

Microhematuria persistente con proteinuria negativa o de escasa cuantía

Eduardo Gutiérrez¹, Juan A. Moreno², Manuel Praga³, en representación de investigadores del Grupo de Estudio de Enfermedades Glomerulares de la Sociedad Española de Nefrología (GLOSEN)*

¹ Servicio de Nefrología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid

² Servicio de Nefrología. IIS-Fundación Jiménez Díaz. Madrid

³ Servicio de Nefrología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Departamento de Medicina, Universidad Complutense. Madrid

Nefrología 2014;34(1):110-4

doi:10.3265/Nefrologia.pre2013.Jul.12096

«No juzgue nada por su aspecto, sino por la evidencia. No hay mejor regla.» (Charles Dickens)

RESUMEN

La cuantía de la proteinuria continúa siendo el parámetro clínico que mejor se relaciona con el desarrollo de insuficiencia renal a largo plazo en las patologías glomerulares. Esta cuantía es especialmente importante cuando se analiza la evolución de los pacientes afectos de una nefropatía IgA. De esta manera, la evolución natural de los pacientes con nefropatía IgA que se presentan clínicamente con función renal normal, microhematuria y proteinuria escasa no había sido analizada con profundidad hasta la elaboración de este trabajo multicéntrico español que aquí se analiza. Tras estudiar a 141 pacientes caucásicos con nefropatía IgA biopsiada y presentación clínica «benigna» y clasificarlos histológicamente de acuerdo a la nueva clasificación de Oxford, se puede concluir que el pronóstico renal de estos enfermos es excelente. Este es el primer trabajo de la literatura en el que se demuestra la utilidad de esta nueva clasificación en los pacientes que clínicamente se presentan con función renal normal y proteinuria inferior a 0,5 g/día. Los nuevos avances en la genética de esta enfermedad, así como en la colaboración de las vías del complemento en su fisiopatología misma, hacen que estos resultados no sean extrapolables a todas las poblaciones estudiadas. Por otro lado, el análisis y seguimiento de la microhematuria ha recobrado importancia como factor pronóstico independiente para el desarrollo de insuficiencia renal, aunque aún no existen estudios consistentes al respecto. Sin embargo, es un tema que debe ser nuevamente considerado por la comunidad nefrológica.

Palabras clave: Microhematuria. Proteinuria. Nefropatía IgA. Clasificación de Oxford.

Correspondencia: Eduardo Gutiérrez

Servicio de Nefrología.

Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

eduardogutmat90@gmail.com

* **Grupo formado por:**

Gutiérrez E, Zamora I, Ballarín JA, Arce Y, Jiménez S, Quereda C, Olea T, Martínez-Ara J, Segarra A, Bernis C, García A, Goicoechea M, García de Vinuesa S, Rojas-Rivera J, Praga M.

Persistent microhaematuria with negative or low proteinuria ABSTRACT

The level of proteinuria continues to be the clinical parameter that is best related to the development of long-term renal failure in glomerular pathologies. This quantity is particularly important when we analyse the progression of patients with IgA nephropathy. As such, the natural progression of patients with IgA who clinically present with normal kidney function, microhaematuria and low proteinuria had not been analysed comprehensively until the Spanish multicentre study herein analysed. After studying 141 Caucasian patients with biopsied IgA nephropathy and a "benign" clinical profile and after they were classified histologically in accordance with the new Oxford classification, it could be concluded that the renal prognosis of these patients was excellent. This is the first study in the literature that demonstrates the usefulness of this new classification in patients who clinically have normal renal function and proteinuria below 0.5g/day. The latest advances in the genetics of this disease, as well as in the collaboration of complement pathways in its pathophysiology mean that these results cannot be extrapolated to all the populations studied. In addition, the analysis and follow-up of microhaematuria has regained importance as an independent prognostic factor for developing renal failure, although there are no consistent studies in this regard yet. However, it is a subject that should be examined again by the nephrology community.

Keywords: Microhaematuria. Proteinuria. IgA nephropathy. Oxford classification.

Diferentes estudios han analizado los parámetros clínicos y bioquímicos que se relacionan con el riesgo de progresión a largo plazo en los pacientes afectos de nefropatía IgA (NIgA).

Clásicamente una proteinuria superior a 1 g/día, la presencia o desarrollo de hipertensión arterial (HTA) y la disminución del filtrado glomerular al diagnóstico han sido los factores pronósticos relacionados significativamente con el desarrollo de insuficiencia renal crónica (IRC)¹⁻³. Sin embargo, y a diferencia de otros procesos glomerulares, en los pacientes con NIGa una proteinuria entre 0,5-1 g/día se asocia también con el riesgo de desarrollar IRC⁴⁻⁶. Muchos de los trabajos que hablan del pronóstico de la NIGa no incluyen pacientes que solo presentan microhematuria y proteinuria escasa (0,5-1 g/día) al diagnóstico. Esto representa un porcentaje importante de pacientes, especialmente en los países con políticas «muy activas» de biopsia renal. Desde el punto de vista histológico, los dos predictores más potentes de la progresión de la nefropatía han sido el daño túbulo-intersticial y la presencia de glomerulosclerosis. De ahí que se pueda inferir que la mayor parte de los factores pronósticos que se utilizan para predecir el riesgo de pérdida de función renal a largo plazo hacen referencia a lesiones crónicas y avanzadas. Por lo tanto, está sobradamente justificada la necesidad de estudios para identificar variables pronósticas a partir de los datos obtenidos en el momento del diagnóstico o antes de que aparezcan lesiones de fibrosis renal avanzada en las biopsias renales.

La reciente clasificación de Oxford, validada en población adulta y pediátrica norteamericana y asiática y pendiente de validación definitiva en población europea (estudio VALIGA), pone de manifiesto que la presencia de lesiones histológicas de proliferación mesangial (M1), proliferación endocapilar (E1), hialinosis segmentaria y focal (S1) y afectación tubulointersticial (T1-2) son factores predictores independientes de progresión más allá de los parámetros clínicos (incluidos la proteinuria y el filtrado glomerular)^{7,8}. Sin embargo, esta clasificación no había sido validada en población que se manifiesta clínicamente con función renal normal y proteinuria escasa (proteinuria \leq 0,5 g/día).

En el estudio publicado recientemente bajo el título «*Long-term outcome of IgA nephropathy presenting with minimal or no proteinuria*» se reflejan los resultados de 141 pacientes caucásicos diagnosticados histológicamente de NIGa con función renal normal, proteinuria igual o inferior a 0,5 g/día y microhematuria persistente⁹. Se trata de un estudio del GLOSEN (Grupo de Estudio de Enfermedades Glomerulares de la Sociedad Española de Nefrología) en el que se incluyeron retrospectivamente los pacientes de ocho hospitales españoles que habían mantenido en el pasado una política «activa» de biopsia renal durante un prolongado período de tiempo (1975-2008). El 64 % de los pacientes estudiados fueron varones con una edad media de 23,7 años, seguidos durante una mediana de 108 meses, y ningún paciente presentó insuficiencia renal al diagnóstico. Tras este prolongado seguimiento, solo 5 (3,5 %) pacientes sufrieron un incremento del 50 % sobre su creatinina basal, y únicamente 1 (0,7 %) paciente lo sufrió del 100 %, no desarrollando ningún enfermo insuficiencia renal terminal. Al final del estudio, únicamente 21 (14,9 %) pacientes desarrollaron proteinuria superior a 0,5 g/día y solo 6 (4,2 %) de estos

21 alcanzaron una proteinuria mayor de 1 g/día, proteinuria que marca el riesgo de desarrollar insuficiencia renal terminal de forma significativa¹. A su vez, el incremento de la HTA en la población estudiada fue muy discreto, del 16,3 % al 21,3 %. Este estudio aporta información sobre el porcentaje de pacientes que alcanzan remisión clínica «espontánea», dato clínico que consideramos de gran relevancia. Aunque la remisión clínica espontánea había sido bien descrita con anterioridad, sin embargo no había sido estudiada de forma específica¹⁰. En este estudio, 53 pacientes (37,5 %) alcanzaron la remisión clínica espontánea, definida por la desaparición de la microhematuria, la presencia de una proteinuria menor o igual a 0,2 g/día y el mantenimiento de función renal y presión arterial normal.

Desde el punto de vista histológico, este es el primer estudio publicado en el que se aplica la clasificación de Oxford a pacientes con NIGa y proteinuria inferior a 0,5 g/día, y aporta interesantes datos. Lo primero que refleja, como era de esperar, es que las lesiones de proliferación endocapilar y de hialinosis segmentaria y focal son infrecuentes (8,5 y 15,6 %, respectivamente) y que el 95 % no tuvieron afectación tubulointersticial relevante. Sin embargo, las lesiones de proliferación mesangial aparecieron hasta en 46 (32,6 %) de los pacientes del estudio. Estos resultados tienen una gran trascendencia, pues, pese a la escasez de eventos, en el estudio multivariable se demostró que las lesiones de hialinosis segmentaria y focal fueron el único factor independiente asociado significativamente con la supervivencia renal (aumento $>$ 50 % creatinina sérica basal, objetivo primario). Por otro lado, la ausencia de proliferación mesangial superior al 50 % se asoció de forma significativa e independiente con la posibilidad de alcanzar la remisión espontánea en el estudio multivariable. A su vez, los pacientes con lesiones de hialinosis presentaron cifras basales de proteinuria mayores con un incremento significativamente más marcado a lo largo del seguimiento respecto a los que no las presentaban. El único paciente que duplicó sus cifras de creatinina sérica basal durante el seguimiento presentaba lesiones de M1E1S1T1. Todos estos datos ratifican la utilidad de la clasificación de Oxford en los pacientes con presentación «benigna».

Como se ha descrito en ensayos clínicos aleatorizados y controlados, la cuantía de la proteinuria tiene una gran influencia en la evolución renal a largo plazo, incluso en este tipo de pacientes con presentación y evolución favorable^{1-6,11,12}. De hecho, y para confirmar las afirmaciones previas, en este trabajo se pudo demostrar que la única variable clínica con influencia en la supervivencia renal fue la cuantía media de la proteinuria durante el seguimiento (*time-average* [TA]-proteinuria). La TA-proteinuria fue el único factor de riesgo clínico independiente que predijo el incremento de la creatinina basal en más del 50 % y paralelamente la proteinuria basal se relacionó de forma significativa con la probabilidad de alcanzar la remisión. Estos resultados ponen de relieve el papel crucial de la cuantía de la proteinuria en la evolución a largo plazo de esta patología. Además, hay que reseñar que esta evolución favorable se consiguió sin la necesidad de emplear tratamientos inmunosupresores. En los enfermos que desarrollaron proteinuria superior a 0,5 g/día o HTA se em-

plearon inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (IECA) o bloqueantes del receptor de angiotensina II (ARAI). Al final del seguimiento, 55 (41,8 %) pacientes estaban recibiendo IECA/ARAI.

Previamente a este estudio, solo los estudios asiáticos habían descrito el pronóstico de los pacientes con NIgA y proteinuria mínima. Estos trabajos, a diferencia del comentado en este artículo, ponen de manifiesto que el pronóstico renal de estos enfermos no fue tan favorable¹³⁻¹⁵. De hecho, en el estudio de Szeto et al., en el que se analizaron 72 pacientes chinos con función renal normal, normotensión y proteinuria inferior a 0,4 g/día, el 33 % desarrollaron una proteinuria superior a 1 g/día, el 26 % desarrolló HTA y hasta un 7 % deterioraron su función renal¹⁴. Estos resultados se han confirmado también en un estudio más reciente, realizado en 177 pacientes chinos normotensos y con proteinuria menor a 0,4 g/día, en el que hasta un 24 % desarrollaron insuficiencia renal y únicamente un 9 % alcanzó la remisión clínica¹⁵. Además de las posibles diferencias anatomo-patológicas que puedan existir entre los diferentes estudios presentados, es probable que diferencias en la susceptibilidad genética de la población asiática puedan explicar las diferencias pronósticas. Son numerosas y crecientes las observaciones que sugieren una significativa contribución genética a la patogénesis de la NIgA, contribuciones que se sustentan en estudios familiares y demográficos. Estas observaciones se inician con las diferencias en la prevalencia de la nefropatía en los diferentes grupos étnicos y se continúan con los importantes estudios de asociación genómica en los que se identifican locus DQ del sistema de histocompatibilidad HLA implicados de forma consistente con la susceptibilidad a desarrollar NIgA en grupos de pacientes de ascendencia europea y asiática, como han demostrado los recientes estudios de Feehally et al. y de Yu et al.^{16,17}. Los datos que con más fuerza han relacionado los factores genéticos con el desarrollo y la progresión de la NIgA han sido los aportados por los estudios de relación (*linkage*) realizados en familias, estudios que demuestran también su fuerte influencia en la composición de la IgA hipoglicosilada en suero¹⁸. Son diferentes los locus genéticos identificados en las formas familiares de NIgA que se han relacionado con la patogénesis de la nefropatía (6q22-q23, 2q36, 4q26-q31, 17q12-q22), aunque sigue sin identificarse un gen específico¹⁹. Aun así, uno de los estudios más importantes ha sido el publicado por Gharavi et al., en el que se demuestra, tras estudiar a población europea y asiática, la presencia de mutaciones en las proteínas reguladoras del factor de complemento H (CFHR) 1 y 3 del cromosoma 1q32 únicamente en la población asiática con NIgA, hallazgos que ponen sobre la mesa la posible implicación de la vía alterna del complemento en la patogénesis de esta entidad²⁰.

La información aportada por este estudio de 141 pacientes caucásicos es importante para establecer que la NIgA tiene un perfil de progresión y seleccionar los hallazgos clínicos y/o histológicos que puedan predecir una mala evolución. Dada la acertada política actual de no biopsiar a este grupo de pacientes, es muy improbable que se pueda repetir un estudio de estas

características. Sin embargo, dado que estos pacientes pueden desarrollar proteinuria, HTA e insuficiencia renal, es recomendable su seguimiento anual de por vida para monitorizar estos parámetros e iniciar tratamiento con IECA/ARAI en aquellos que desarrollen las alteraciones mencionadas. Sin embargo, no se debe olvidar que en este grupo de pacientes es fundamental realizar un amplio diagnóstico diferencial que incluya la hematuria familiar benigna (enfermedad de la membrana basal adelgazada), así como las causas más frecuentes de microhematuria con escasa proteinuria, sin olvidar todas aquellas entidades urológicas que se deben descartar con anterioridad. Quizás la decisión más importante es dilucidar qué microhematuria se debe evaluar y seguir clínicamente, dada su elevada frecuencia en la práctica clínica habitual, y con más razón a raíz del trabajo publicado en *JAMA* por Vivante et al., que ha revolucionado el posible papel pronóstico de la microhematuria²¹. La hematuria es un hallazgo común de las enfermedades que producen daño glomerular y su frecuencia estimada varía desde un 0,18 % a un 16,1 %, dependiendo de la población estudiada. La microhematuria aislada, si no se acompaña de HTA, proteinuria significativa o alteración de la función renal, se ha relacionado tradicionalmente con un buen pronóstico²². Sin embargo, la información vertida por el estudio de Vivante et al. de una población de un millón de soldados israelíes que se presentan con microhematuria aislada tras estudios de cribado ha venido a cambiar parcialmente la imagen que se tenía de este hallazgo clínico. En esta población joven (16-25 años) la prevalencia de microhematuria fue del 0,4 % en varones y del 0,2 % en mujeres tras prácticamente 22 años de seguimiento, lo que se asoció con una *hazard ratio* ajustada de 18,5 de desarrollar insuficiencia renal terminal. Sin embargo, y sin desmerecer la importancia del estudio, este carece de un seguimiento a lo largo del tiempo y de datos clínicos esenciales como proteinuria y desarrollo de HTA. Aunque el estudio objeto de este trabajo da luz sobre la posible evolución a largo plazo de los pacientes con NIgA y mínimas manifestaciones renales, no ha podido responder a la pregunta de cuál es el pronóstico de los pacientes con microhematuria y si es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de insuficiencia renal terminal. Aunque sospechamos que la desaparición de la microhematuria se puede relacionar con una evolución «benigna» de la NIgA, son necesarios estudios que tengan como objetivo primario este supuesto. En este estudio multicéntrico español se intentó relacionar la desaparición de la microhematuria con una mejor evolución renal, pero quizás la escasez de eventos renales imposibilitó establecer tal asociación.

Al igual que los estudios clásicos relacionaron los brotes de hematuria macroscópica con un buen pronóstico renal en los pacientes con NIgA, trabajos recientes han venido a desmentir dicha afirmación tras demostrar un riesgo de desarrollar IRC tras estos de al menos un 25 %^{23,24}, por lo que son necesarios más estudios que analicen los posibles factores implicados en la fisiopatología de la micro y macrohematuria que podrían ayudar a una mejor comprensión de la enfermedad y de su progresión²⁵⁻²⁸. Los nefrólogos he-

CONCEPTOS CLAVE

1. Como mensaje práctico, los resultados de este estudio refuerzan la actual postura predominante entre la comunidad nefrológica de no realizar biopsia renal en pacientes con presentaciones clínicas similares a las del estudio: microhematuria persistente con proteinuria negativa o inferior a 0,5 g/día.
2. El diagnóstico más probable en estos pacientes es una NIgA o una hematuria familiar benigna, pero el establecimiento definitivo de ambos diagnósticos mediante biopsia renal (que exige realizar inmunofluorescencia y microscopía electrónica) no parece necesario, a luz de la excelente evolución de la gran mayoría de los casos.
3. Es necesario realizar un amplio diagnóstico diferencial de la microhematuria al inicio del seguimiento.
4. Es recomendable realizar un control periódico de estos pacientes (revisiones cada uno o tres años, en función de las características individuales), por la posibilidad de un incremento gradual de la proteinuria a lo largo de los años.

mos prestado gran parte de nuestra atención a la proteinuria y la hematuria ha podido ser un factor olvidado que debe ser retomado en la actualidad.

En definitiva, consideramos que este estudio aporta una información importante para caracterizar la historia natural y el pronóstico de la NIgA, demostrando por primera vez la utilidad de la clasificación de Oxford en este grupo de enfermos.

Agradecimientos

Este trabajo ha recibido ayudas del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) a través de los proyectos FIS 10/02668, FIS 10/02581, FIS 13/00802 y el Programa Miguel Servet (CP 10/00479).

Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés potenciales relacionados con los contenidos de este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reich HN, Troyanov S, Scholey JW, Cattran DC; Toronto Glomerulonephritis Registry. Remission of proteinuria improves prognosis in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:3177-83.
2. Bartosik LP, Lajoie G, Sugar L, Cattran DC. Predicting progression in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001;38:728-35.
3. Alamartine E, Sabatier JC, Guerin C, Berliet JM, Berthoux F. Prognostic factors in mesangial IgA nephropathy. An extensive study with univariate and multivariate analysis. *Am J Kidney Dis* 1991;18:12-9.
4. Barbour SJ, Reich HN. Risk stratification of patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2012;59:865-73.
5. Berthoux F, Mohey H, Laurent B, Mariat C, Afiani A, Thibaudin L. Predicting the risk for dialysis or death in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:752-61.
6. Coppo R, D'Amico G. Factors predicting progression of IgA nephropathies. *J Nephrol* 2005;18:503-12.
7. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society, Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, Troyanov S, et al. The Oxford Classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney Int* 2009;76:534-45.
8. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society, Coppo R, Troyanov S, Camilla R, Hogg RJ, Cattran DC, Cook HT, et al. The Oxford IgA nephropathy clinicopathological classification is valid for children as well as adults. *Kidney Int* 2010;77:921-7.
9. Gutiérrez E, Zamora I, Ballarín JA, Arce Y, Jiménez S, Quereda C, et al.; Grupo de Estudio de Enfermedades Glomerulares de la Sociedad Española de Nefrología (GLOSEN). Long-term outcome of IgA nephropathy presenting with minimal or no proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1753-60.
10. Costa RS, Droz D, Noel LH. Long-standing spontaneous clinical remission and glomerular improvement in primary IgA nephropathy (Berger's Disease). *Am J Nephrol* 1987;7:440-6.
11. Praga M, Gutiérrez E, González E, Morales E, Hernández E. Treatment of IgA nephropathy with ACE inhibitors: A randomized and controlled trial. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1578-83.
12. Coppo R, Peruzzi L, Amore A, Piccoli A, Cochat P, Stone R, et al. IgACE: A placebo-controlled, randomized trial of angiotensin-converting enzyme inhibitors in children and young people with IgA nephropathy and moderate proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1880-8.
13. Lai FM, Szeto CC, Choi PC, Li PK, Chan AW, Tang NL, et al. Characterization of early IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2000;36:703-8.
14. Szeto CC, Lai FM, To KF, Wong T, Chow KM, Choi PC, et al. The natural history of immunoglobulin A nephropathy among

- patients with hematuria and minimal proteinuria. *Am J Med* 2001;110:434-7.
15. Shen P, He L, Huang D. Clinical course and prognostic factors of clinical early IgA nephropathy. *Neth J Med* 2008;66:231-3.
 16. Feehally J, Farrall M, Boland A, Gale DP, Gut I, Heath S, et al. HLA has strongest association with IgA nephropathy in genome-wide analyses. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1791-7.
 17. Yu XQ, Li M, Zhang H, Low HQ, Wei X, Wang JQ, et al. A genome-wide association study in Han Chinese identifies multiple susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet* 2011;44:178-82.
 18. Barratt J, Feehally J. Primary IgA nephropathy: new insights into pathogenesis. *Semin Nephrol* 2011;31:349-60.
 19. Glascock RJ. The pathogenesis of IgA nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011;20:153-60.
 20. Gharavi AG, Kyriluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nature Genetics* 2011;43:321-7.
 21. Vivante A, Afek A, Frenkel-Nir Y, Tzur D, Farfel A, Golan E, et al. Persistent asymptomatic isolated microscopic hematuria in Israeli adolescents and young adults and risk for end-stage renal disease. *JAMA* 2011;306:729-36.
 22. Gale D. How benign is haematuria? Using genetics to predict prognosis. *Pediatr Nephrol* 2013;28:1183-93.
 23. Gutiérrez E, González E, Hernández E, Morales E, Martínez MA, Usera G, et al. Factors that determinate an incomplete recovery of renal function in macrohematuria-induced acute renal failure of IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:51-7.
 24. Gutiérrez E, Egido J, Rubio-Navarro, Buendía I, Blanco-Colio LM, Toldos O, et al. Oxidative stress, macrophage infiltration and CD163 expression are determinants of long-term renal outcome in macrohematuria-induced acute kidney injury of IgA nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2012;121:c42-53.
 25. Moreno JA, Martín-Cleary C, Gutiérrez E, Toldos O, Blanco-Colio LM, Praga M, et al. AKI associated with macroscopic glomerular hematuria: clinical and pathophysiologic consequences. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:175-84.
 26. Moreno JA, Martín-Cleary C, Gutiérrez E, Rubio-Navarro A, Ortiz A, Praga M, et al. Haematuria: the forgotten CKD factor? *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:28-34.
 27. Eitner F, Floege J. In search of a better understanding of IgA nephropathy-associated hematuria. *Kidney Int* 2012;82:513-5.
 28. Floege J. The pathogenesis of IgA nephropathy: what is new and how does it change therapeutic approaches? *Am J Kidney Dis* 2011;58:992-1004.