

Efeito do Lisinopril sobre Parâmetros Cardíacos e Mortalidade no Infarto Experimental em Ratos

Leonardo A. M. Zornoff, Sérgio A. R. Paiva, Beatriz B. Matsubara, Luiz S. Matsubara, Paulo J. F. Tucci, Joel Spadaro

Botucatu, SP

Objetivo - Avaliar os efeitos da administração precoce (<24h) de inibidor de enzima conversora da angiotensina em variáveis evolutivas da remodelação ventricular e mortalidade, após infarto agudo do miocárdio (IAM).

Métodos - Ratos Wistar, pesando entre 200 a 250g, foram submetidos a toracotomia esquerda e estudados em 3 grupos: grupo não infartado (S, n=9); grupo infartado e tratado com lisinopril (L, n=38), na dose de 20mg/kg/dia, v.o., e grupo infartado e não tratado (NT, n=24). Três meses após a cirurgia, os animais foram sacrificados e os corações estudados pela técnica de Langendorff. Como parâmetro de contratilidade miocárdica foi utilizada, em contração isovolumétrica, a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (VE), obtida em diferentes níveis de pressão diastólica, por meio de incrementos de 5mmHg variando de 0 a 30mmHg. Foram obtidos, também, peso corporal do rato (PC), peso do ventrículo direito (PVD) e a relação PVD/PC.

Resultados - Três meses após a cirurgia, a mortalidade entre os grupos foi: S=0, L= 34,4% e NT= 54,4% ($p>0,05$ para LxNT). Para infartos envolvendo <40% do VE, a relação PVD/PC foi S= L<NT ($p<0,05$) e a função sistólica de VE foi S>L>NT ($p<0,05$). Para infartos >40% do VE, a relação PVD/PC foi S<L= NT ($p<0,05$) e a função sistólica S>L> NT ($p<0,05$).

Conclusão - O lisinopril não interferiu na mortalidade pós-IAM, embora tenha reduzido o risco de óbito em 49%. A droga atenuou o processo de remodelação ventricular, como um todo, preservando, particularmente o desempenho sistólico e prevenindo a hipertrofia miocárdica, em infartos que comprometeram <40% do VE.

Palavras-chave: infarto do miocárdio, rato, lisinopril

Effect of Lisinopril on Cardiac Parameters and Mortality after Myocardial Infarction in Rats

Purpose - To analyse the effect of early (<24h) administration of lisinopril on ventricular remodeling and mortality after myocardial infarction (MI) in rats.

Methods - Wistar rats weighing 200-250g were submitted to ligation of the left coronary artery (LCA) and divided into three groups: SHAM (S, n=9); infarcted and lisinopril (20mg/kg/day) treated rats (L, n=38); infarcted and non-treated animals (NT, n=24). Three months later, the cardiac function was studied in isolated heart preparation according to the Langendorff technique. Starling curves were constructed using fluid injection in the left ventricular balloon, which permitted to alter the diastolic pressure range from 0 to 30mmHg by means of pressure increments of 5mmHg. Body weight (BW), right ventricular weight (RVW), and RVW/BW were also determined.

Results - Three months after the surgery, the comparative mortality rate among groups was: S=0; L= 34.4% and NT= 54.4% ($p>0.05$, for L vs NT). In infarctions <40% of the left ventricle (LV), the RVW/BW relation was S= L<NT ($p<0.05$); the left ventricular systolic pressure was S>L>NT ($p<0.05$). In infarctions >40% of LV, the RVW/BW relation was S<L=NT ($p<0.05$). For the Starling curves, the results were S>L>NT ($p<0.05$).

Conclusion - In our model lisinopril did not interfere with post-infarction mortality of rats, although decreasing the mortality risk in 49%, in the treated group. The drug also altered the remodeling process, preventing hypertrophy and systolic dysfunction after MI, mainly in infarctions <40% of LV.

Key-words: myocardial infarction, rat, lisinopril

Arq Bras Cardiol, volume 68 (n° 3), 175-179, 1997

Na fase inicial do IAM, podemos observar dilatação ventricular aguda, caracterizada por adelgaçamento e distensão da região comprometida. Esta alteração é denominada expansão do infarto e resulta do estiramento do tecido isquêmico em consequência da desintegração do colágeno interfibrilar. Na fase tardia, pode ocorrer dilatação adicional do ventrículo esquerdo (VE), em resposta à expansão, ocorrendo essa modificação cavitária tardia às custas do tecido não infartado e sendo relacionada à hipertrofia cardíaca excêntrica.

A RV guarda estreita relação com a fisiopatologia do infarto agudo, pois sua presença e intensidade estão relacionadas, com maior incidência, na formação de aneurismas, ruptura cardíaca, piora funcional, arritmias e maior mortalidade².

Como terapêutica para prevenir ou atenuar o processo de RV, têm sido usados os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA). Existem dúvidas, entretanto, sobre quais corações submetidos a infarto beneficiar-se-iam com o uso dos IECA e qual o melhor momento para o início da medicação.

Alguns autores defendem o uso precoce (<24h pós-IAM) dos IECA, pois estes diminuiriam o estresse parietal, desencadeando menor estímulo para a RV³. Outros argumentam que o uso precoce da droga apresentaria efeitos deletérios, pois poderiam causar instabilidade hemodinâmica, pela vasodilatação, reduzindo a pressão arterial, com conseqüente hipoperfusão coronária, havendo, além disso, retardo da cicatrização do tecido infartado, tornando essa região mais suscetível a forças deformantes⁴.

O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da administração precoce de IECA sobre possíveis efeitos deletérios da RV. Assim, foram utilizados parâmetros morfo-funcionais e a mortalidade global pós-IAM, em diferentes tamanhos de IAM.

Métodos

Foram utilizados ratos Wistar (machos), pesando entre 200-250g. O IAM foi produzido de acordo com método descrito previamente⁵ e já padronizado em nosso laboratório⁶. Em resumo, após anestesia por inalação de éter, foi realizada toracotomia esquerda, entre o 4º e 5º espaços intercostais. O coração foi exteriorizado e a artéria coronária esquerda ligada, a aproximadamente 2mm da origem, com fio de polivinil (5-0, ethicon), entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar. A seguir, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica, o tórax fechado e os animais mantidos em gaiolas, para recuperação.

Após 12h, que corresponde ao período por nós estipulado de recuperação cirúrgica, foram constituídos três grupos de animais: grupo NT (n=24) formado pelos animais infartados que não receberam medicação; grupo L (n=38) constituído por animais infartados que receberam, por três meses, lisinopril* (20mg/kg/dia) dissolvido em água de beber. Esta dose acarreta efeitos antiproliferantes e anti-

hipertensivos⁷; grupo S (n=9) formado pelos animais controle, submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, executando-se a ligadura da artéria coronária. A partir de então, os animais foram colocados em observação, registrando-se a mortalidade nos três grupos estudados.

Após três meses, os animais sobreviventes receberam pentobarbital sódico (50mg/kg) e heparina (1000UI), por via intraperitoneal, sendo ventilados com pressão positiva, com oxigênio a 100%. A seguir, o tórax foi aberto, as carótidas ligadas e a aorta cateterizada com cânula de metal nº 15, iniciando-se a perfusão miocárdica retrógrada, com solução nutriente de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição, em mM: 115 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO₄; 1,25 CaCl₂; 1,15 NaH₂SO₄; 1,2 Na₂SO₄; 25 NaHCO₃; 11 glicose. A solução citada foi acrescida de insulina 10U/l e manitol, na concentração de 8mM, para diminuição de edema, assegurando maior preservação miocárdica⁸.

Os corações foram, então, removidos da caixa torácica e colocados em aparelho de estudo de coração isolado, tamanho 3-tipo 830 (*Hugo Sachs Electronic* - Grunstasse, Germany), com pressão de perfusão constante de 75mmHg. A solução nutriente era continuamente oxigenada com mistura gasosa de 95% de O₂ e 5% CO₂, mantendo-se a pressão parcial de oxigênio entre 500 a 600mmHg, à temperatura de 37°C, com pH entre 7,3 e 7,4.

O átrio esquerdo foi aberto e o ápice do VE puncionado com agulha, de modo a drenar a cavidade ventricular, evitando-se acúmulo de líquido no seu interior. Um balão de borracha, tipo látex, atado a tubo rígido de duplo lúmen foi colocado na cavidade ventricular. Uma das comunicações do tubo rígido foi conectada a transdutor de pressão (Stathan P₂₃ XL) e a outra a uma seringa de 1ml.

A musculatura atrial direita, compreendendo a região do nódulo sino-atrial, foi extirpada e eletrodo de marca-passo artificial colocado no miocárdio do ventrículo direito (VD) para se manter, artificialmente, a frequência cardíaca entre 180 e 200bpm.

Por meio da preparação descrita, curvas de Starling foram obtidas, com injeção de líquido no balão, permitindo variar a pressão diastólica (PD) de 0 a 30mmHg, através de incrementos graduais de 5mmHg, registrando-se a pressão sistólica (PS) correspondente. Em preparações assim instaladas, em que o coração opera em contrações isovolumétricas, a PS é considerada um bom indicador da capacidade contrátil⁹. Após o estudo funcional, os VD e VE foram separados e pesados. Para a estimativa do grau de hipertrofia ventricular, foi usado o peso do VD, ajustado para o peso corporal do rato (PVD/PC).

Após manutenção por 24h em solução de formol a 10%, o VE foi preparado para a determinação do tamanho do infarto, sendo colocado em solução com álcool 70%, permanecendo por mais 24h. A seguir, realizou-se em cada coração corte transversal a 6mm do ápice para a base, pelo fato de este corte refletir a média dos resultados de cortes de todo ventrículo¹⁰. O tecido miocárdico obtido foi corado em lâmina, por meio de solução de hematoxilina-eosina (HE) e utilizado para análise morfométrica, realizada pelo siste-

*Gentilmente cedido pelo laboratório Zeneca

ma de análise de imagens *mini-mop* (Kontron Eletronic Group), que permitiu medir os comprimentos epicárdicos e endocárdicos dos segmentos infartados e não infartados e calcular a porcentagem de comprimento infartado em relação ao comprimento total do VE¹¹. Os infartos que corresponderam a valor >40% do VE foram considerados infartos grandes; aqueles que corresponderam <40% do VE foram considerados infartos pequenos, dividindo os animais dos grupos NT e L em função dos diferentes tamanhos de infarto.

Em relação à análise estatística, utilizamos a curva de Kaplan Meier para análise da mortalidade, sendo que as diferenças entre as curvas foi analisada pelo modelo de regressão de Cox. Para a estimativa de hipertrofia cardíaca foi utilizado o gráfico de cinco pontos de Tukey, em que é plotada uma "caixa" cujas linhas superior e inferior representam os valores dos quartis 3 e 1 e a linha de dentro da caixa corresponde à mediana; os limites superior e inferior das barras representam, respectivamente, os valores dos percentis 95 e 5 da amostra. As diferenças observadas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Para comparação dos resultados obtidos no estudo funcional, utilizamos análise de variância. Os cálculos foram executados pelo software SAS. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Na figura 1 estão apresentados os resultados do estudo funcional realizado em corações com infartos pequenos. Podemos verificar que, para todos os níveis de PD, as PS são maiores no grupo S em relação aos grupos L e NT ($p < 0,05$). Por sua vez, as PS do grupo L foram estatisticamente maiores que as do grupo NT. Resultados semelhantes foram obtidos em corações com grandes infartos (fig. 2).

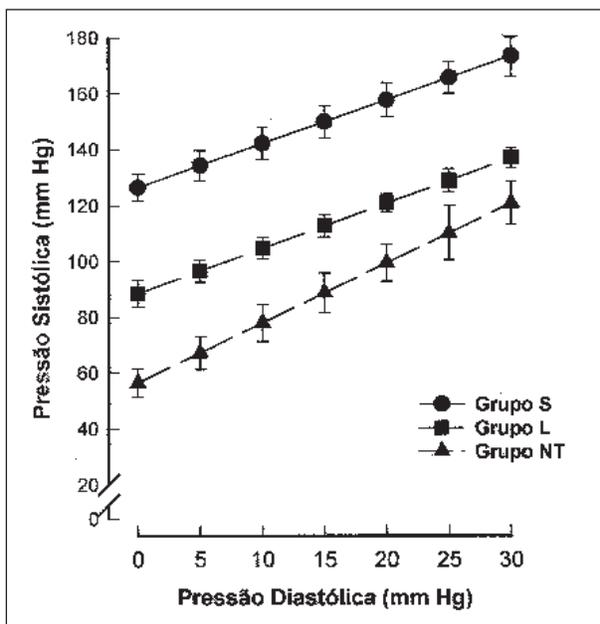


Fig. 1 - Representação gráfica, na forma de curvas médias \pm erro padrão do estudo funcional realizado em corações com infartos pequenos. Grupo S= controle; grupo L= lisinopril e grupo NT= não tratado. Verificado grupo S>L>NT ($p < 0,05$).

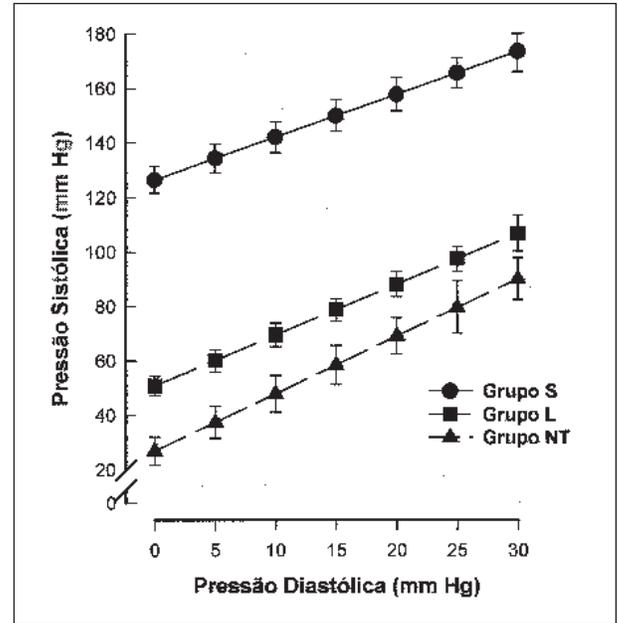


Fig. 2 - Representação gráfica, na forma de curvas médias \pm erro padrão do estudo funcional realizado em corações com infartos grandes. Grupo S= controle; grupo L= lisinopril e grupo NT= não tratado. Verificado grupo S>L>NT ($p < 0,05$).

Em relação à estimativa de hipertrofia cardíaca, em infartos pequenos verificou-se menor relação PVD/PC nos corações de animais tratados com lisinopril em relação aos animais não tratados ($p < 0,05$). Por outro lado, a diferença entre o grupo controle e o grupo L não mostrou significância estatística (fig. 3). Para grandes infartos, os grupos L e NT apresentaram maior relação PVD/PC em comparação ao grupo S ($p < 0,05$), não apresentando, porém, diferenças estatisticamente significantes entre si (fig. 4).

Os dados referentes à mortalidade estão apresentados na figura 5. Verificou-se que, após o período de observação de três meses, a mortalidade entre os grupos estudados foi 0 para o grupo S; 34,4% para o grupo L e 54,4% para o grupo NT. A diferença entre os grupos L e NT não atingiu significância estatística. A razão de risco, que define a pro-

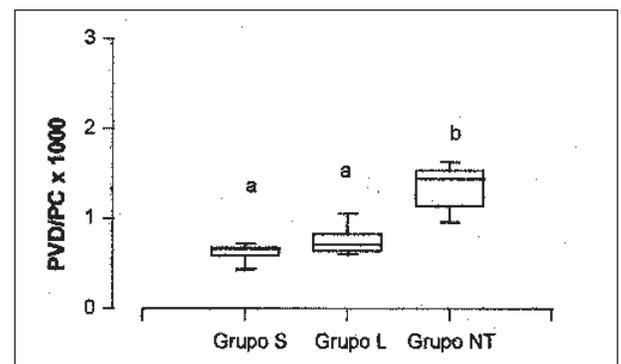


Fig. 3 - Representação da estimativa de hipertrofia cardíaca realizado em corações com infartos pequenos, na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey, analisada pela relação peso do ventrículo direito (PVD) normalizada para o peso corporal (PC) do rato. Grupo S= controle; grupo L= lisinopril e grupo NT= não tratado. Verificado grupo S= L<NT ($p < 0,05$).

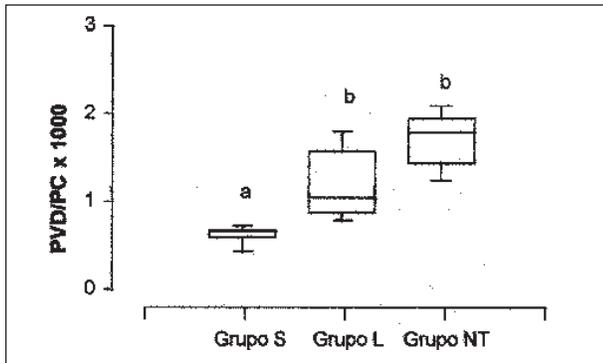


Fig. 4 - Representação da estimativa de hipertrofia cardíaca realizado em corações com infartos grandes, na forma de gráfico de cinco pontos de Tukey, analisada pela relação peso do ventrículo direito (PVD) normalizada para o peso corporal (PC) do rato. Grupo S= controle, grupo L= lisinopril e grupo NT= não tratado. Verificado grupo S<L=NT (p<0,05).

habilidade de óbito, entre os grupos NT e L foi 1,490, ou seja, o risco de um animal não tratado morrer foi 49% maior do que o animal tratado, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa.

Discussão

Os resultados do presente trabalho evidenciaram o efeito benéfico do uso precoce do lisinopril, pós-IAM, em variáveis evolutivas da remodelação miocárdica.

As variações da PS mostram que o IAM acarretou piora do desempenho cardíaco, diretamente relacionada ao tamanho do infarto. O lisinopril mostrou-se eficiente na melhora da capacidade contrátil do miocárdio, pois, tanto para infartos grandes como para infartos pequenos, a PS dos animais tratados foi maior que a dos animais não tratados.

A relação peso ventricular/peso corpóreo, apesar de ser um índice indireto de hipertrofia cardíaca, é utilizada em diversos modelos experimentais^{7,12}. No IAM, após a oclusão coronária, instala-se processo inflamatório na região infartada, caracterizado por edema miocárdico e infiltrado celular. A reparação do IAM completa-se pela substituição da região necrosada, por cicatriz fibrosa, podendo ser seguida de hipertrofia da região não infartada¹³. A complexa se-

quência de eventos, reabsorção de edema e de tecido miocárdio necrótico, qualidade da cicatriz e grau de hipertrofia, pode interferir com o peso do ventrículo infartado de modo a não refletir seu grau de hipertrofia¹⁴. Em função do comprometimento do VE infartado, ocorrem alterações hemodinâmicas (hipertensão arterial pulmonar) e neuro-humorais (aumento da concentração de angiotensina II e catecolaminas, entre outros). Estes eventos levam a aumento da massa do ventrículo contralateral, caracterizada por crescimento do miócito, edema e acúmulo de colágeno, que estão em correlação direta com o tamanho da área infartada¹⁵. Diante do exposto, embora o aumento da massa ventricular direita não espelhe, exclusivamente, o processo hipertrófico, a relação PVD/PC é aceita na literatura como parâmetro de crescimento celular, neste modelo^{14,16}. Estes achados foram reafirmados em trabalho anterior, em nosso laboratório, onde se verificou que a relação PVD/PC era maior em ratos infartados e o diâmetro transversal dos miócitos do VD, significativamente maior do que nos animais controle¹⁷, 21 dias após a ligação da artéria coronária esquerda.

Em relação ao comportamento da relação PVD/PC, os resultados variaram em função do tamanho do infarto. Nos grandes infartos, a administração do IECA não preveniu a ocorrência de hipertrofia. No caso de pequenos infartos, entretanto, o lisinopril preveniu a hipertrofia adaptativa pós-IAM, fato não observado nos animais não tratados. Apoiando nossos resultados, outros trabalhos identificaram variações na capacidade de atuação dos IECA em função do tamanho do infarto^{18,19}. Nesses trabalhos, os animais que obtiveram melhor resposta aos IECA, foram aqueles com infartos comprometendo entre 20 e 40% do VE.

Outro aspecto relevante, observado na presente investigação, refere-se à mortalidade. Apesar dos animais do grupo NT apresentarem risco de óbito 49% maior que os animais do grupo L, a mortalidade entre os grupos não atingiu significância estatística. Assim interpretados, nossos resultados são discordantes dos obtidos em outros trabalhos^{19,20}, que verificaram diminuição da mortalidade com o uso de IECA pós-IAM. A explicação para os resultados divergentes poder-se-ia basear na duração das pesquisas, pois enquanto aqueles autores observaram os animais por um período de um ano, o nosso tempo de seguimento foi de três meses. Na mesma linha de raciocínio, nossos dados poder-se-iam superpor a resultados analisados nos estudos multicêntricos ISIS 4 e GISSI 3. Nesses trabalhos, o objetivo foi testar o efeito da administração precoce de IECA em pacientes estudados na fase aguda do infarto^{21,22}, cujas condições cardiocirculatórias não eram previamente estabelecidas. Os indivíduos que receberam IECA apresentaram mortalidade que, apesar de estatisticamente menor que a dos pacientes não tratados, esteve próxima ao limite de rejeição estatística (P=0,04). Em ambos os trabalhos, entretanto, o período de seguimento foi muito curto, respectivamente cinco e seis semanas, o que poderia ter influenciado na análise da mortalidade.

Para corroborar estas observações, citaríamos os dados dos estudos SAVE²³ e TRACE²⁴, nos quais demons-

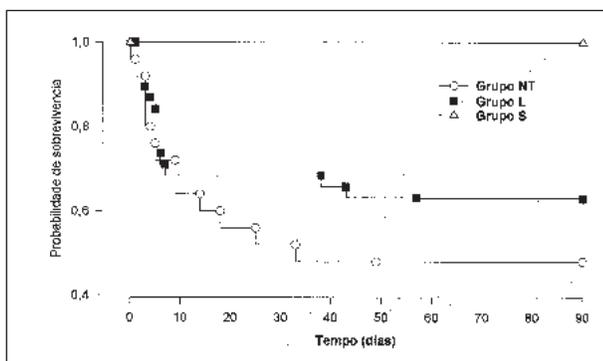


Fig. 5 - Representação gráfica da mortalidade, na forma de "curva de Kaplan-Meier" entre os grupos tratado (L) e não tratados (NT). A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa.

trou-se que, em presença de disfunção ventricular pós-IAM, o uso dos IECA torna-se fator protetor de mortalidade, apenas em períodos superiores a 12 meses.

Assim, os dados disponíveis até o momento admitem a suposição de que parâmetros morfo-funcionais possam ser avaliados precocemente pós-IAM. Para análises relativas à mortalidade, porém, seria mais plausível utilizar um período maior de observação.

Em conclusão, o conjunto destes resultados permite a afirmação de que a administração precoce de lisinopril não diminuiu a mortalidade, embora tenha reduzido o risco de

óbito em 49%, sugerindo que se o tempo de observação fosse maior, poderia ter ocorrido diferença estatística entre grupos. Outrossim, o uso da droga atenuou o processo de remodelação pós-IAM, particularmente em infartos comprometendo menos do que 40% do VE.

Agradecimentos

À Profa. Liciane Vaz de Arruda Silveira Chalita, aos Srs. Vitor M. Souza, José Carlos Georgette e à Sra. Valéria Maria Ricarelli de Oliveira pela colaboração prestada.

Referências

1. Pfeffer MA, Braunwald E - Ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 1990; 81: 1161-72.
2. Braunwald E, Pfeffer MA - Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. *Am J Cardiol* 1991; 68: 1D-6D.
3. Latini R, Maggioni AP, Flather M, Sleight P, Tognoni G - Ace inhibitor use in patients with myocardial infarction. Summary of Evidence from Clinical Trials. *Circulation* 1995; 92: 3132-7.
4. Swedberg H, Held P, Kjekshvs J, Rasmussen K, Ryden L, Wedel H - Effects of the early administration of enalapril on mortality in patients with acute myocardial infarction (Consensus II). *N Engl J Med* 1992; 327: 678-84.
5. Maclean D, Fishbein MC, Maroko PR, Braunwald E - Hyaluronidase-induced reduction in myocardial infarct size. *Science* 1976; 194: 199-200.
6. Spadaro J, Hashimoto LM, Franco RSS, Bregagnollo EA, Tucci PJF - Efeito da administração prévia de amiodarona na incidência precoce de fibrilação ventricular durante isquemia miocárdica experimental. *Arq Bras Cardiol* 1984; 42: 25-9.
7. Habour A, Heneger JR, Devineri VR, Janichi JS - Prevention of angiotensin II induced myocyte necrosis and coronary vascular damage by lisinopril and losartan in the rat. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 543-8.
8. Zornoff LAM, Paiva SAR, Tornero MTT, Carvalho MSS, Tucci PJF - Influência do acréscimo de manitol à solução nutriente no desempenho mecânico e no grau de edema miocárdico de corações isolados de ratos. *Arq Bras Cardiol* 1995; 64: 225-9.
9. Tucci PJF, Bregagnollo EA, Spadaro J, Cicogna AC, Ribeiro MCL - Length dependence of activation studied in the isovolumic blood-perfused dog heart. *Circ Res* 1984; 55: 59-66.
10. Oh B-H, Ono S, Rockman HR, Ross Jr J - Myocardial hypertrophy in the ischemic zone induced by exercise in rats after coronary reperfusion. *Circulation* 1993; 87: 598-607.
11. Kalkman EAJ, van Suylen RJ, van Disk JPM, Saxena PR, Schoemaker RG - Chronic aspirin treatment affects collagen deposition in non-infarcted myocardium during remodelling after coronary artery ligation in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2483-94.
12. Chevalier B, Amrani FC-E, Heymes C, Swyngh E, Dauw B - Molecular basis of regression of cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol* 1994; 73: 10C-17C.
13. Fishbein MC, Maclean, Maroko PR - Experimental myocardial infarction in the rat. *Am J Pathol* 1978; 90: 57-70.
14. Rubin SA, Fishbein MC, Swan HJC - Compensatory hypertrophy in the heart after myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol* 1983; 1: 1435-41.
15. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC et al - Myocardial infarct size and ventricular functions in rats. *Circ Res* 1979; 44: 503-12.
16. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E - Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol* 1991; 260: H1406-H1414.
17. Spadaro J, Cicogna AC, Tucci PJF, Cury PR, Montenegro MR - Morphometric evaluation of the time course of right ventricular hypertrophy after left coronary artery ligation in rats. *Brz Med Biol Res* 1989; 22: 517-22.
18. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E - Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985; 57: 84-95.
19. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P - Survival after an experimental myocardial infarction: Effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72: 406-12.
20. Pfeffer JM - Progressive ventricular dilation in experimental myocardial infarction and its attenuation by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* 1991; 68: 17D-25D.
21. ISIS-4 Collaborative Group - A randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1995; 345: 669-850.
22. GISSI-3 - Effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6 week mortality and ventricular function after acute myocardial infarction. *Lancet* 1994; 343: 1115-22.
23. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA et al - Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction: Results of the survival and ventricular enlargement trial. *N Engl J Med* 1992; 327: 669-77.
24. Kober LARS, Torp-Pedersen C, Carlsen JE et al - A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1995; 333: 1670-6.