

## Avaliação de alteração gustatória em pacientes com otite média crônica

## Gustatory Alteration Evaluation in Patients with Chronic Otitis Media

Felippe Felix<sup>1</sup>, Shiro Tomita<sup>2</sup>, Basílio de Bragança  
Pereira<sup>3</sup>, Jamerson Reis Cordeiro<sup>4</sup>, Guilherme  
Carleti<sup>5</sup>, Fernando de Souza Barros<sup>6</sup>, Gustavo  
Augusto Porto Sereno Cabral<sup>7</sup>

Palavras-chave: colesteatoma, otite média supurativa, paladar.  
Keywords: cholesteatoma, suppurative otitis media, taste.

### Resumo / Summary

Muitos estudos mostraram a consequente alteração do paladar após cirurgia otológica. Entretanto, poucos reportaram essa alteração como uma queixa de pacientes com otite média crônica (OMC) previamente à cirurgia. **Objetivo:** Avaliar alterações na função gustatória na área inervada pelo nervo corda do tímpano em pacientes com OMC ainda não submetidos à cirurgia. **Material e Métodos:** O ensaio clínico, com teste gustatório baseado em “tiras gustativas” com diferentes concentrações de sal, doce, amargo e azedo, foi realizado em 45 pacientes com OMC colesteatomatosa e não-colesteatomatosa unilateral, nunca antes submetidos à cirurgia otológica, utilizando a metade da língua do lado livre de doença otológica como controle. As notas variavam de 0 a 16. **Resultados:** 25 pacientes apresentavam colesteatoma e o restante OMC não-colesteatomatosa. A pontuação média foi de 6,65 para o lado afetado e 9,93 para a metade da língua do lado sadio ( $p < 0,001$ ). Nenhum paciente se queixava de alteração do paladar antes do exame. Encontramos 24 casos de hipogeusia do lado afetado, sendo 8 (17,7%) casos de ageusia. Houve uma relação entre tempo de doença ( $p = 0,07$ ) e colesteatoma ( $p = 0,055$ ) com piora da sensibilidade gustativa. **Conclusão:** Pacientes com OMC podem apresentar alteração gustativa, mesmo na ausência de queixas.

Many studies have shown the consequent gustatory alteration caused by ear surgeries. However, few have reported this alteration in patients with chronic otitis media (COM), prior to surgical treatment. **Aim:** to identify gustatory alterations due to chorda tympani nerve involvement in patients with COM without prior surgery. **Methods:** Clinical essay, with tests based on “taste strips” with different concentrations of salt, sweet, bitter, and sour, was performed in 45 patients with unilateral cholesteatomatous or suppurated COM not previously submitted to otological surgery, using the disease-free ear on the contralateral side as control. The score ranged between 0 and 16. **Results:** A total of 25 patients presented cholesteatoma and 20 had non-cholesteatomatous disease. The mean score was 6.65 for the affected side and 9.93 for the half of the tongue on the side of the healthy ear ( $p < 0.001$ ). No patients had complained of gustatory alterations before the examination. Among the 24 patients with unilateral hypogeusia, eight cases of unilateral ageusia were found on the affected side. There was an association between cholesteatoma ( $p = 0.055$ ), disease duration ( $p = 0.07$ ) and worsening in gustatory sensitivity. **Conclusion:** Patients with COM can have gustatory alterations, even in the absence of complaints.

<sup>1</sup> Mestrando da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Médico do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ.

<sup>2</sup> Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da UFRJ, Chefe do Serviço de Otorrinolaringologia do HUCFF da UFRJ.

<sup>3</sup> Professor Titular de Bioestatística da UFRJ, Coordenador do Núcleo de Assessoria Estatística do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ.

<sup>4</sup> Acadêmico de Medicina da UFRJ, Aluno da Disciplina de Iniciação Científica em Otorrinolaringologia da UFRJ.

<sup>5</sup> Acadêmico de Medicina da UFRJ, Aluno da Disciplina de Iniciação Científica em Otorrinolaringologia da UFRJ.

<sup>6</sup> Acadêmico de Medicina da UFRJ, Aluno da Disciplina de Iniciação Científica em Otorrinolaringologia da UFRJ.

<sup>7</sup> Acadêmico de Medicina da UFRJ, Aluno da Disciplina de Iniciação Científica em Otorrinolaringologia da UFRJ.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da BJORL em 23 de março de 2008. cod. 5782

Artigo aceito em 2 de novembro de 2008.

---

## INTRODUÇÃO

---

Durante uma cirurgia otológica, o nervo corda do tímpano é constantemente exposto e pode ser submetido a estiramento ou até secção no procedimento. Estas intercorrências podem levar à disgeusia, hipogeusia ou ageusia, que são, na maioria das vezes, queixas transitórias no pós-operatório.

Muitos estudos mostraram a conseqüente alteração do paladar após cirurgia otológica, visando tratamento da otite média crônica e da otosclerose<sup>1-3</sup>. No entanto, poucos estudos reportaram alteração de paladar como um sinal ou sintoma de pacientes com otite média crônica previamente à cirurgia.

Este tipo de alteração já era relatado por Vlasto<sup>4</sup>, em 1930. Ho<sup>5</sup> também descreveu esse achado em um pequeno grupo de relatos de casos. Arnold<sup>6</sup> mostrou evidência clínica da vulnerabilidade do nervo corda do tímpano em pacientes com doença crônica da orelha média. Após esse período, poucos estudos reportaram tal achado.

---

## OBJETIVOS

---

Avaliar a presença de alterações na função gustatória na área inervada pelo nervo corda do tímpano em pacientes com otite média crônica, ainda não submetidos a cirurgia.

---

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

### Local e Modelo do Estudo

Trata-se de um ensaio clínico, realizado no Ambulatório de Otite Média Crônica do Serviço de Otorrinolaringologia dessa instituição. O estudo está aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário sob o código 106/06.

### Amostra e Seleção dos Pacientes

#### Critério de Elegibilidade

Indivíduos com otite média crônica unilateral atendidos neste hospital, no período de julho de 2005 a setembro de 2007, e que se enquadrarem nos critérios a seguir:

#### Critérios de Inclusão:

Pacientes de ambos os sexos maiores que 18 anos, independente da raça, que satisfaçam aos critérios de inclusão e exclusão apresentando:

1. Doença Crônica de Orelha Média Colesteatomatosa unilateral confirmada clínico e radiologicamente com outra orelha sem alterações clínico-radiológicas, aguardando tratamento cirúrgico neste hospital.

2. Doença Crônica da Orelha Média Supurada Não Colesteatomatosa (Lillie tipo II) unilateral confirmada clí-

nica e radiologicamente com outra orelha sem alterações clínico-radiológicas, aguardando tratamento cirúrgico neste hospital.

#### Critérios de Exclusão:

1. Pacientes submetidos à cirurgia otológica previamente em qualquer um dos lados.

2. Pacientes com história de paralisia facial

3. Pacientes com lesão ativa em língua.

4. Presença de doença neurológica que danifique a cognição ou comunicação.

5. Pacientes em uso de alguma medicação que possa causar alteração no paladar.

6. Pacientes sem tomografia computadorizada de orelha media e mastoide.

O paciente foi selecionado inicialmente, sob o ponto de vista do exame clínico, pelo otorrinolaringologista que verificou o tipo de otite média crônica e a comprovação radiológica através de Tomografia Computadorizada. O diagnóstico de otite média crônica em colesteatomatosa ou não-colesteatomatosa foi baseado em exame físico, tomografia computadorizada e achados cirúrgicos.

Além do teste, o paciente respondeu a um questionário com dados pessoais, sobre seu passado de doenças otológicas, o tempo de doença crônica da orelha média (levado em consideração a partir do momento do início dos sintomas), presença de doenças sistêmicas, tabagismo e uso de medicações.

### Sobre o procedimento

O exame foi realizado com teste gustatório validado por Muller et al.<sup>7</sup> baseado em "tiras gustativas" com concentrações diferentes de sal, doce, amargo e azedo e 2 tiras com água, totalizando 18 tiras. As concentrações são: azedo - ácido cítrico 0,3 g/ml, 0,165 g/ml, 0,09 g/ml, e 0,05 g/ml; amargo - sulfato de quinino 0,006 g/ml, 0,0024 g/ml, 0,0009 g/ml e 0,0004 g/ml; doce- sacarose 0,4 g/ml, 0,2 g/ml, 0,1 g/ml e 0,05 g/ml; sal- cloreto de sódio 0,25 g/ml, 0,1 g/ml, 0,04 g/ml e 0,016 g/ml. Essas tiras eram de papel filtro medindo 8cm de comprimento com área de 0,2 cm<sup>2</sup>. Foram estabelecidas duas ordens diferentes de teste: A e B, empregadas de forma aleatória para os pacientes.

Foram escolhidos pacientes com um lado apenas acometido pela otite média crônica para que a metade da língua contralateral à lesão seja utilizada como controle para o estudo.

### Realização do procedimento

O paciente não pôde ingerir alimentos ou líquidos (com exceção de água) por pelo menos 1 (uma) hora antes do exame ou fumar no dia do exame. O examinador não sabe qual é a orelha com otite média crônica e nem, o gosto da tira de papel-filtro que está sendo testada.

As tiras de papel filtro são preparadas com o gosto em outro ambiente, sendo um total de 18 para cada lado. A tira é posicionada na metade da língua que está sendo avaliada e o paciente deve apontar para um quadro qual das cinco opções (sal, doce, amargo, azedo, água) ele acredita que seja a certa, sem retornar a língua à cavidade oral. O teste é repetido na mesma seqüência para o lado oposto.

Entre cada tira, um gole de água é fornecido, para que não fique resíduo do último gosto. No final, uma nota de 0 a 16 é fornecida para cada lado, sendo que as duas tiras com água são apenas para validação do teste. Notas menores que 8 caracterizam hipogeusia e nota 0 (zero) significa ageusia.

### Processamento e Análise dos dados

Os dados coletados foram analisados através do software R, sendo utilizadas a análise multivariada, utilizando Regressão de Poisson e teste de Wald ( $z$ ), foi usada para controlar fatores de confusão.

Os modelos montados através da regressão de Poisson foram comparados por meio do Critério de Informação de Akaike<sup>8</sup>. Esse critério foi proposto para seleção, dentro de um conjunto de modelos, sendo que o melhor é aquele que apresenta o menor valor de AIC.

Além disso, foi utilizada uma analogia da curva de sobrevida pela técnica de Kaplan-Meier, onde no lugar de anos de sobrevida foram utilizados acertos nos testes de paladar. Para testar as curvas de sobrevida foram aplicados os testes de Log-Rank, Tarone-ware e Peto and Prentice para cada variável explicativa individualmente.

## RESULTADOS

Foram avaliados 45 pacientes com média de idade de 38 anos variando de 19 a 70 anos. O sexo masculino era representado por 16 pacientes. O lado esquerdo foi afetado em 23 casos e o restante apresentava doença otológica à direita.

Nenhum paciente referiu apresentar qualquer alteração de paladar previamente ao questionário, assim como queixa de xerostomia. Além disso, ao exame não havia lesão em cavidade oral ou língua.

Quando comparamos lado da língua saudável com o lado com doença otológica com relação à sensibilidade gustativa, encontramos uma média de 6,65 para o lado

ipsilateral a otite média crônica e 9,91 para o lado da orelha sadia (ver Tabela 1).

Encontramos 24 casos de hipogeusia do lado afetado, sendo 8 (17,7%) casos de ageusia. No lado da orelha sadia, encontramos 12 casos de hipogeusia e nenhum de ageusia.

Pelo gráfico de sobrevida de Kaplan-Meier podemos ver que não há cruzamento entre o lado doente e saudável (ver figura 1), confirmados pelo testes da Tabela 2. A probabilidade que o lado com doença crônica da orelha média acerte  $x$  ou mais tiras é sempre menor do que o lado com orelha sadia.

Quando analisamos separadamente cada gosto, o doce foi o mais preservado no lado lesado quando comparado com outros gostos (Ver Tabela 3) e o mais afetado foi o amargo. A maior confusão foi entre o gosto azedo confundido com o amargo. Já no lado sadio, temos o também o gosto amargo com maior número de erros e o mais preservado foi também o doce (ver Figura 2). Os dois gostos mais confundidos foram também o salgado com o azedo, seguido do azedo com o amargo.

Avaliamos a relação de algumas variáveis e sua influência na alteração da sensibilidade gustatória através da análise de diferentes modelos de regressão de Poisson (ver Tabela 4). Após análise de outros modelos de regressão este foi escolhido por possuir o menor AIC e este, com suas variáveis, será adotado como significante, ou seja, não um mero acaso. As variáveis utilizadas foram: sexo, idade, presença de otorreia no momento do teste, tabagismo, presença de diabetes melito, presença de colesteatoma e tempo de doença otológica.

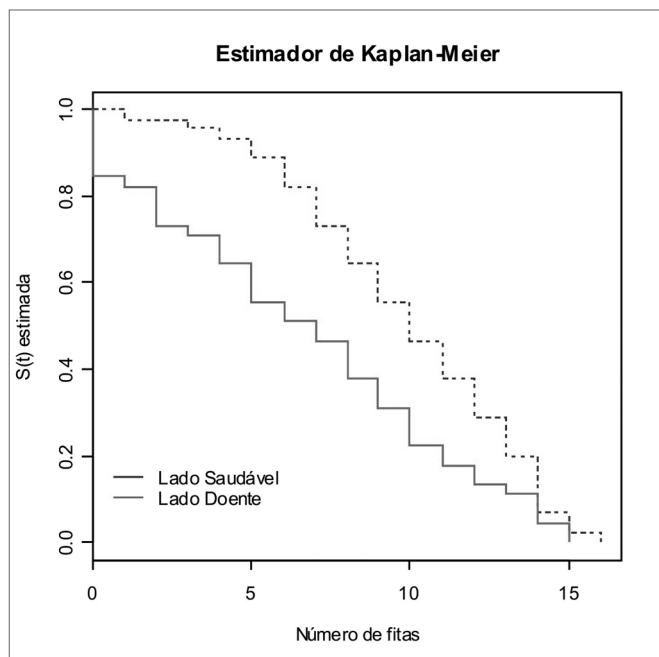
O sexo masculino mostrou-se mais sensível à alteração do paladar que o feminino (ver Tabela 4). Assim como sexo, a idade parece influenciar negativamente a sensibilidade gustatória: quanto mais velho o paciente, maior a alteração do paladar.

A presença de diabetes melito mostrou relação com a alteração do paladar (ver Tabela 4). Não encontramos relação entre HAS e piora da sensibilidade gustativa ( $p>0,1$ ) pelo teste de Tarone-Ware.

A presença de colesteatoma, em 25 casos, parece influenciar a alteração no paladar de nossa amostra ( $p=0,055$ ). Da mesma forma, o tempo de doença (ver Figura 3), pacientes com problema otológico há mais tempo aparentam apresentar piora da sensibilidade gustatória ( $p=0,073$ ).

**Tabela 1.** Resultado dos testes gustatórios, média de acertos e número de pacientes com hipogeusia e ageusia em cada lado.

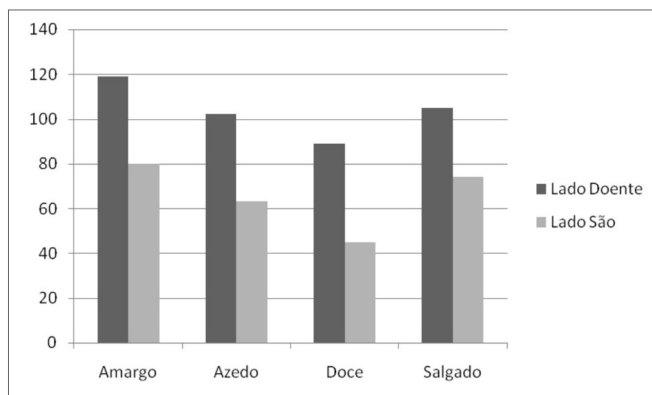
	Lado Normal (média+DP)	Lado Doente (média+DP)	Hipogeusia Lado Normal	Hipogeusia Lado Doente	Casos de Ageusia
OMCS NC	9,90+3,56	7,15+4,74	7	9	3
OMCC	10,2+3,61	6,28+4,82	5	15	5
Total	9,93+3,53	6,65+4,74	12	24	8



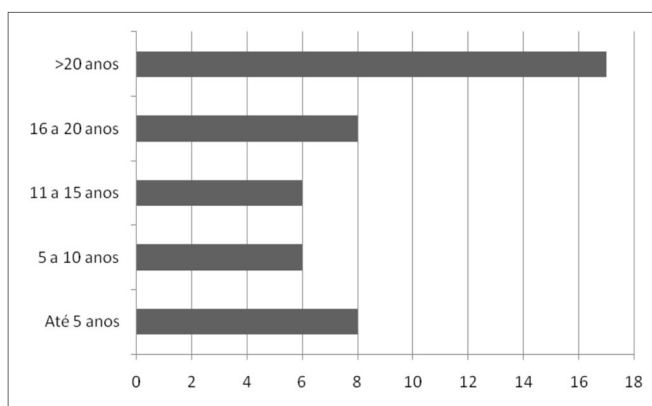
**Figura 1.** Gráfico de Análise de Sobrevida pela técnica de Kaplan-Meier com análise do resultado do teste gustatório para cada lado.

**Tabela 2.** Testes confirmando achados na Figura 1 de análise de sobrevida

Testes	P
Teste de Tarone-Ware	p= 0.00239
Teste de Log-rank	p= 0.00908
Teste de Peto&Prentice	p= 0.000943



**Figura 2.** Comparação entre número de erros de cada gosto entre os dois lados.



**Figura 3.** Número de pacientes de acordo com tempo de doença otológica.

**Tabela 3.** Número de erros para cada gosto oferecido (barra vertical) no lado doente e suas respostas equivocadas (barra horizontal).

Lado Doente	Amargo	Azedo	Doce	Salgado	Água	Total
Amargo	0	17	12	6	84	119
Azedo	38	0	10	18	36	102
Doce	10	8	0	4	67	89
Salgado	8	35	10	0	52	105

**Tabela 4.** Relação entre alteração de paladar e diferentes variáveis analisadas através de Regressão de Poisson.

	Estimativa	Erro padrão	Valor z	Valor p	Código
Intersepto	3,169772	0,143455	22,096	<0,001	***
Lado doente	-0,396536	0,074669	-5,311	<0,001	***
Idade	-0,15032	0,002888	-5,205	<0,001	***
Sexo masculino	-0,230843	0,083034	-2,780	0,00543	**
Tabagismo	-0,237583	0,104638	-2,271	0,02318	*
Tempo de doença	-0,046434	0,025907	-1,792	0,07307	.
Colesteatoma	-0,150241	0,078371	-1,917	0,05523	.
Diabetes	0,307271	0,109366	2,810	0,00496	**

Sign. dos códigos: 0 \*\*\* 0.001 \*\* 0.01 \* 0.05. 0.1 1  
AIC: 531,86

---

## DISCUSSÃO

---

Um dos maiores achados do estudo foi a constatação que há alteração no paladar na metade da língua do lado com otite média crônica quando comparado com o lado sadio. O encontro de tais alterações do paladar pode justificar a queixa mais frequente de alterações do paladar no pós-operatório de pacientes com otosclerose, evidenciada claramente por muitos cirurgiões, quando comparado a um pós-operatório de pacientes com otite média crônica, ou seja, este último grupo já apresentaria alguma alteração prévia.

Quando comparamos com um estudo semelhante, como o de Landis et al.<sup>9</sup> ao dividirmos entre os dois tipos de OMC pacientes com colesteatoma, mais especificamente, apresentaram uma média de pontuação de 9,04 para o lado doente contra 6,25 do nosso estudo. Já para pacientes não-colesteatomatosos os resultados para o mesmo lado com doença foi de 7,15 em nosso estudo e 10 no estudo de Landis et al.<sup>9</sup>. Sano et al.<sup>10</sup> encontraram resultados semelhantes utilizando eletrogustometria. As notas no nosso estudo foram menores, talvez pela característica da nossa população, dependente de atendimento público, que aguarda longos períodos em fila de espera para adequado diagnóstico de seus problemas e tratamento cirúrgico.

Ageusia completa foi encontrada em 8 casos em nosso estudo e Landis et al.<sup>9</sup> encontraram 9 pacientes com a mesma alteração. Apesar da evidente alteração na função gustatória do lado com OMC, não havia queixa de distúrbio do paladar nestes pacientes, mesmo naqueles que apresentavam ageusia. Esta sensação pode ser explicada pela percepção gustativa da boca como um todo e não apenas setorial. Botões gustativos são localizados em diversos pontos da cavidade oral. A sensibilidade é carregada por diferentes nervos e todos convergem para o núcleo solitário no tronco encefálico. Estudos em ratos<sup>11</sup> mostram que aferências gustativas provenientes da cavidade oral e língua mostram inibição mútua, ou seja, a via que transmitisse a maior quantidade de estímulo inibiria as outras. Este mesmo estudo sugere que a perda de grande parte de aferências gustativas (ex. como no caso de lesão do nervo corda do tímpano) leva a uma inibição central. Por conseguinte, outras áreas com aferências gustativas funcionantes receberiam uma maior importância centralmente, compensando a falta da área atingida, mantendo a percepção gustativa constante mesmo se partes consideráveis são lesadas. Assim, mesmo se um paciente com OMC não apresenta queixa de disgeusia, isto não significa que não há uma deficiência gustatória mensurável.

Landis et al. em seus dois artigos<sup>9,12</sup> já propuseram a solicitação de avaliação gustatória de pacientes entre os exames pré-operatórios para cirurgias da orelha média com fins médico-legais com base nos achados de seus estudos.

Quando comparamos a técnica do exame gustatório

nos diferentes estudos, o de Sano et al.<sup>10</sup> utilizou eletrogustometria ao contrário do nosso estudo e de Landis et al.<sup>9</sup> que utilizaram gostos naturais apresentados através de tiras de papel-filtro. Embora a técnica de estimulação elétrica seja mais simples de realizar ela produz predominantemente sensações metálicas ou de acidez e não, os outros tipos de gostos. Além disso, existe uma discussão atualmente sobre a possível coestimulação, através de estímulo elétrico, de fibras do nervo trigêmeo ou sobre a ativação direta de axônios das fibras gustativas fazendo um bypass dos receptores gustativos na língua<sup>13</sup>.

A presença de colesteatoma, em nossa análise, parece influenciar a piora da sensibilidade gustatória, assim como, no estudo de Landis et al.<sup>9</sup>. Este dado era esperado, já que o colesteatoma pode gerar destruição óssea e paralisia facial. Sendo assim, esperar-se-ia que o nervo corda do tímpano fosse afetado num grau maior nos pacientes com colesteatoma. Já Sano et al.<sup>10</sup> não encontraram tal relação. Estudos<sup>14,15</sup> em ossos temporais sustentam essa opinião referindo que a presença de colesteatoma representava maior agressão ao nervo corda do tímpano quando comparado com ossos com processo inflamatório crônico não-colesteatomatoso. Para enfatizar a importância do processo inflamatório e sua relação com o paladar, Bartoshuk et al.<sup>16</sup> relataram que notaram que crianças com otite média de repetição apresentam menor número de botões gustativos que indivíduos normais.

O tempo de doença, em nosso estudo, aparentou apresentar relação com piora da sensibilidade gustatória. Sano et al.<sup>10</sup>, em seu estudo, não encontraram relação entre o tempo de doença, seja colesteatomatosa ou não-colesteatomatosa, com a piora da sensibilidade gustatória. Landis et al.<sup>9</sup> não analisam esse parâmetro entre seus dados.

O gosto mais sensível à agressão do nervo corda do tímpano no nosso estudo foi o amargo. Já o gosto doce permanecia como a opção com menor quantidade de erros no teste. Ambos, tanto o doce quanto o amargo, apresentam o mesmo tipo de ativação intracelular através de receptores acoplados a proteína G que ativam segundos-mensageiros intracelulares. Já um dos mais confundidos tanto do lado doente quanto do sadio foi o salgado com o azedo que apresentam a mesma forma de atuação no botão gustativo através de ativação direta de canais iônicos na superfície da célula. Esse achado foi algo também notado por Mueller et al.<sup>7</sup> e Ahne et al.<sup>17</sup>. No entanto, o outro caso de confusão entre os gostos ocorreu entre o amargo e o azedo, que possuem vias de ativação diferente e não há uma explicação até o momento para esse fato.

---

## CONCLUSÃO

---

Os dados apresentados neste estudo mostram que pacientes com inflamação crônica de orelha média apresentam diminuição da sensibilidade gustatória nos dois

---

terços anteriores da língua ipsilaterais a doença, quando comparados com orelhas normais.

---

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Moon CN, Pullen EW. Effects of chorda tympani section during middle ear surgery. *Laryngoscope*. 1963;73:392-405.
2. Nim T, Sakagami M, Sone-Okunaka M, Muto T, Mishiro Y, Fukazawa K. Taste function after section of chorda tympani nerve in middle ear surgery. *Auris Nasus Larynx*. 2006;33:13-7.
3. Sagakami M, Sone M, Tsuji K, Fukazawa K, Mishiro Y. Rate of Recovery of taste function after preservation of chorda tympani nerve in middle ear surgery with special reference to type of disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003;112:52-6.
4. Vlasto M. The chorda tympani nerve in otology. *J Laryngol Otol*. 1930;45:59-66.
5. Ho WYH. Taste alterations of otological source. *Arch Otolaryngol*. 1937;26:146.
6. Arnold SM. The vulnerability of the chorda tympani nerve to middle ear disease. *J Laryngol Otol*. 1974;88:457-66.
7. Mueller C, Kallert S, Renner B, Stiassny K, Temmel AFP, Hummel T, Kobal G. Quantitative assessment of gustatory function in a clinical context using impregnated "taste strips." *Rhinology*. 2003;41:2-6.
8. Akaike H. Likelihood of a model and information criteria. *J Econom*. 1981;16:3-14.
9. Landis BN, Beutner D, Frasnelli J. Gustatory function in chronic inflammatory middle ear disease. *Laryngoscope*. 2005;115:1124-7.
10. Sano M, Ito K, Suzukawa K, Kaga K, Yamasoba T. Influence of Chronic Middle Ear disease on Gustatory function: an electrogustometry study. *Otol Neurotol*. 2006;28:44-7.
11. Halpern BP, Tapper DN. Taste stimuli: quality coding time. *Science*. 1971;171:1256-8.
12. Landis BN, Lacroix JS. Postoperative/ postoperative gustatory dysfunction. *Adv Otorhinolaryngol*. 2006;63:242-54.
13. Tomita H, Ikeda M. Clinical use of electrogustometry: strengths and limitations. *Acta Otolaryngol Suppl*. 2002, 546:27-38.
14. Griffith IP. Observations on the pathology of chorda tympani nerve in temporal bone sections. *J Laryngol Otol*. 1977;91:151-7.
15. Gedikli O, Dogru H, Aydin G, Tuz M, Uygur K, Sari A. Histopathological changes of chorda tympani in chronic otitis media. *Laryngoscope*. 2001;111:724-7.
16. Bartoshuk LM, Duffy VB, Reed D, Williams A. Supertasting, earaches and head injury: genetics and pathology alter our taste worlds. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996;20:79-87.
17. Ahne G, Erras A, Hummel T, Kobal G. Assessment of gustatory function by means of tasting tablets. *Laryngoscope*. 2000;110:1396-401.