

DIAGNÓSTICO E IMPLICAÇÕES DOS VÍRUS HTLV: UMA REVISÃO

DIAGNOSIS AND IMPLICATIONS OF HTLV VIRUS: A REVIEW

CLEBSON SANTOS DA SILVA FERNANDES^{1*}, WESLEY PIMENTA CÂNDIDO²

1. Acadêmicos do curso de graduação do curso de Biomedicina do Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná – UniSL/JP; 2. Biomédico, Especialista em Metodologia do Ensino Superior e EAD pela Faculdade Educacional da Lapa, professor do curso de Biomedicina do Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná – UniSL/JP.

*Rua Luiz Matias Carneiro, 93, Residencial Carneiro, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil. CEP: 76909476. clebssonsfernandes@gmail.com

Recebido em 25/05/2020. Aceito para publicação em 29/06/2020

RESUMO

Foram descritos até o momento quatro tipos de vírus linfotrópico de células T humano (HTLV), pertencentes à família Retroviridae e com as variantes genotípicas nomeadas como HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4. Esse estudo teve como objetivo elaborar uma revisão de literatura para melhor entendimento sobre os diferentes tipos do vírus HTLV, bem como os aspectos clínicos, epidemiológicos e de diagnóstico. A pesquisa bibliográfica foi desenvolvida por meio das seguintes etapas: coleta de materiais pelas bases de dados da Scielo, Google Acadêmico e Pubmed. Os critérios de busca foram as seguintes palavras-chave: vírus HTLV, paraparesia espástica tropical e leucemia de células T. Como observado o vírus HTLV-1 é único com patologias ligadas à ele comprovadas cientificamente e um dos principais achados laboratoriais que podem indicar a infecção é a presença de linfócitos atípicos, *flower cells* ou clivados, além de hipergamaglobulinemia e falso-positivo em testes para triagem de sífilis. Em fim, o objetivo do estudo de melhorar o entendimento sobre o vírus, diagnóstico e suas implicações clínicas foi alcançado, e ficou claro que deve-se difundir o tema para profissionais de saúde e também à comunidade, para ampliar as medidas de prevenção.

PALAVRAS-CHAVE: Vírus HTLV, paraparesia espástica tropical, leucemia de células T.

ABSTRACT

To date, four types of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV) have been included, belonging to the Retroviridae family and as genotypic variants associated with HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 and HTLV-4. This study aimed to develop a literature review to better understand the different types of HTLV viruses, as well as the clinical, epidemiological and diagnostic aspects. A bibliographic search was developed through the following steps: collection of materials through the databases of Scielo, Google Scholar and Pubmed. The research requirements were as follows: HTLV virus, paraparesis tropical spastic and T-Cell leukemia. As the HTLV-1 virus is the only one with scientifically proven pathologies and one of the main laboratories found that they can use is a presence of atypical lymphocytes, flower cells or cleaved, in addition to hypergammaglobulinemia and false positive in tests for screening for syphilis. Finally, the objective of the study to improve understanding of viruses, diagnosis and their clinical implications was accessed, and it was clear that it should be different from the theme for health professionals and also in

the community, to expand as test measures.

KEYWORDS: HTLV virus, paraparesis tropical spastic, T-cell leukemia.

1. INTRODUÇÃO

Foram descritos até o momento quatro tipos de vírus linfotrópico de células T humano (HTLV), pertencentes à família Retroviridae e com as variantes genotípicas nomeadas como HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4^{[1],[2]}.

Todos os genomas dos vírus da família *Retroviridae* codificam a poliproteína precursora de proteínas estruturais (*gag*), a poliproteína precursora das enzimas virais (*pol*) e glicopoliproteína precursora de glicoproteínas do envelope (*env*)^[3]. Os retrovírus codificam uma enzima com atividade de síntese de moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de moldes de ácido ribonucleico (RNA), diferente dos vírus de RNA de fita positiva. O HTLV é um vírus envelopado, com 100 a 140 nm de diâmetro e core central denso entre 80 a 100 nm. Trata-se de uma partícula viral com morfologia semelhante à observada nos retrovírus tipo C de mamíferos^[4].

O HTLV-1 foi identificado no início da década de 1980 em linhagens de células HUT-102, provenientes de um paciente com linfoma cutâneo^{[5][6]}. O HTLV-2 foi isolado em 1982 de uma linhagem diferente de células T do baço de um indivíduo com um tipo raro de leucemia que apresentava células pilosas, porém ainda não foi possível definir a relação do vírus com essa patologia^[4].

O HTLV-3 foi descoberto em 2 habitantes assintomáticos do Sul de Camarões, cujas amostras de soro apresentaram sorologias indeterminadas para HTLV. O HTLV-4 foi descrito entre africanos caçadores de carne silvestre^[7].

Em estudos realizados na década de 1980 foram encontrados maior prevalência em todos os continentes do HTLV-1^{[2],[8]}.

Segundo Dos Santos *et al.* (2017)^[9] o desconhecimento sobre o vírus e suas patologias acarreta em maior dificuldade para o diagnóstico, o que acaba piorando o prognóstico do paciente. Portanto, esse estudo teve como objetivo elaborar uma revisão de

literatura para melhor entendimento sobre os diferentes tipos do vírus HTLV, bem como os aspectos clínicos, epidemiológicos e de diagnóstico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para colaborar na organização e na elaboração das ideias e resultados apresentados em uma pesquisa acadêmica é necessário definir os métodos que serão empregados. Portanto, a opção metodológica escolhida para o desenvolvimento desse estudo foi a pesquisa bibliográfica descritiva.

A pesquisa bibliográfica foi desenvolvida por meio das seguintes etapas: coleta de materiais pelas bases de dados da Scielo, Google Acadêmico e Pubmed, além de livros, em que empregada a técnica de observação para análise do conteúdo. Os critérios de busca foram as seguintes palavras-chave: vírus HTLV, paraparesia espástica tropical e leucemia de células T, selecionadas de acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCs).

Foram selecionados 48 estudos publicados entre os anos de 1980 e 2019, porém 37 artigos que tratavam exatamente sobre os temas contidos nas palavras-chave pré-selecionadas foram empregados no presente estudo.

3. DESENVOLVIMENTO E DISCUSSÃO

O vírus HTLV-1

O HTLV-1 é um vírus encapsulado que apresenta duas cópias de RNA de fita simples dentro do seu capsídeo de polaridade positiva, ligada em um RNA transportador para sinalizar a síntese de DNA. Possui um genoma de 9,03kb, apresentam genes específicos de função estrutural denominados gag e pol, envolvidos por duas sequências terminais repetidas, com reguladores e promotores virais. As proteínas reguladoras tax, rex, HBZ, p12, p13, p30 e p21 são codificadas pela região pX do genoma, tais proteínas participam da multiplicação das células contaminadas e da oncogenicidade viral^{[10],[11]}.

Considerava-se que no início do século XXI havia cerca de 10 a 20 milhões de indivíduos portadores do vírus HTLV-1^[12].

Em relação a maneira que o vírus HTLV-1 pode acometer o tecido nervoso, apresenta pelo menos quatro formas: 1) é possível que a infecção ocorra de forma direta citopática; 2) A morte celular pode ocorrer pela reação imunológica às células infectadas; 3) por meio de “mimetismo” de antígenos celulares o patógeno pode provocar destruição auto-imune; 4) quando ocorre a interação de efetores imunocompetentes e células infectadas pode acarretar a dano ao tecido próximo^[13].

Hospedeiros e mecanismos de transmissão do HTLV

Assim como o vírus da hepatite C (HCV) e o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) que ocorrem por transmissão vertical e horizontal, o mesmo ocorre com o HTLV. A transmissão vertical que é mais comum em regiões endêmicas acontece quando passa da mãe para o

feto durante a gravidez e para a criança no aleitamento materno. Já na transmissão horizontal sucede por vias sanguíneas e por via sexual desprotegidas^{[14],[15]}.

Segundo Lopes *et al.* (2008)^[16], para ocorrer transmissão dos vírus HTLV 1 e 2 de pessoa para pessoa, é fundamental que ocorra a proliferação de linfócitos infectados diferentemente da transmissão do HIV.

De acordo com Gessain *et al.* (1985)^[17], a maior parte das pessoas infectadas no decorrer da vida os sintomas não se manifestam. O principal surgimento de patologias está relacionado ao comportamento do sistema imunológico e das manifestações genéticas de cada indivíduo.

Em relação à prevalência, a mesma é modificada conforme a área territorial, indivíduos de maiores faixas etárias e mulheres são os maiores portadores do vírus^[18].

Uma pesquisa realizada no Japão demonstrou que paciente do sexo feminino na fase pós menopausa e idade mais avançada apresenta maior capacidade de transmissão. Tal investigação indica que elementos hormonais acabam por executar uma função na vulnerabilidade à infecção a este grupo^[19].

Glasser (1998)^[20], afirma que os linfócitos T são as células de defesa do organismo infectadas pelo vírus HTLV. O mesmo apresenta contágio idêntico ao vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana (HIV).

De acordo com Bangham (2003)^[21], o favorecimento da passagem viral se dá através do mecanismo identificado como sinapse viral induzida, em que o vírus provoca atividades de polarização celular, ocasionando aproximação das células acometidas e não acometidas.

O HTLV-1 tem relação com doenças como paraparesia espástica tropical (PET), leucemia/linfoma de células T do adulto (ALT), também conhecida como mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM)².

A mielopatia relacionada ao HTLV-1 / paraparesia espástica tropical (PET/MAH) que ocorre de forma vagarosa e gradativa apresenta predileção pelos membros inferiores e é a patologia neurológica mais descrita em pacientes com vírus linfocitário de células T humanas tipo 1 (HTLV-1)^{[8],[22]}.

No momento há poucos indícios de patologias que tenham alguma relação com o HTLV-2, descoberto em 1892, ocasionalmente na literatura são encontradas algumas associações com mielopatia, miopatia inflamatória e polineuropatias de predominância sensitiva^[8].

Diversas doenças têm sido relacionadas à infecção por HTLV como a síndrome de Sjogren, dermatite infecciosa, alveolite linfocitária, polineuropatias, artropatias, polimiosite, tireoidite, uveíte^{[23],[24]}, Bem como a escabiose, linfoma cutâneo de células T, hanseníase, tuberculose e strongiloidíase^{25,26}.

Prevalência no Brasil

O Brasil apresenta a área com maior quantidade absoluta de pessoas acometidas, calcula-se no entorno de 2,5 milhões de indivíduos^[27]. Segundo Galvao-Castro *et al.* (1997)^[28] a prevalência de HTLV-1/2 entre doadores de sangue foi de 0,33% no Rio de Janeiro, 0,08%

em Manaus (Amazonas), 0,33% em Recife (Pernambuco), 0,08% em Florianópolis (Santa Catarina) e Ferreira *et al.* (1995)^[29] encontraram a prevalência de 0,2 % na cidade de São Paulo.

A maior prevalência entre as capitais brasileiras foi observada entre doadores de sangue da cidade de Salvador, com 1,35%^[28]. Dourado *et al.* (1999)^[30] estimaram que em Salvador a prevalência foi de 0,8% entre as gestantes e 25,5% entre as usuárias de drogas endovenosas. As regiões de alta prevalência variam, encontrando-se altas nas regiões Nordeste e Norte e baixa na região Sul do Brasil^[31].

Diagnóstico laboratorial

O desconhecimento entre os profissionais e a população sobre essa infecção provoca dificuldade e demora para o diagnóstico correto, proporcionando complicações dos sintomas a longo do tempo e ao concluir o processo de diagnóstico tardio já estarão inseridas limitações físicas no paciente^[9].

As análises laboratoriais buscam identificar anticorpos anti-HTLV para confirmar o diagnóstico da infecção por este vírus, por meio do teste Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) juntamente à reação em cadeia da polimerase (PCR), ensaio molecular de amplificação genômica de proteína e DNA proviral ou ensaio imunoenzimático como o Western blot para distinguir o genótipo do vírus^[32].

Na análise sorológica é comum detectar a elevação das imunoglobulinas e resultado falso-positivo nos testes não treponêmicos para triagem da sífilis, como o VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) e RPR (*Rapid plasma reagin*). No líquido cefalorraquidiano (LCR) é comum de ser encontrado pleocitose moderada, além de aumento da concentração de proteínas. Essas anormalidades geralmente são encontradas durante os primeiros anos do curso da doença e tendem a declinar gradualmente^[33].

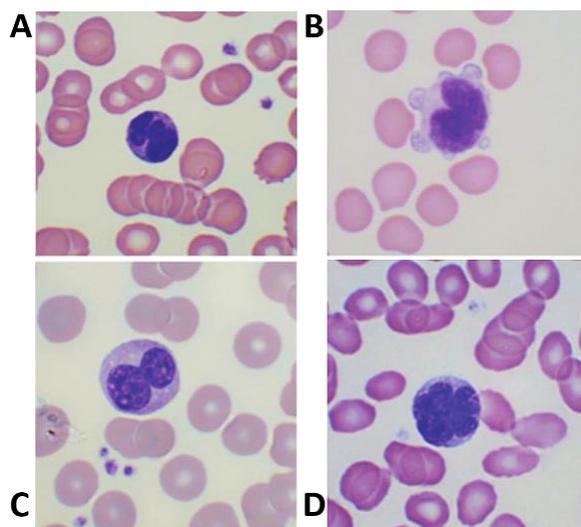


Figura 1. Morfologia linfocitária em portadores assintomáticos do HTLV-1: (A) núcleo contorcido; (B) núcleo da fissura com projeções citoplasmáticas; (C) núcleo bi-lobulado e (D) *flower cell*. **Fonte:** Adaptado de Hodson *et al.* (2013)^[37].

Na análise morfológica sanguínea é possível visualizar linfócitos atípicos (*Flower Cells*)^[33]. Segundo Ijichi e Osame (1995)^[34], no sangue periférico da metade dos indivíduos portadores da PET/MAH são encontrados 1% linfócitos atípicos em forma de *Flower Cells*. Assim como na ATL, estes linfócitos apresentam irregularidade relevante em seu núcleo com características lobulados e pleomórficos^[35], como observado na figura 1. A identificação desse tipo de alteração nos linfócitos é frequentemente o primeiro alerta para a detecção da doença^[36].

No monitoramento da transmissão vertical a expressão proteica tax e os elevados níveis de linfócitos acometidos pelo HTLV-1 são marcadores essenciais. Pois, a tax inicia a atividade de transcrição da terminação repetitiva longa (LTR) viral, participando na alteração linfocitária T CD4⁺ e na replicação viral, estimulando a expressão do HTLV-1 nos linfócitos transmitido pela mãe para filho no aleitamento^[36].

Estudos comparativos apresentados por Chaturvedi *et al.*, (2007)^[38] demonstraram que pacientes infectados pelo HTLV-1 mostram resultados mais expressivos de linfócitos clivados (24,5%), enquanto os não infectados (16,4%), bem como outras alterações comuns de linfócitos reativos (45,7%) e (35,4%), respectivamente.

Atualmente ainda há desconhecimento considerável sobre o HTLV e as doenças causadas pela infecção, o que torna essencial a difusão de informação científica sobre o tema, principalmente entre os profissionais de saúde que atuam diretamente no diagnóstico.

4. CONCLUSÃO

Diante dos dados analisados observou-se o desconhecimento sobre os diferentes tipos de vírus HTLV levam à elevação do tempo para diagnóstico da infecção, o que acarreta em piora do prognóstico do paciente.

Como observado o vírus HTLV-1 é único com patologias ligadas a ele comprovadas cientificamente e um dos principais achados laboratoriais que podem indicar a infecção é a presença de linfócitos atípicos, *flower cell* ou clivados, além de hipergamaglobulinemia e falso-positivo em testes para triagem de sífilis.

Nesse sentido, ressalta-se a importância da atenção dos profissionais ligados ao diagnóstico laboratorial e clínico para as alterações celulares e moleculares, pois elas estão detectáveis antes da manifestação de sintomas ou sinais clínicos.

Em fim, o objetivo do estudo de melhorar o entendimento sobre o vírus, diagnóstico e suas implicações clínicas foi alcançado, e ficou claro que deve-se difundir o tema para profissionais de saúde e também à comunidade, para ampliar as medidas de prevenção.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Romanelli LCF, Caramelli P, Carneiro-Proietti ABF. O vírus linfotrópico de células t humanas tipo 1 (htlv-1):

- quando suspeitar da infecção?. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(3):340-7.
- [2] Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GEA, Martins-Filho AO, et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(5):499-508.
- [3] Franchini G, Reitz MS Jr. Phylogenesis and genetic complexity of the nonhuman primate retroviridae. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994; 10(9):1047-1060.
- [4] Santos, NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia humana.* Grupo Gen-Guanabara Koogan. 2015.
- [5] Poesz BJ, *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 1980; 77(12):7415-9.
- [6] Bittencourt AL, Primo J, Oliveira MFP. Manifestações infanto-juvenis da infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-I). *J. Pediatr. Rio de Janeiro,* 2006; 82(6):411-420.
- [7] Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD., Shanmugam V., Tamoufe U, *et al.* Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(22):7994–7999.
- [8] Santos ACC, Soares DJ, Rivemales MCC. (Des)conhecimento, adoecimento e limitações impostas pelo HTLV: experiências de mulheres soropositivas. *Cad. saúde colet. Rio de Janeiro.* 2017; 25(1).
- [9] Dos Santos, ACC, *et al.* (Des) conhecimento, adoecimento e limitações impostas pelo HTLV: experiências de mulheres soropositivas. *Cadernos Saúde Coletiva.* 2017; 25(1).
- [10] Bittencourt AL, Farre L. Leucemia/linfoma de células T do adulto. *An Bras Dermatol.* 2008; 83(4):351-9.
- [11] Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:270-80.
- [12] Catalan-Soares BC, Proietti FA. HTLV-1 e 2: aspectos epidemiológicos. In: *Cadernos Hemominas – HTLV.* vol. XIII. Belo Horizonte: Fundação Hemominas. 2006; 69-85.
- [13] Ijichi S, Eirak N, Osame M, *et al.* Hypothetical pathogenesis of HAM/TSP: occurrence of proliferative response of lymphocytes in the central nervous system. In: Roman GC, Vernant J-C, Osame M, editors. *Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I and the nervous system.* New York: Alan R. Liss. 1989; 337-42.
- [14] Garcia, IFS, Hennington, EA. HTLV: a stigmatizing infection? *Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 2019; 35(1):1-14.
- [15] Zihlmann KF, Mazzaia MC, Alvarenga AT. Sentidos da interrupção da amamentação devido infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1). *Acta Paul Enferm.* 2017; 30(1):80-6.
- [16] Lopes MSSN, Proietti ABFC. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2008; 30(3):229-240.
- [17] Gessain A, Barin F, Vernant JC, *et al.* Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1985; 2(8452):407-410.
- [18] Manns A, Blattner WA. The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and type II: etiologic role in human disease. *Transfusion.* 1991; 31(1):67-75.
- [19] Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *J Infect Dis.* 1986; 154(5):851-857.
- [20] Glasser DB. Teste sorológico de doadores de córnea. *Córnea.* Mar 1998; 17 (2):123-128.
- [21] Bangham CRM. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol.* 2003; 84(Pt 12):3177-3189.
- [22] Gascon, MR, *et al.* Memory impairment: an intermediate clinical syndrome symptom in HTLV-1-infected patients?. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* [online]. 2019; 77(6):429-435.
- [23] Mori S, Mizoguchi A, Kawabata M, *et al.* Bronchoalveolar lymphocytosis correlates with human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load in HTLV-I carriers. *Thorax.* 2005; 60(2):138-143.
- [24] Seguchi T, Kyoraku Y, Saita K, *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-1) associated myelopathy and Sjögren's syndrome representing pulmonary nodular amyloidosis and multiple bullae: Report of an autopsy case. *Virchows Arch.* 2006; 448(6):874-876.
- [25] Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7(4):266-281.
- [26] Cooper SA, van der Loeff MS, Taylor GP. The neurology of HTLV-1 infection. *Pract Neurol.* 2009; 9(1):16-26.
- [27] Silva, IC, *et al.* Moderada endemicidade da infecção pelo vírus linfotrópico-T humano na região metropolitana de Belém, Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* 2018; 21:e180018.
- [28] Galvao-Castro B, *et al.* Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion.* 1997; 37:242-3.
- [29] Ferreira JOC, *et al.* Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from Sao Paulo, Brazil. *Transfusion.* 1995; 35:258-63.
- [30] Dourado I, *et al.* Risk factors for human T cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in northeast Brazil: possibly greater efficiency of male to female transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94:13-8.
- [31] Glória LM, *et al.* Perfil clínico-epidemiológico de pacientes infectados pelo HTLV-1 em Belém/Pará. *Cadernos Saúde Coletiva.* 2015; 23(2):157-162.
- [32] Campos KR, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Costa NA, Barreto-Damião CH, Magri MC, *et al.* Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1. *Rev Inst Adolfo Lutz.* São Paulo, 2015; 74(1):57-65.
- [33] Araujo AQ, Silva MT. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurol.* 2006; 5(12):1068-1076.
- [34] Ijichi S, Osame M. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): recent perspectives. *Intern Med.* 1995; 34(8):713-721. doi:10.2169/internalmedicine.34.713
- [35] Romanelli, LCF, Caramelli P, Proietti ABCF. O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): quando suspeitar da infecção?. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 2010; 56(3):340-347.
- [36] Loureiro, P. Infecção pelo HTLV-1: Diagnóstico e determinação da carga proviral em indivíduos assintomáticos e com enfermidades associadas em serviço de referência no Nordeste. *Diss.* 2008.
- [37] Hodson A, Laydon DJ, Bain BJ, *et al.* Pre-morbid human T-lymphotropic virus type I proviral load, rather than

percentage of abnormal lymphocytes, is associated with an increased risk of aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Haematologica*. 2013; 98(3):385-8.

- [38] Chaturvedi AK, Wilson M, Sanders-Lewis KA, *et al.* Hematologic and biochemical changes associated with human T lymphotropic virus type 1 infection in Jamaica: a report from the population-based blood donors study. *Clin Infect Dis*. 2007; 45(8):975-982.