *J Med Heal Sci*. 2004;11(1–2).
10. Martínez-sánchez G. La ozonoterapia gana evidencias científicas en el campo clínico Ozone therapy gains scientific evidence in the clinical field. *Rev Cuba Farm*. 2013;47(1):1–4.
11. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases : A Review. *Mediat Inflammatio*. 2010;2010:1–9.

12. Luis J, Fernández C, Falcón BA, Santana RL, Santiuste RL, Pérez IW, et al. Presentación de un caso de pie diabético neuro-infeccioso tratado con ozonoterapia. *Rev CENIC Ciencias Biológicas*. 2015;46(2):195–202.
13. Izadi M, Kheirjou R, Mohammadpour R. Diabetes & Metabolic Syndrome : Clinical Research & Reviews Ef fi cacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev [Internet]*. 2019;13(1):822–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.11.060>
14. Solovastru LG, Stincanu A, De Ascentii A, Cappare G, Mattana P, Vata D. Randomized, Controlled Study of Innovative Spray Formulation Containing Ozonated Oil and Bisabolol in the Topical Treatment of Chronic Venous Leg Ulcers. *Adv Skin Wound Care*. 2015;28(9):406–9.
15. Clavo B, Santana-rodriguez N. Are we ready for a medical ozone challenge? *Int J Ozone Ther*. 2012;2(3):189–91.
16. Re L, Malcangi G, Martinez-sanchez G. Medical ozone is now ready for a scientific challenge: current status and future perspectives. *Int J Ozone Ther*. 2012;2(3):193–6.
17. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2019. *Diabetes Care* 2019;42(Suppl. 1):S1–S2 | <https://doi.org/10.2337/dc19-SINT01>
18. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2019 Jan; 42 (Supplement 1): S124-S138.<https://doi.org/10.2337/dc19-S011>
19. IWGDF Editorial Board. IWGDF Definitions and Criteria. 2019; Available at: <https://iwgdfguidelines.org/definitions-criteria/>
20. Lipsky BA, Aragón-Sánchez J, Diggle M. IWGDF guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2016; 32(Suppl 1):45-74.
21. Pedrosa HC, Macedo GC, Ribeiro JF, Boulton AJM. Pé Diabético – Avaliação e tratamento. In: *Endocrinologia clínica / Lucio Vilar ... [et al.] - 6. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.*
22. Leonardi M. Possibilities of Medical Ozone. *International Journal of Ozone Therapy*, v.12, p.131-142, 2013.
23. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of Inflammation*, v.13, n.1, p.3-11, fev. 2004.
24. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The Ozone Paradox: Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug. *Medicinal Research Reviews Disponível em Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)*. DOI 10.1002/med.20150. 2009.
25. Valachi G, Fortino V e Bocci V. The dual action of ozone on the skin. *British Journal of Dermatology*. 2005; 153; p.1096–1100

26. ABOZ - Associação Brasileira de Ozonioterapia. Informações que a sociedade européia de ozonioterapia recomenda que sejam dadas aos pacientes. Disponível em: <http://www.aboz.com.br>

27. Bocci V. Ozone: A New Medical Drug. 2005. Springer.

28. Stoker G. The surgical uses of ozone. The Lancet, vol.188, no. 4860, p. 712, 1916.

28. Anichini R, Bellis A, Butelli L, Gioffredi M, Gori R, Picciafuochi, et al. Ozone-therapy in treatment of diabetic foot ulcers: a suggestive approach in wound bed preparation. Eur J Clin Invest. 2003;33(1):46-7.