



apunts

MEDICINA DE L'ESPORT

www.apunts.org



ORIGINAL

Eficacia y tolerancia de un condroprotector oral a base de ácido hialurónico y colágeno hidrolizado sobre la funcionalidad articular en individuos activos con artrosis de rodilla[☆]

Rafael Llopis-Miró^{a,*}, Juan de Miguel-Saenz^b y Fernando Delgado-Velilla^b

^a Instituto del Aparato Locomotor, Hospital San Francisco de Asís, Madrid, España

^b Traumatólogos Asociados, Sanatorio Nuestra Señora del Rosario, Madrid, España

Recibido el 2 de febrero de 2011; aceptado el 31 de marzo de 2011

Disponible en Internet el 17 de mayo de 2011

PALABRAS CLAVE

Osteoartritis;
Ácido hialurónico;
Condroprotector;
Actividad física;
Colágeno

Resumen

Introducción: Se estudió la eficacia y la tolerancia de la administración diaria de un condroprotector oral conteniendo ácido hialurónico (AH) y colágeno hidrolizado (HC) sobre la funcionalidad articular, y el dolor asociado, en individuos activos afectados de osteoartritis de rodilla.

Material y métodos: Se realizó un estudio piloto exploratorio en fase IV, multicéntrico, abierto y no comparativo. Se incluyeron 108 sujetos afectados de osteoartritis de rodilla que realizaban actividad física diaria. Se les administró, durante 90 días consecutivos, un vial oral con 7 g de HC y 25 mg de AH. La evaluación clínica de la funcionalidad articular y del dolor se realizó utilizando el índice WOMAC para incapacidad funcional y rigidez, una escala analógica visual (EAV) para dolor, y la opinión del médico y el paciente.

Resultados: La evolución de la escala WOMAC, en sus componentes de incapacidad funcional y rigidez, mostró un progresivo descenso a partir de la visita inicial ($p < 0,01$). Paralelamente, se produjo una disminución del dolor articular desde el inicio del tratamiento ($p < 0,01$). Se observó un aumento de la eficacia en las sucesivas visitas. La tolerancia al tratamiento fue valorada positivamente durante todo el estudio.

Conclusiones: La administración oral de un suplemento diario de AH y HC durante 90 días consecutivos es eficaz, mejorando la capacidad funcional de la articulación y disminuyendo el dolor en individuos activos con gonartrosis. El valor medio de todos los parámetros de eficacia a lo largo de las diferentes visitas indicó una clara mejoría durante todo el estudio. El tratamiento fue bien tolerado.

© 2011 Consell Català de l'Esport. Generalitat de Catalunya. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

[☆] Resumen presentado en el XI Congreso de la EFORT (Madrid, 2-5 de junio de 2010).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rafa@drlllopi.com (R. Llopis-Miró).

KEYWORDS

Osteoarthritis;
Hyaluronate;
Chondroprotector;
Physical activity;
Collagen

Efficacy and tolerance of an oral hyaluronate and collagen chondroprotector on joint function in active adults suffering from knee osteoarthritis

Abstract

Introduction: To study the efficacy and tolerance of the daily administration of an oral chondroprotector based on hyaluronate (HA) and hydrolysed collagen (HC) on joint function and pain in active adults suffering from knee osteoarthritis.

Material and methods: A phase IV exploratory, multicentre, open and non-comparative pilot study was performed, which included 108 subjects affected by knee osteoarthritis who practised daily physical activity. They took one daily vial containing 7 g of HC and 25 mg of HA for 90 consecutive days. The clinical evaluation of joint function and pain was performed using the WOMAC Index for functional disability and stiffness, a visual analogue scale (VAS) for pain, and the opinion of the doctor as well as the patient suffering from knee osteoarthritis.

Results: The changes in the WOMAC scale, in its components of functional disability and stiffness, showed a gradual decrease after the initial visit ($P < .01$). At the same time, a reduction in joint pain was observed from the beginning of the treatment ($P < .01$). Efficacy evaluation of the treatment increased with time. Tolerance was positively evaluated during the whole treatment.

Conclusions: The oral administration of a daily supplement of HA and HC for 90 consecutive days was effective in improving joint function and reducing pain in active adults suffering from knee osteoarthritis. The mean value of all efficacy evaluations during the different visits showed a clear improvement during all the follow-up. The treatment was well tolerated throughout the study.

© 2011 Consell Català de l'Esport. Generalitat de Catalunya. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Alteraciones en el cartílago articular, tales como la osteoartritis (OA), limitan la práctica de actividades físicas, ya que producen incapacidad funcional y dolor¹. La OA es una enfermedad que afecta a las articulaciones sinoviales y que se caracteriza por la degradación y pérdida de cartílago articular con remodelación del hueso subcondral, formación de osteofitos e inflamación de la membrana sinovial. Los signos clínicos incluyen dolor articular fluctuante, hinchazón, rigidez y pérdida de movilidad, que aumentan en severidad según la enfermedad progresa. Dada la ausencia de un agente que cure la enfermedad, los objetivos principales del tratamiento de la OA son reducir los síntomas, minimizar la incapacidad funcional y limitar la progresión de los cambios estructurales^{2,3}.

Los estudios clínicos hasta el momento se han focalizado en el alivio del dolor, principalmente mediante el uso de fármacos antiinflamatorios y analgésicos². Sin embargo, la reducción del dolor asociada al uso de AINE en la OA desaparece rápidamente cuando se suspende el tratamiento. Además, estos tratamientos tienen efectos secundarios bien conocidos y en ocasiones pueden provocar un empeoramiento del proceso osteoartítico⁴. Así, es necesario un agente terapéutico en OA que tenga efectos modificadores de los síntomas, un mejor perfil de seguridad y efectos sobre la estructura del cartílago³, sobre todo en individuos activos que vean afectada su actividad física diaria.

El uso de suplementos nutricionales específicos del cartílago ha demostrado ser efectivo en la disminución del dolor tras un uso prolongado, y la mejora observada persiste tras la finalización del tratamiento^{5,6}.

Hasta ahora se han utilizado como condroprotectores habituales el condroitín sulfato^{7,8}, la glucosamina sulfato⁸, el hidrolizado de colágeno (HC) y el ácido hialurónico (AH), siendo este último el menos investigado clínicamente. El hidrolizado enzimático de colágeno administrado por vía oral se absorbe y distribuye en los cartílagos articulares⁹ y ha demostrado su eficacia como condroprotector¹⁰⁻¹². Por otra parte, el AH es un glucosaminoglucano endógeno de alto peso molecular que se encuentra en el reino animal, especialmente en la matriz extracelular de los tejidos conectivos blandos. El AH posee propiedades viscoelásticas y lubricantes características, y es ampliamente utilizado en cosmética y medicina. Diversos estudios en animales investigan los efectos del AH oral en los tejidos musculoesqueléticos de diversos animales (ratas, perros y caballos¹³⁻¹⁵). Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto del AH oral en las articulaciones humanas.

Con el objetivo de facilitar el ejercicio físico regular, mejorando la funcionalidad articular, y aliviar el dolor, se ha estudiado por primera vez la eficacia y la tolerancia de la administración de un condroprotector oral que combina AH y HC durante 90 días consecutivos en un grupo de individuos activos afectados de artrosis de rodilla.

Material y métodos

Se llevó a cabo un estudio piloto exploratorio en fase IV, multicéntrico, abierto y no comparativo. Se incluyeron 108 pacientes afectados de artrosis de rodilla que realizaban actividad física diaria. Se les administró un vial diario de 7 g de HC y 25 mg de AH (Artilane®) durante 90 días

consecutivos. Al tratarse de un estudio piloto, el tamaño de la muestra se estableció en base a la bibliografía publicada sobre estudios similares^{1,11,16}.

Se incluyeron pacientes de ambos sexos a partir de 40 años de edad que presentaban artrosis de clase I, II y III según los requerimientos del American College of Rheumatology (ACR) en al menos una rodilla. Además, debía tratarse de sujetos que hubieran practicado algún deporte y que hubieran obtenido un beneficio terapéutico previo utilizando antiinflamatorios no esteroideos (AINE) para tratar las lesiones concomitantes. En el momento de la inclusión, todos los pacientes debían realizar una mínima actividad física (caminar por superficie plana 25 min diarios) y debían haber sufrido dolor en la rodilla objeto de estudio durante los últimos tres meses.

Fueron excluidos del estudio los pacientes que presentaban enfermedades concomitantes o que habían recibido tratamientos que pudieran interferir en la evaluación de eficacia. Tampoco se incluyeron mujeres embarazadas.

Se realizó un seguimiento de los pacientes durante 3 meses, llevando a cabo evaluaciones los días 0, 15, 30, 60 y 90 (visitas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente). Se estableció la línea basal en el día 0, día previo al inicio del tratamiento.

La valoración clínica de la funcionalidad articular se realizó mediante la escala Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis index (WOMAC), que evalúa de 0 (nulo) a 4 (extremo) el dolor, la rigidez y la dificultad en la ejecución de diversas actividades cotidianas. El dolor articular se evaluó mediante una escala analógica visual (EAV) de 10 centímetros. También se valoró en una escala de 0 a 4 la opinión del médico y el paciente sobre la eficacia y la tolerancia del tratamiento (siendo 0 la peor evaluación posible y 4 la mejor).

Se efectuó el análisis estadístico de los diferentes parámetros a lo largo de las visitas mediante ANOVA de medidas repetidas (comparaciones dos a dos respecto a la primera visita con corrección de Bonferroni) y test de Wilcoxon de los rangos con signo para datos no paramétricos. Se consideró el valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

El ensayo se llevó a cabo siguiendo las normas nacionales e internacionales, tales como la Declaración de Helsinki en su última revisión, las BPC (Buenas Prácticas Clínicas) y los requisitos reguladores pertinentes.

Resultados

El análisis descriptivo de la escala de WOMAC (figs. 1 y 2), en sus componentes de incapacidad funcional y rigidez, muestra un descenso progresivo a partir de la visita inicial. La incapacidad funcional muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) a partir de los 15 días de tratamiento (segunda visita) (valor medio WOMAC dificultad = 1,33) con respecto a la primera visita (1,49). Y el componente de rigidez es estadísticamente significativo a partir del mes de tratamiento (tercera visita) (valor medio de WOMAC rigidez de 1,50 en la visita 1 frente a 1,20 en la visita 3). En ambos casos las diferencias respecto a la primera visita se mantienen hasta el final del tratamiento.

La evolución de la EAV a lo largo de las visitas se resume en la tabla 1. Se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$) del dolor articular a partir de la

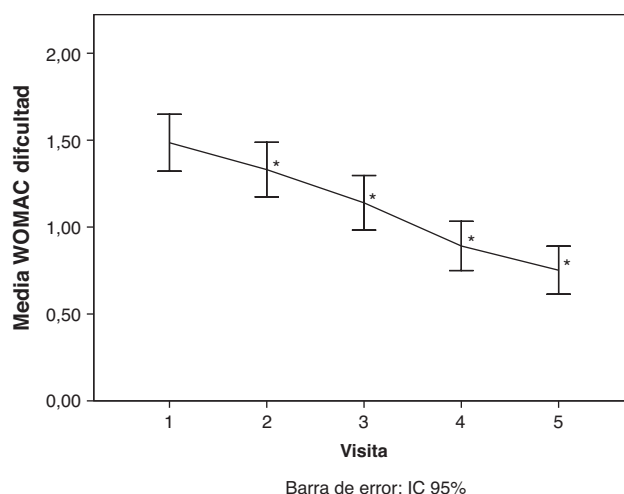


Figura 1 Evolución del valor medio de la escala WOMAC Incapacidad Funcional (dificultad) e intervalo de confianza del 95%. Diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,01$) para las comparaciones dos a dos respecto a la primera visita (método de Bonferroni).

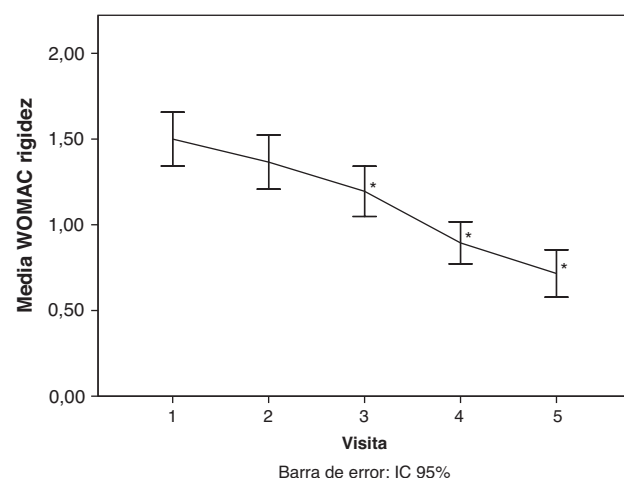


Figura 2 Evolución del valor medio de la escala WOMAC Rigidez e intervalo de confianza del 95%. Diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,01$) para las comparaciones dos a dos respecto a la primera visita (método de Bonferroni). Barras de error: IC 95%.

Tabla 1 Estadística descriptiva para la escala analógica visual (EAV)

	Visita				
	1	2	3	4	5
Media	5,32	4,90*	4,22*	3,53*	3,03*
Mediana	5,50	5,00	4,50	3,75	2,75
Desviación estándar	1,63	1,64	1,86	1,98	2,06
N	107,00	107,00	105,00	104,00	102,00

Diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,01$) para las comparaciones dos a dos respecto a la primera visita (método de Bonferroni).

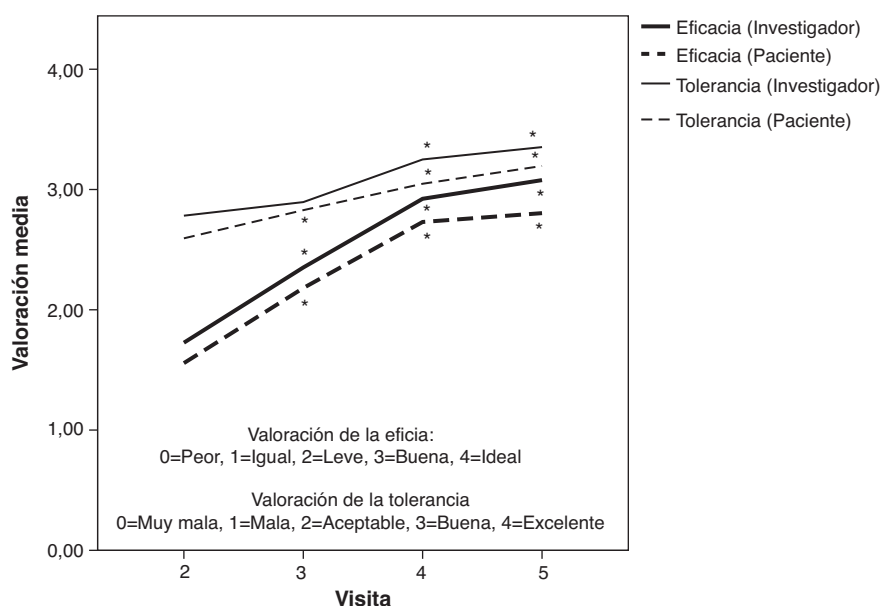


Figura 3 Evolución del valor medio de la eficacia y la tolerancia del tratamiento valorados por el investigador y por el paciente. Comparaciones dos a dos respecto a la segunda visita (método de Bonferroni, * $p < 0,01$).

segunda visita (15 días de tratamiento) con respecto al valor inicial, manteniéndose el descenso progresivo y significativo hasta la quinta visita.

La **figura 3** muestra la tendencia de los valores de eficacia y tolerancia a lo largo de las sucesivas visitas según la opinión del médico y el paciente. Así, la valoración media de la eficacia aumentó con el tiempo, tanto para el médico (valor medio de eficacia de 1,73 en la segunda visita frente a 3,08 en la quinta visita) como para el paciente (valor medio de eficacia de 1,56 en la segunda visita frente a 2,8 en la quinta visita). Los valores de eficacia presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) respecto a la segunda visita en cada una de las sucesivas visitas.

Desde el inicio del tratamiento, médico y paciente valoraron positivamente la tolerancia general a nivel digestivo y organoléptico (el valor medio de tolerancia en la segunda visita fue de 2,78 para el investigador y de 2,59 para el paciente). Esta valoración mejoró con el tiempo, presentando diferencias estadísticamente significativas respecto a la segunda visita a partir de la tercera visita en el caso de los pacientes, y a partir de la cuarta visita en el caso de los médicos (30 y 60 días, respectivamente).

Discusión

El presente estudio piloto es el primero realizado en humanos utilizando un número elevado de pacientes para evaluar el efecto del AH oral combinado con HC en la funcionalidad articular de individuos que realizan una actividad física diaria y que padecen artrosis de rodilla.

El HC administrado por vía oral se absorbe y distribuye en los cartílagos articulares⁹ y ha demostrado su eficacia como condroprotector¹⁰⁻¹². Un estudio realizado por Arquer y Pujol¹¹, del Centro de Alto Rendimiento para Deportistas

de Cataluña, valoró el efecto de la ingesta de 10g diarios de un suplemento a base de HC, con magnesio y vitaminas del grupo B, sobre el dolor articular de 20 individuos activos de entre 50 y 70 años de edad, a lo largo de 16 semanas; se observó que los sujetos mostraban una mejoría subjetiva y objetiva, mostrando una mejor movilidad y ausencia de dolor. También, Ribas y Molinero¹, de la Escuela de Medicina de la Educación Física y Deporte de la Universidad de Barcelona, estudiaron el efecto de la ingesta durante 6 meses de 10g diarios de HC con vitaminas y magnesio, sobre el grosor del cartílago articular de 26 deportistas sanos y de alto nivel, a través de ecografías; observando un aumento en el grosor del cartílago de las articulaciones escapulo humeral y femorotibial del grupo tratado, mientras que en el grupo control no se observó ningún incremento. Recientemente, Trc¹⁷, del departamento de Traumatología del Hospital Universitario Brno de Praga, ha demostrado la acción clínica del HC en un estudio aleatorizado, doble ciego, comparado con glucosamina sulfato, llevado a cabo con 100 voluntarios, observándose una clara mejora del dolor y los síntomas y diferencias significativas en los pacientes tratados con HC.

Por otra parte, las primeras evidencias de la absorción y distribución de un compuesto de AH oral fueron descritas en 2004¹⁸. En este trabajo se demostró, mediante el seguimiento de hialuronato marcado con un isótopo radiactivo del tecnecio, la acumulación de AH en tejido conectivo de ratas y perros. Estos resultados fueron respaldados por estudios posteriores¹³⁻¹⁵.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento combinado de AH y HC en individuos con gonartrosis que realizan actividad física diaria ha mejorado la capacidad funcional y la rigidez de los pacientes, lo que implica que experimentan menor dificultad a la hora de realizar ejercicio físico suave y tareas cotidianas. Del mismo modo, ha sido eficaz en la reducción del dolor articular. La evolución a lo largo de las

diferentes visitas del valor medio de todas las evaluaciones de eficacia (escalas WOMAC, EAV, valoración por el investigador y por el paciente) indican una clara mejoría ya a partir de los primeros 30 días de tratamiento, siendo estadísticamente significativa para todos los parámetros valorados (tanto los que hacen referencia a la funcionalidad y rigidez articular y la calidad de vida como los relacionados con el dolor). Esta mejoría se mantiene de forma estadísticamente significativa ($p < 0,01$) para todos los parámetros hasta el final del estudio. La tolerancia al tratamiento fue aceptable desde el inicio del estudio, mejorando de forma significativa en las visitas finales.

Esto corrobora los resultados del estudio piloto recientemente publicado por Kalman et al¹⁶, en el que muestran que la suplementación diaria con AH mejora diversos marcadores de calidad de vida en adultos con OA de rodilla. También confirma los resultados de los estudios llevados a cabo por Arquer y Pujol¹¹, Ribas y Molinero¹ y Trc¹⁷, comentados anteriormente, en los que se administró HC oral.

Sin embargo, los estudios más recientes sobre el tratamiento de la OA se están llevando a cabo con otros condroprotectores orales. Así, Wildi et al¹⁹ llevaron a cabo un estudio en el que se administró diariamente durante 6 meses condroitín sulfato a pacientes con OA y se observó, mediante resonancia magnética, una disminución de la pérdida de cartilago, aunque no mejoraron los síntomas, la sinovitis ni las lesiones óseas. También Matsuno et al²⁰ estudiaron los efectos de administrar durante 3 meses una combinación de glucosamina-condroitín-quercetina sobre las propiedades del líquido sinovial en pacientes con OA y observaron mejoras en el dolor y en la capacidad de andar y subir y bajar escaleras, sin que se observaran diferencias en las imágenes de rayos X y en la cantidad total de líquido sinovial tras la suplementación. Otras revisiones y metaanálisis recientes corroboran estos datos de condroitín sulfato como tratamiento farmacológico en casos de OA²¹.

En el estudio que nos ocupa, dado que los datos se refieren a pacientes con artrosis y vida activa que habían practicado deporte, el tratamiento podría aplicarse también a deportistas, ya que este suplemento de AH e HC contribuiría en gran medida al tratamiento y a la prevención de lesiones cartilaginosas, al aumentar la masa cartilaginosa¹ que se ve disminuida en determinadas áreas en individuos que practican deporte de forma continuada, y sin efectos secundarios asociados por tratarse de un suplemento nutricional. Serían necesarios estudios posteriores con deportistas profesionales en activo para poder extrapolar el beneficio terapéutico articular y funcional obtenido en este estudio piloto, en casos de lesiones articulares no artrósicas, y también sería interesante realizar estudios futuros comparando el producto de estudio con otros condroprotectores orales ampliamente utilizados tales como condroitín y glucosamina sulfato, que también están dando buenos resultados^{7,8}, para ver si existen diferencias entre ellos.

Podemos concluir que la ingesta diaria de un suplemento nutricional de AH y HC ayuda a los adultos con problemas articulares a mantener una actividad física regular y podría proporcionar a grupos de población más joven un complemento eficaz para el tratamiento de traumatismos deportivos. Además, también ha quedado demostrada la seguridad y la tolerancia de esta nueva asociación de condroprotectores orales.

Conflicto de intereses

Los autores de este trabajo declaran no tener ningún conflicto de intereses en relación con este artículo.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración en este trabajo al Dr. Eladio Díaz Peña, que fue uno de los impulsores del proyecto y no pudo acompañarnos en la finalización del mismo como autor, y a Luisa Varela Sendé, que nos permitió disponer de datos bibliográficos y bioestadísticos para llevar a buen fin este estudio.

Bibliografía

1. Ribas JL, Molinero O. Efecto de los hidrolizados de gelatina en la prevención de las lesiones en deportistas. *Archivos de Medicina del Deporte*. 1998;15:277-82.
2. Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Therapeutic targets in osteoarthritis: from today to tomorrow with new imaging technology. *Ann Rheum Dis*. 2003;62 Suppl 2:ii79-82.
3. Pavelka K, Trc T, Karpas K, Vitek P, Sedlackova M, Vlasakova V, et al. The efficacy and safety of diacerein in the treatment of painful osteoarthritis of the knee: a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study with primary end points at two months after the end of a three-month treatment period. *Arthritis Rheum*. 2007;56:4055-64.
4. Newman NM, Ling RS. Acetabular bone destruction related to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet*. 1985;2:11-4.
5. Reginster JY, Gillot V, Bruyere O, Henrotin Y. Evidence of nutritional effectiveness in the treatment of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2000;2:472-7.
6. Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC, Lee RL, Lejeune E, Bruyere O, et al. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet*. 2001;357:251-6.
7. Moller I, Perez M, Monfort J, Benito P, Cuevas J, Perna C, et al. Effectiveness of chondroitin sulphate in patients with concomitant knee osteoarthritis and psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *C Epub@2010 May 10*;S32-S40. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18 Suppl 1:S32-40.
8. Sawitzke AD, Shi H, Finco MF, Dunlop DD, Harris CL, Singer NG, et al. Clinical efficacy and safety of glucosamine, chondroitin sulphate, their combination, celecoxib or placebo taken to treat osteoarthritis of the knee: 2-year results from GAIT. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1459-64.
9. Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr*. 1999;129:1891-5.
10. Zuckley L, Angelopoulou KM. Collagen hydrolysate improves joint function in adults with mild symptoms of osteoarthritis of the knee. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36:S153-4.
11. Arquer A, Pujol P. Ejercicio físico en la tercera edad (Efecto de un suplemento dietético sobre la movilidad articular). *Revista Española de Medicina de la Educación Física y el Deporte*. 1996;5:121-8.
12. Adam M. Welche Wirkung haben gelatinepräparate? *Therapie-woche*. 1991;38:2456-61.
13. Balogh L, Polyak A, Mathe D, Kiraly R, Thuroczy J, Terez M, et al. Absorption, uptake and tissue affinity of high-molecular-weight hyaluronan after oral administration in rats and dogs. *J Agric Food Chem*. 2008;56:10582-93.

14. Bergin BJ, Pierce SW, Bramlage LR, Stromberg A. Oral hyaluronan gel reduces post-operative tarsocrural effusion in the yearling Thoroughbred. *Equine Vet J.* 2006;38:375–8.
15. Huang SL, Ling PX, Zhang TM. Oral absorption of hyaluronic acid and phospholipids complexes in rats. *World J Gastroenterol.* 2007;13:945–9.
16. Kalman DS, Heimer M, Valdeon A, Schwartz H, Sheldon E. Effect of a natural extract of chicken combs with a high content of hyaluronic acid (Hyal-Joint) on pain relief and quality of life in subjects with knee osteoarthritis: a pilot randomized double-blind placebo-controlled trial. *Nutr J.* 2008;7:3.
17. Trc T, Bohmova J. Efficacy and tolerance of enzymatic hydrolysed collagen (EHC) vs. glucosamine sulphate (GS) in the treatment of knee osteoarthritis (KOA). *Int Orthop.* 2011;35:341–8.
18. Schauss AG, Balogh L, Polyak A, Mathe D, Kiraly R, Janoki G. Absorption, distribution and excretion of ^{99m}Technecium labeled hyaluronan after single oral doses in rats and beagle dogs. *FASEB J.* 2004;18:A150-A151. [abstract 129.4].
19. Wildi LM, Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Beaulieu A, Bassette L, Morin F, et al. Chondroitin sulphate reduces both cartilage volume loss and bone marrow lesions in knee osteoarthritis patients starting as early as 6 months after initiation of therapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study using MRI. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:982–9.
20. Matsuno H, Nakamura H, Katayama K, Hayashi S, Kano S, Yudoh K, et al. Effects of an oral administration of glucosamine-chondroitin-quercetin glucoside on the synovial fluid properties in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73:288–92.
21. Uebelhart D. Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16 Suppl 3:S19–21. Epub@2008 Jul 31: S19-S21.